



Консультант GLP-PLANET 2023

**мнение
фармацевтической отрасли**

Консультант GLP-PLANET 2023

Мнение фармацевтической отрасли

Монография

Санкт-Петербург, 2023

УДК 001.891:636.028

ББК 48.6

DOI 10.57034/978-5-6048955-2-8

Научные редакторы:

Макаров Валерий Геннадьевич,
д-р мед. наук, профессор,
президент Организационного комитета GLP-PLANET

Шестаков Владислав Николаевич,
директор ФБУ «Государственный институт
лекарственных средств и надлежащих практик»

Рецензенты:

Баклаушев В.П., зам. ген. директора по научной работе
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России», д-р мед. наук, доцент

Гайковская Л.Б., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики,
биологической и общей химии им. В.В. Соколовского,
ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, д-р мед. наук, доцент

Дежаткина С.В., зав. кафедрой «Морфология и физиология, кормление,
разведение и частная зоотехния» ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, д-р биол. наук, профессор

Летуновская А.В., ветеринарный врач,
ООО «Ветеринарная клиника Сотникова», канд. вет. наук

Лужанин В.Г., ректор ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России, канд. биол. наук, доцент

Лычева Н.А., н. с., Научно-образовательный институт фармации им. К.М. Лакина,
ФГБОУ ВО Российский университет медицины Минздрава России, канд. биол. наук,
доцент кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО Алтайский государственный
медицинский университет

Прусаков А.В., зав. кафедрой внутренних болезней животных им. А.В. Синева
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»,
д-р вет. наук, доцент

Сипкина Н.Ю., в. н. с. НИГ тераностики ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России,
канд. фарм. наук

Консультант GLP-PLANET 2023. Мнение фармацевтической отрасли: монография / Под ред.
В.Г. Макарова и В.Н. Шестакова. — Санкт-Петербург: НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», 2023. — 364 стр. с илл.
ISBN 978-5-6048955-2-8

В монографии «Консультант GLP-PLANET. Мнение фармацевтической отрасли» приводятся представления ведущих экспертов — специалистов в области доклинических исследований, представителей фармацевтических компаний и регуляторных органов об актуальных вопросах доклинических исследований и фармацевтической разработки лекарственных средств.

ISBN 978-5-6048955-2-8

© Коллектив авторов, 2023

Издание выпущено под редакцией
Организационного комитета GLP-PLANET.



МАКАРОВ
Валерий Геннадьевич,
профессор, д-р мед. наук

Президент Организационного комитета
GLP-PLANET

Главный редактор
«Консультант GLP-PLANET»



ШЕСТАКОВ
Владислав Николаевич

Директор ФБУ «Государственный
институт лекарственных средств
и надлежащих практик»

ОГЛАВЛЕНИЕ

Практические аспекты GLP	9
Риск-ориентированный подход к созданию лекарственного препарата ...	47
Особенности подготовки программы исследований биологических лекарственных средств	75
Принципы ARRIVE: от планирования исследования до публикации результатов.....	113
Альтернативные модели в биомедицинских экспериментах	130
Трансгенные животные. Технология разработки моделей и особенности использования в биомедицинских экспериментах	143
Роль референтных интервалов в доклинических исследованиях.....	167
Фармакологическая безопасность и прижизненная визуализация у лабораторных животных во время эксперимента	185
Организация ветеринарного обеспечения и «культуры ухода» для лабораторных животных	210
Подходы к организации этической экспертизы научно-исследовательских работ, выполняемых на лабораторных животных	221
Эвтаназия лабораторных животных.....	247

От организационного комитета

Уважаемые читатели, представляем вашему вниманию монографию «Консультант GLP-PLANET. Мнение фармацевтической отрасли».

Наука движется вперед. Стремительно развиваются технологии, методы анализа, повышается уровень нормативных требований, что вынуждает современного специалиста быстро ориентироваться в потоке информации. Уникальность ежегодного издания «Консультант GLP-PLANET» состоит в том, что в нем сконцентрирован многолетний опыт специалистов в области фармацевтической разработки и доклинических исследований, а также представлены актуальные сведения в этой области.

Темами конференции в 2023 году стали: подготовка программ доклинических исследований отдельных групп препаратов — биотехнологические и высокотехнологичные лекарственные средства, планирование дизайнов доклинических исследований с учетом рекомендаций ARRIVE, особенности использования трансгенных животных, подходы к статистической обработке данных исследований, биоразнообразие и альтернативные модели в биомедицинских экспериментах. Впервые была затронута тема подготовки научных публикаций.

Также монография включает частичный перевод рекомендаций американской ветеринарной медицинской ассоциации (AVMA Guidelines for the euthanasia of animals) по эвтаназии животных. Этот раздел является нашим вкладом в популяризацию принципов гуманного обращения с животными и доступным источником знаний для самого широкого круга специалистов, вовлеченных в доклинические исследования *in vivo*.

«Консультант GLP-PLANET» — это постоянно обновляемый источник информации, средство коммуникации, благодаря которому можно обмениваться достоверной информацией относительно доклинических исследований.

Организационный комитет благодарит всех участников конференции, спонсоров, авторов настоящего издания и выражает надежду на активное участие всех профильных специалистов фармацевтической отрасли в работе конференции GLP-PLANET V.

Практические аспекты GLP

<https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-2-8-s1>

С. В. Ходько¹, Е. Д. Бондарева¹, П. В. Гремякова², Е. П. Гуляева³, С. В. Гущина¹, Е. Ю. Клинаева¹, М. Н. Макарова¹, А. Н. Мурашев⁴, Е. Д. Семивеличенко⁵, А. А. Трапкова⁶, В. С. Шнаушшта⁷

¹ АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,

² ООО «Поверие»,

³ Центр неклинических испытаний на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН»,

⁴ ФГБНУ Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН,

⁵ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России,

⁶ ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России,

⁷ РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств и медицинских изделий» КМ и ФК Минздрава Республики Казахстан

Помещения, оборудование, персонал, тест-системы

В ходе конференции GLP-PLANET IV состоялась 8-я сессия «Практические аспекты GLP. Помещения, оборудование, персонал, тест-системы». Сессия была насыщенной и имела высокую практическую значимость для работы испытательных центров.

Директор АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» Марина Николаевна Макарова рассказала о процессном подходе в испытательном центре на примере воспроизведения лабораторных животных.

Алла Аркадьевна Трапкова, заместитель генерального директора ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России сообщила о перспективах инспектирования на соответствие требованиям GLP EAЭС в рамках регистрации лекарственных препаратов.

Аркадий Николаевич Мурашев, руководитель отдела биологических испытаний филиала ФГБНУ Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН рассказал о возможностях международного признания результатов неклинических исследований как о необходимом условии для выхода на мировой рынок.

Валентина Станиславовна Шнаушта, заведующая лабораторией фармакологических испытаний РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств и медицинских изделий» Комитета медицинского и фармацевтического контроля Минздрава Республики Казахстан в своем докладе осветила фундаментальные вопросы валидации биоаналитической методики в свете требований надлежащей лабораторной практики GLP OECD. Была обозначена важность планомерного процесса валидации методики при проведении анализа биологических образцов для получения достоверных количественных данных в соответствии с правилами ЕАЭС, ЕМЕА, FDA, поскольку результаты этого анализа составляют основополагающий блок на пути к утверждению при регистрации препарата.

Полина Владиславовна Гремякова, директор ООО «Поверие» подробно рассказала об управлении оборудованием GLP-центра, привела классификацию оборудования, которое используется при выполнении научно-исследовательских работ, осветила вопросы поверки, калибровки и аттестации оборудования и продемонстрировала примеры случаев, которые могут произойти, если не выполнять обязательные требования, предъявляемые к эксплуатации и обслуживанию оборудования.

Екатерина Юрьевна Клинаева, менеджер по научно-исследовательской работе АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» осветила один из возможных подходов к проведению инспекции испытательного центра на основании разработанных требований к производственным помещениям. В докладе прозвучало, насколько важно осознавать, для каких именно видов работ предназначено каждое помещение, каким оборудованием оно должно быть оснащено, какие инженерные системы должны обеспечивать его функционал, как разработать необходимые документы и провести инспекцию.

Елена Петровна Гуляева, руководитель службы обеспечения качества Центра неклинических испытаний на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» СО РАН в своем докладе представила очень интересный подход к классификации и валидации оборудования центра неклинических испытаний на примере валидации микроскопа. Хочется отметить креативность и неординарность мышления, чего так часто не хватает службе качества испытательных центров при попытках соответствия нормативным документам.

Евгений Дмитриевич Семивеличенко, заместитель начальника Центра экспериментальной фармакологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России рассказал о том, как приходится действовать в ситуации, когда нет выбора. Конкретно их испытательный центр вынужденно был организован в здании, которое представляет собой историческую и архитектурную ценность, и коллеги успешно справились с тем, чтобы реализовать там все необходимые принципы надлежащей лабораторной практики.

Светлана Владимировна Ходько, руководитель службы качества АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» подвела некоторые итоги сессии и поведала об основных проблемах в реализации принципов GLP в испытательных центрах на основании заполненных анкет от коллег из разных регионов страны. Данный доклад предварял мастер-класс «GLP. Риск-ориентированный подход», в рамках которого была охарактеризована возможность применения различных методов оценки риска в условиях

доклинического центра. Авторами ситуационных задач к мастер-классу и по совместительству его ведущими являлись Евгения Дмитриевна Бондарева, руководитель группы биобезопасности АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» и Светлана Валерьевна Гущина, специалист по валидации и статистике АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ».

Оценка рисков применительно к процессному подходу в испытательных центрах

*...Есть ли альтернатива управлению рисками для качества?
Конечно, есть — «рискованное управление качеством»,
принятие опрощенных решений в ситуации высокой неопределенности.
А.А. Александров*

Основопологающим международным стандартом для системы менеджмента качества является ISO 9001:2015. В его действующей версии появилось понятие «мышление, основанное на менеджменте рисков», а также требование (уже не рекомендация) к организациям учитывать риски при планировании и управлении системой менеджмента качества.

Риск-ориентированное мышление позволяет организации определять факторы, которые могут привести к отклонению от запланированных результатов процессов и системы менеджмента качества организации, а также использовать предупреждающие средства управления для минимизации негативных последствий и максимального использования возникающих возможностей [1].

В отношении менеджмента риска основным документом является Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р ИСО 31000–2019 «Менеджмент риска. Принципы и руководство»¹. Во введении данного документа как нельзя лучше сказано, что менеджмент риска предназначен для лиц, чья деятельность направлена на **создание и защиту ценностей организаций** путем менеджмента риска, принятия решений, постановки и достижения целей, повышения эффективности деятельности.

Организации всех типов и размеров сталкиваются с внешними и внутренними факторами и влиянием, которое создает неопределенность в отношении достижения поставленных целей. Менеджмент риска является итеративным процессом и помогает организациям в определении стратегии, достижении целей и принятии обоснованных решений.

Менеджмент риска является **частью корпоративного управления** организации и имеет фундаментальное значение для управления на всех уровнях. Он способствует **совершенствованию системы управления организацией**.

Менеджмент риска затрагивает **любые виды деятельности, осуществляемые в рамках организации**, и включает взаимодействие с причастными сторонами.

Менеджмент риска учитывает внешнюю и внутреннюю среду организации, включая поведение людей и культурные факторы.

¹ ГОСТ Р ИСО 31000–2019 «Менеджмент риска. Принципы и руководство».

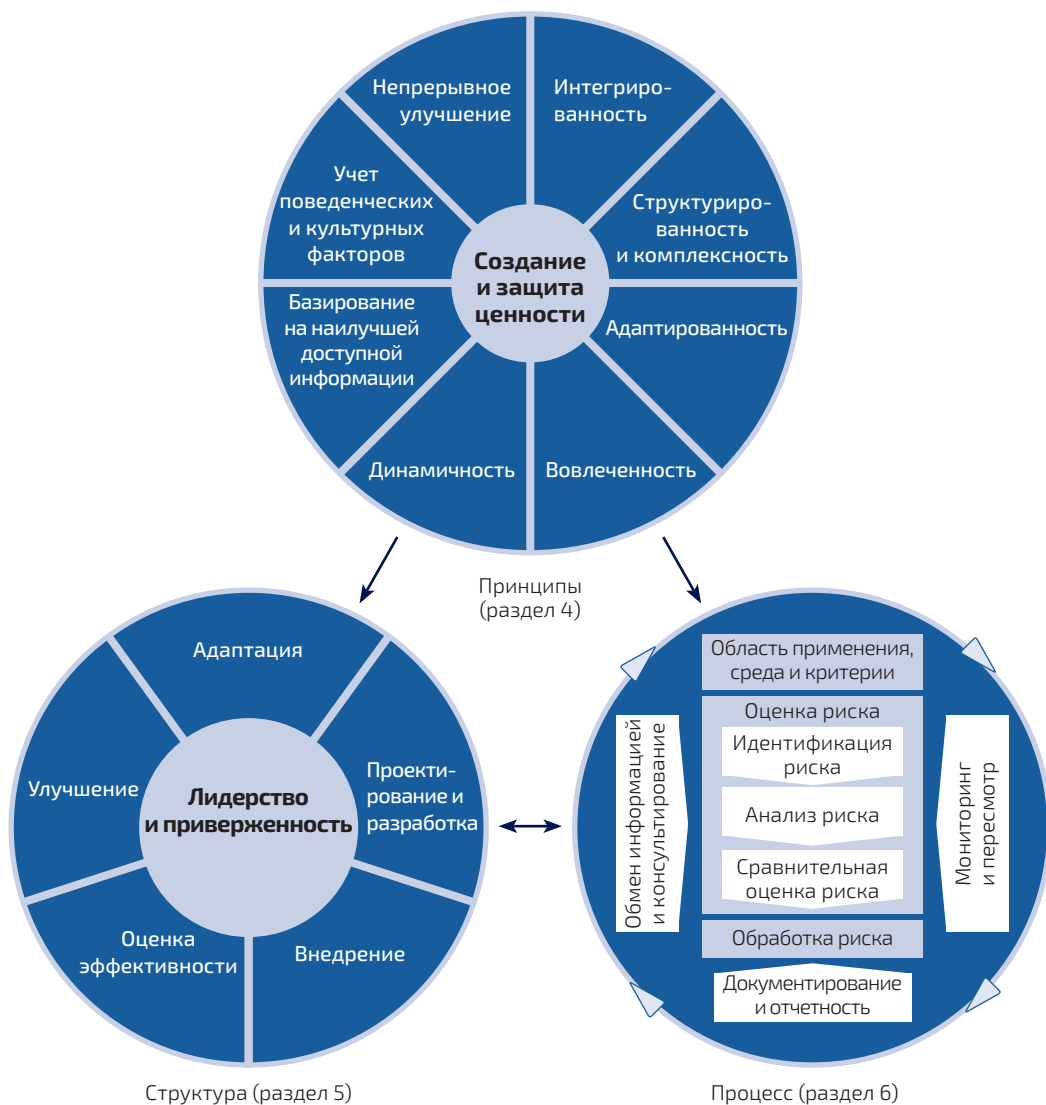


Рис. 1. Составные части менеджмента риска

Менеджмент риска основан на принципах, структуре и процессе, описанных в ГОСТе Р ИСО 31000–2019², как показано на рис. 1.

Вышеперечисленные компоненты бывают уже частично или полностью внедрены в организации, однако они **могут потребовать адаптации или улучшения для более эффективного, результативного и последовательного менеджмента риска.**

² ГОСТ Р ИСО 31000–2019 «Менеджмент риска. Принципы и руководство».

ГОСТ Р ИСО 31000–2019 устанавливает ряд принципов, которые необходимо соблюдать, для того чтобы менеджмент риска был эффективным. ГОСТ Р ИСО 31000–2019 рекомендует, чтобы организации **разрабатывали, внедряли и постоянно улучшали структуру и процесс менеджмента риска, что будет способствовать росту ценности организаций.**

Ниже приведем только самые необходимые термины и определения, без которых обойтись невозможно.

Риск (risk): следствие влияния неопределенности на достижение поставленных целей. При этом под следствием влияния неопределенности необходимо понимать отклонение от ожидаемого результата или события (позитивное и/или негативное). Цели могут быть различными по содержанию (в области экономики, здоровья, экологии и т.д.) и назначению (стратегические, общеорганизационные, относящиеся к разработке проекта, конкретной продукции и процессу). Риск часто характеризуют путем описания возможного события и его последствий или их сочетания. Риск часто представляют в виде последствий возможного события (включая изменения обстоятельств) и соответствующей вероятности. Неопределенность — это состояние полного или частичного отсутствия информации, необходимой для понимания события, его последствий и их вероятностей.

Менеджмент риска (risk management): скоординированные действия по руководству и управлению организацией в области риска.

Причастная (заинтересованная) сторона (stakeholder): любой индивидуум, группа или организация, которые могут воздействовать на риск, подвергаться воздействию или ощущать себя подверженными воздействию риска. Лицо, принимающее решение, также является причастной стороной.

Источник риска (risk source): объект или деятельность, которые самостоятельно или в комбинации с другими обладают возможностью вызывать повышение степени риска. Источник риска может быть материальным или нематериальным.

Событие (event): возникновение или изменение специфического набора условий. При этом событие может быть единичным или многократным и иметь несколько причин, а также определенным или неопределенным. Событие можно называть терминами «инцидент», «опасное событие» или «несчастный случай». Событие без последствий может также быть названо терминами «угроза возникновения опасного события», «угроза инцидента», «угроза поражения» или «угроза возникновения аварийной ситуации».

Последствие (consequence): результат воздействия события на объект. При этом результатом воздействия события может быть одно или несколько последствий, которые в свою очередь бывают определенными или неопределенными, а также ранжированы от позитивных до негативных. Последствия могут быть выражены качественно или количественно. Первоначальные последствия могут вызвать эскалацию дальнейших последствий по принципу «домино».

Управление (риском) (control): меры, направленные на изменение риска. Управление риском охватывает процессы, политику, устройства, методы и другие средства, используемые для модификации риска. Управление не всегда может привести к ожидаемым результатам изменения риска.

Сравнительная оценка риска: процесс сравнения результатов анализа риска с критериями для определения приемлемости риска. Сравнительная оценка риска может быть использована при принятии решения об обработке риска.

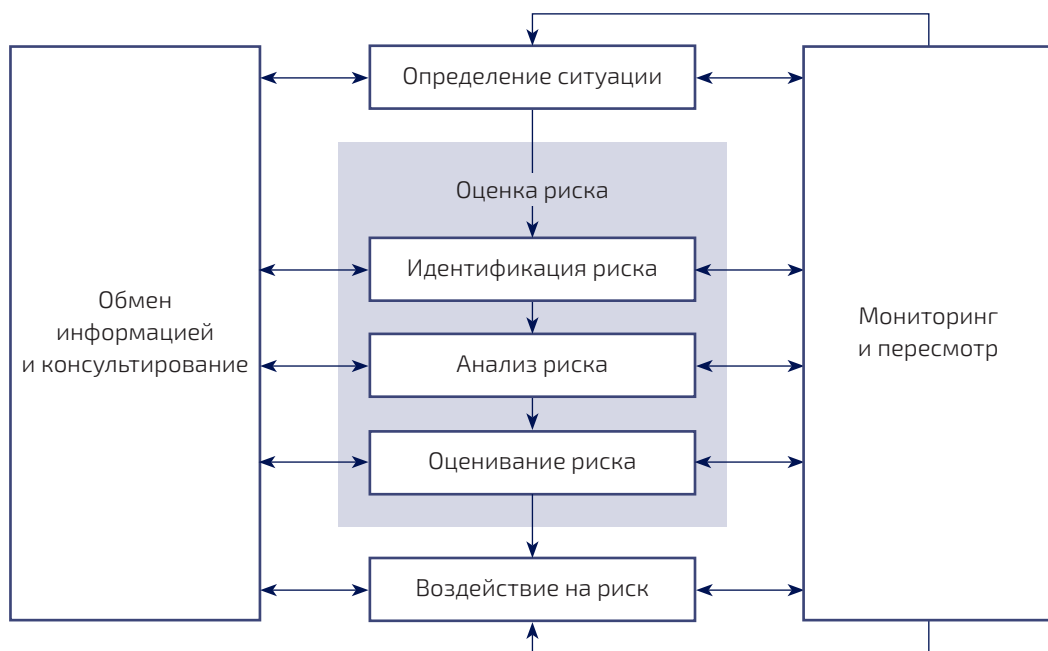


Рис. 2. Процесс управления рисками для качества

В данном разделе мы хотели бы предложить один из возможных вариантов управления рисками в организации.

Процесс управления рисками для качества включает составляющие, указанные на рис. 2.

Обмен информацией и консультирование с внешними и внутренними заинтересованными сторонами осуществляются на всех этапах процесса риск-менеджмента. Поэтому планы обмена информацией и консультирования должны быть разработаны на раннем этапе. Они должны рассматривать вопросы, касающиеся самого риска, его причин, последствий (если они известны) и мер, предпринимаемых для воздействия на него. Должны осуществляться эффективный внешний и внутренний обмен информацией и консультирование для гарантии того, что подотчетные лица, ответственные за процесс риск-менеджмента, и заинтересованные стороны представляют себе основу, на базе которой принимаются решения, и осознают причины того, почему требуются конкретные действия.

Примером обмена информацией и консультирования может быть согласование плана исследования между испытательным центром и спонсором или со всеми заинтересованными площадками в случае многоцентровых исследований. Решение ЕЭК № 81 от 03.11.16³ (Приложение № 3) прямо говорит о том, что **использование несколь-**

³ Решение ЕЭК № 81 от 03.11.16 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Европейского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

ких испытательных площадок увеличивает сложность задач проектирования и управления исследованием, что приводит к дополнительным рискам для достоверности и надежности результатов исследования. Поэтому очень важно, чтобы все потенциальные угрозы целостности исследования на основании представленной структуры исследования на нескольких площадках были оценены, обязанности участников четко распределены, а риски сведены к минимуму. Должна быть проведена техническая (научная) экспертиза и всесторонне рассмотрены статус соответствия исследования правилам надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза, утверждаемым Евразийской экономической комиссией (далее — правила), ресурсы и рентабельность всех планируемых к использованию испытательных площадок.

Очень важно, чтобы у всех заинтересованных сторон было понимание, на каком этапе исследования что-то может пойти не так. Спонсор должен четко понимать, что, например, не у всех животных в эксперименте удастся одновременно забрать кровь/мочу или иные биологические образцы в один день, при этом недостающие образцы можно будет забрать на следующий день.

Обмен информацией и консультирование с заинтересованными сторонами являются важными аспектами, потому что с их помощью делают выводы о риске, основанные на их восприятиях риска. Эти восприятия могут отличаться вследствие различий в ценностях, потребностях, предположениях, понятиях и опасениях заинтересованных сторон. Поскольку их точки зрения могут иметь существенное влияние на принимаемые решения, то восприятия заинтересованных сторон необходимо идентифицировать, регистрировать, записывать и учитывать в процессе принятия решений.

Поправки и отклонения в доклинических исследованиях — это также иллюстрация риск-ориентированного подхода, когда есть необходимость договориться о плановых или внеплановых изменениях дизайна исследования таким образом, чтобы все заинтересованные стороны находились в одном информационном поле.

Обмен информацией и консультирование должны способствовать обмену правдивой, существенной, точной и понятной информацией с учетом аспектов конфиденциальности и личной неприкосновенности.

Оценка риска — общий процесс идентификации риска, анализа риска и оценивания риска.

Идентификация риска (risk identification): процесс обнаружения, распознавания и описания рисков.

Идентификация включает распознавание источников риска, событий, их причин и возможных последствий.

Технологии идентификации риска могут включать:

- обзоры литературы и анализ исторических данных;
- тестирование и моделирование для определения того, что может произойти при определенных обстоятельствах;
- опросы опытных людей;
- технологии, в которых рассматриваемый субъект делится на более мелкие элементы, каждый из которых, в свою очередь, рассматривается;
- поощрения воображаемого мышления о возможностях будущего;
- контрольные списки или таксономии на основе прошлых данных или теоретических моделей (SWOT, PESTLE).

В сфере доклинических исследований нередки ситуации, в которых нормативной документацией обозначены требования, но нет понимания, каким образом они должны быть реализованы. Тогда для идентификации риска требуются качественный обзор всей нормативной документации, оценка имеющихся в испытательном центре условий и формулировка проблем, которые необходимо решить.

Например, в Решении Совета Евразийской экономической комиссии от 3.11.16 № 81⁴ касательно определения критических фаз экспериментальной части научно-исследовательской работы с использованием лабораторных животных сказано следующее.

- «Критические фазы» (critical phases) — определенные процедуры или виды деятельности в рамках исследования, точное и правильное исполнение которых является необходимым условием для качества, достоверности и надежности получаемых результатов исследования.
- Программа обеспечения качества должна иметь системы и способы контроля исследований, в том числе необходимо определить характер планирования и проведения инспекций службы качества, основанный на контроле критических этапов исследования.
- Участие отдела обеспечения качества в разработке стандартных операционных процедур и планов исследований подразумевает в числе прочего определение критических этапов исследования.
- Правила требуют, чтобы служба качества инспектировала главным образом критические фазы исследования, поэтому необходимо, чтобы в исследованиях служба качества была полностью осведомлена о том, что представляют собой критические фазы и критические аспекты таких исследований. Руководителю исследования, ведущим исследователям и персоналу, участвующему в исследовании, необходимо совместно разработать руководство по проведению инспекций в соответствующих областях.

При этом регламентирующие документы по определению критических фаз исследований отсутствуют, в связи с чем сотрудники АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», руководствуясь многолетним опытом в области доклинических исследований, определили следующие критические фазы экспериментальной части исследования с использованием лабораторных животных:

- регистрация массы тела;
- формирование экспериментальных групп;
- приготовление готовых доз исследуемых объектов для введения;
- введение исследуемых объектов;
- клинический осмотр и наблюдение;
- физиологические тесты;
- сбор и передача образцов биоматериала;
- индукция патологии;
- работа с образцами биоматериала в смежных подразделениях;
- эвтаназия.

⁴ Решение ЕЭК № 81 от 03.11.16 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

Таблица 1

Тяжесть вреда (последствий опасности) — *S*

Значимость	Баллы
Катастрофическая	5
Критическая	4
Серьезная	3
Низкая (несерьезная)	2
Очень низкая (незначительная)	1

Таблица 2

Вероятность возникновения опасности — *O*

Вероятность возникновения	%	Баллы
Очень часто	51–100	5
Часто	21–50	4
Время от времени	11–20	3
Редко	3–10	2
Практически невозможно	До 2	1

Таким образом выглядела идентификация риска. Затем для каждой критической фазы был проведен анализ риска.

Анализ риска (risk analysis): процесс понимания природы риска и определения уровня риска.

Анализ риска обеспечивает основу для оценивания риска и решений, касающихся воздействия на риск. Анализ риска включает определение степени риска.

В ГОСТе 58771–2019 «Национальный стандарт Российской Федерации. Менеджмент риска. Технологии оценки риска»⁵ предложены **43 вида анализа рисков**, всего же их насчитывается **около 70**.

При выборе метода анализа риска стоит учитывать, что в общепринятом понимании риск — это тяжесть вреда, помноженная на вероятность его возникновения.

В данном разделе предложены три наиболее применимых, по нашему мнению, метода оценки рисков.

Метод FMEA [Failure Mode и Effect Analysis (Анализ видов и последствий отказов (несоответствий))], который предполагает комплексную модель риска потенциальных несоответствий, включающую три составляющих:

- *S* — тяжесть вреда последствий опасности (табл. 1);
- *O* — вероятность возникновения опасности (табл. 2);
- *D* — вероятность выявления опасности (табл. 3).

⁵ ГОСТ 58771–2019 «Национальный стандарт Российской Федерации. Менеджмент риска. Технологии оценки риска».

Таблица 3

Вероятность выявления опасности — <i>D</i>		
Вероятность обнаружения	%	Баллы
Высокая	Выше 98	1
Удовлетворительная	96–98	2
Средняя	85–95	3
Низкая	80–85	4
Очень низкая	Меньше 80	5

Таблица 4

Категории рисков	
ПЧР, баллы	Категория риска
Ниже 10	Несущественный риск. Не влияет на ход деятельности организации и достоверность полученных данных
11–40	Приемлемый риск. Может изменить ход деятельности организации, но не влияет на достоверность полученных данных
41–70	Значительный риск, немедленные решения. Действие, которое может привести к ухудшению качества (изменить ход деятельности организации) или к значительным изменениям функциональности приборов/оборудования/систем и др.
71 и выше	Неприемлемый риск. Действие, которое может привести к ухудшению качества (изменить ход деятельности организации), повлиять на достоверность получаемых данных по ключевым показателям

Составляющие риска определяются экспертным путем по таблицам соответствующих критериев. Критерии и шкала баллов разработаны по принципу метода FMEA. Комплексный риск рассчитывают как произведение трех составляющих риска *S*, *O* и *D*. Результат произведения называется «приоритетное число риска» — ПЧР.

Вероятность — степень возможности появления какого-либо определенного события в тех или иных условиях.

Для анализа риска необходимо:

- рассчитать приоритетное число риска;
- определить категорию риска.

Расчет приоритетного числа риска

Комплексный риск рассчитывают как произведение трех составляющих риска *S*, *O* и *D*. Результат произведения — ПЧР:

$$\text{ПЧР} = S \times O \times D.$$

Критерии определения категории риска, то есть оценка допустимости риска путем сравнения степени риска с принятыми критериями, указана в табл. 4.

Другой метод оценки рисков **ETA (Event Tree Analysis, анализ дерева событий)** — это графический метод, который представляет взаимоисключающие последовательности событий, следующих за исходным событием, в соответствии с функционированием или нефункционированием различных систем, разработанных для уменьшения их последствий, может применяться как качественно, так и количественно.

Метод ETA может быть использован для моделирования, вычисления и ранжирования (с точки зрения риска) различных сценариев инцидента после возникновения начального события и может применяться на всех стадиях жизненного цикла продукции или процесса.

Также этот метод может быть использован на качественном уровне при мозговом штурме, определении сценариев и последовательности событий, которые могут возникнуть после начального события, и при определении воздействия на результат различных видов обработки риска, барьеров или средств управления, предназначенных для снижения нежелательных последствий.

При оценке приемлемости средств управления наиболее целесообразно применение метода ETA для количественного анализа. Чаще всего данный метод используют при моделировании отказов в ситуации использования большого количества мер защиты.

Метод ETA может быть использован при моделировании начала события для выявления возможных потерь и преимуществ. Однако в обстоятельствах, где необходимо найти пути оптимизации и получения наибольших преимуществ, чаще используют моделирование с помощью «дерева» решений.

Входные данные:

- перечень рассматриваемых начальных событий;
- информация о способах обработки, барьерах, средствах управления и соответствующих вероятностях отказа (для количественного анализа);
- понимание процессов нормирования начального отказа.

Построение «дерева» событий начинают с выбора начального события. Это может быть инцидент, такой как взрыв пыли, или такое событие, как отказ системы энергоснабжения. Далее перечисляют имеющиеся функции или системы, направленные на смягчение последствий. Для каждой функции или системы чертят линии для отображения ее исправного состояния или отказа. Вероятность отказа может быть оценена и назначена для каждой такой линии. Данную условную вероятность оценивают, например, с помощью экспертных оценок или анализа «дерева» неисправностей. Таким образом изображают различные пути развития событий от начального события.

Следует учитывать, что вероятности на «дереве» событий являются условными, например, вероятность срабатывания разбрызгивателя системы пожаротушения, полученная при испытаниях в нормальных условиях, будет отличаться от таковой при срабатывании этой системы во время возгорания, вызванного взрывом.

Каждая ветвь дерева представляет собой вероятность того, что все события на этом пути произойдут (рис. 3). Поэтому вероятность результата вычисляют как произведение отдельных условных вероятностей и вероятности начального события при условии независимости событий.

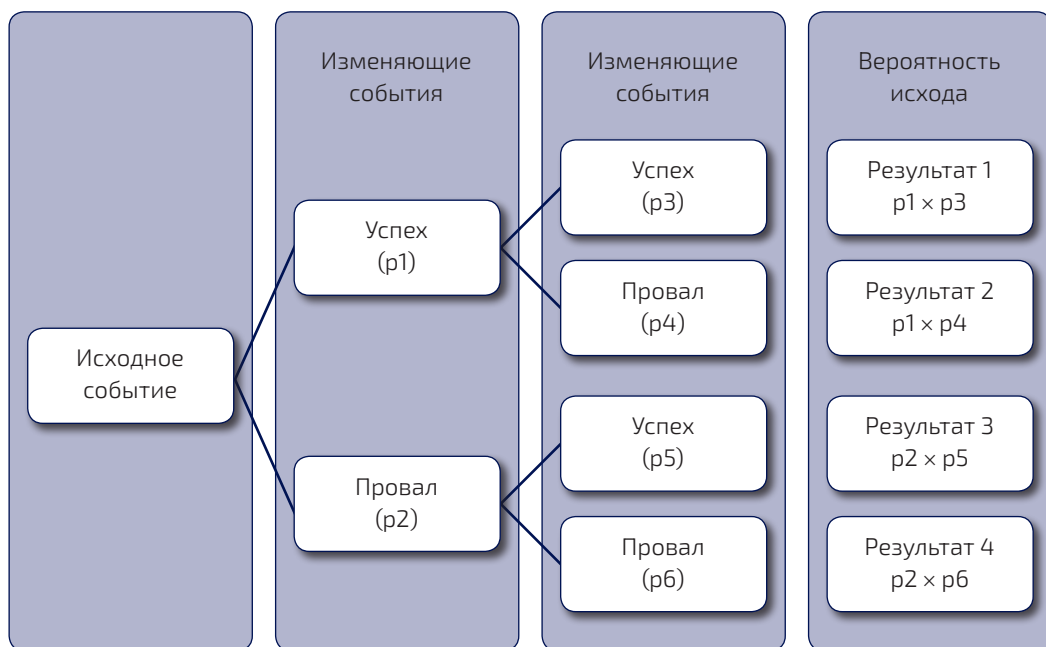


Рис. 3. Дерево событий

Выходные данные:

- качественное описание возможных проблем в виде комбинаций событий, представляющих собой различные следствия начального события (ранжирование последствий);
- количественные оценки частоты или вероятности появления событий и относительной значимости различных последствий отказа и способствующих им событий;
- перечень рекомендаций по снижению риска;
- количественные оценки эффективности внедрения рекомендаций.

И третий метод, **анализ затрат и выгод (Cost and Benefit Analysis, CBA)**, позволяет взвесить общую ожидаемую стоимость изменений в денежном выражении относительно их общих ожидаемых выгод, чтобы выбрать наиболее эффективный или наиболее выгодный вариант (рис. 4).

Он может быть качественным или количественным или включать комбина-

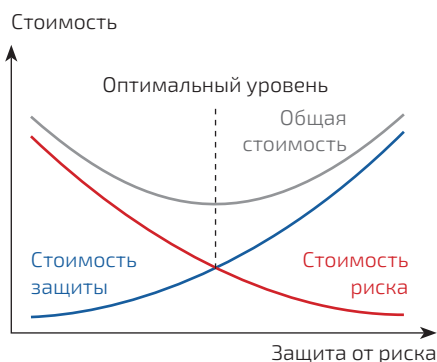


Рис. 4. Анализ затрат и выгод

цию количественных и качественных элементов и применяться на любом уровне организации.

Этапы

- Создание основы для определения параметров анализа.
- Определение затрат и выгоды, чтобы их можно было классифицировать по типу и назначению.
- Расчет затрат и выгоды на протяжении предполагаемого жизненного цикла проекта или инициативы. Сравнение затрат и выгоды, используя совокупную информацию.
- Расчет результатов и обоснование окончательной рекомендации.

Оценивание риска (risk evaluation): процесс сравнения результатов анализа риска с установленными критериями для определения, является ли риск и/или его величина приемлемыми или допустимыми.

Оценивание риска способствует принятию решения относительно воздействия на риск.

Воздействие на риск (risk treatment): процесс модификации (изменения) риска.

Воздействие на риск может включать:

- избегание риска посредством решения не начинать или не продолжать деятельность, в результате которой возникает риск;
- принятие или увеличение риска для использования благоприятной возможности;
- устранение источника риска;
- изменение вероятности или возможности;
- изменение последствий;
- разделение риска с другой стороной или сторонами (включая контракты и финансирование риска);
- осознанное удержание риска.

Воздействие на риск, имеющий отрицательные последствия, иногда называют «смягчение риска», «устранение риска», «предупреждение риска» и «снижение риска».

Воздействие на риск может создавать новые риски или изменять существующие риски. По результатам воздействий на риск уровень контроля корректирующих и предупреждающих действий определяется в соответствии с табл. 5.

Контроль риска (control): мера, которая модифицирует (изменяет) риск.

Контроль риска может включать любой процесс, политику, методику, практику или другие действия, модифицирующие риск.

Контроль риска может не всегда приводить к желаемому или ожидаемому эффекту.

Остаточный риск (residual risk): риск, сохраняющийся после воздействия на него.

Остаточный риск может содержать в себе неидентифицированный риск.

Остаточный риск может быть также известен как «удержанный риск».

Мониторинг (monitoring): постоянная проверка, надзор, критическое наблюдение или определение состояния с целью идентифицировать изменения относительно требуемого или ожидаемого уровня.

Мониторинг можно применять к инфраструктуре менеджмента риска, процессу менеджмента риска, риску или контролю риска.

Управление риском является частью действующего процесса системы управления качеством и поэтому требует формирования обзора рисков (периодического пересмотра рисков).

На этапе обзора рисков необходимо оценить эффективность проведения мероприятий по уменьшению/устранению рисков с учетом следующих вопросов.

- Все ли разработанные мероприятия по управлению риском сыграли свою роль в защите от неблагоприятных событий.
- Не следует ли заменить какие-либо меры на наиболее эффективные.
- Не появились ли новые данные по рассматриваемому риску.
- Следует ли внести изменения в систему управления рисками по качеству.

В рамках обзора рисков требуется использовать данные:

- о контроле корректирующих и предупреждающих действий по управлению рисками;
- по результатам внутренних аудитов;
- по решениям совещаний по качеству.

Таблица 5

Уровень контроля выполнения корректирующих и предупреждающих действий в зависимости от категории риска

Категория риска	Решение
Неприемлемый риск	Неприемлемый Выполнение работ запрещено до устранения опасности или снижения ее действия как минимум до категории «значительный риск». Например: в случае возникновения такого риска при проведении НИР производится незамедлительное информирование спонсора. При принятии решения о продолжении проведения исследования необходимо оформить отклонение к плану исследования
	Значительный Выполнение работы возобновляется только после проверки всех корректирующих и предупреждающих действий мероприятий. Например: при необходимости оформить отклонение к плану исследования. В случае возникновения риска для жизни и здоровья персонала и/или животных, выхода из строя оборудования или его некорректной работы, сохранения конфиденциальности выполнения НИР, сохранения архивных материалов и др. Сведения о событии заносятся в «Журнал учета аварийных ситуаций»
Приемлемый риск	Приемлемый Контроль выполнения корректирующих и предупреждающих действий осуществляется в рамках СОП СК-4. Например: необходимо оформить поправку к плану исследования в случае принятия решения руководителем исследования о внесении изменений в план исследования
	Несущественный

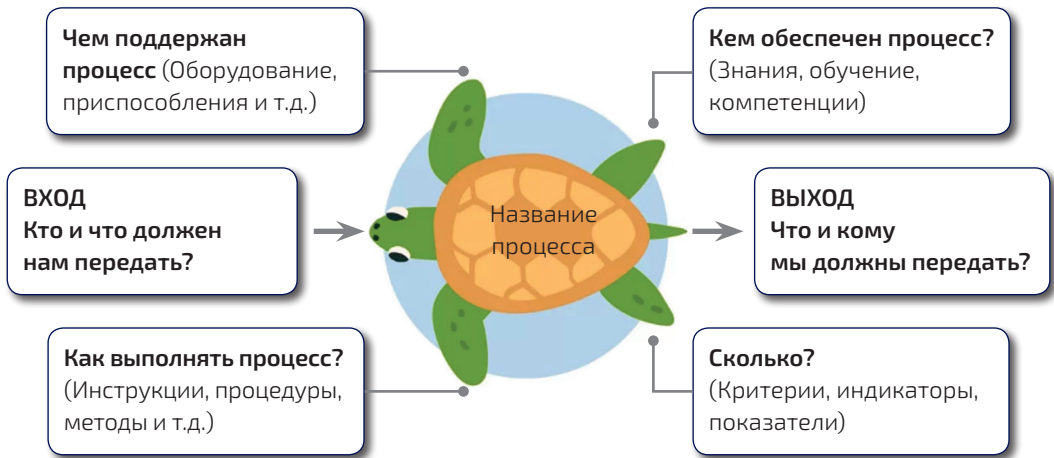


Рис. 5. Модель бизнес-процесса «Черепаха»

Пересмотр (review): деятельность, предпринимаемая для определения пригодности, адекватности и результативности предмета рассмотрения для достижения установленных целей.

Процедуры пересмотра можно применять к структуре менеджмента риска, процессу менеджмента риска, риску или контролю риска.

Так как же можно использовать управление рисками в доклинических исследованиях на практике в соответствии с процессным подходом?

Для анализа процесса его целесообразно представить в виде общеизвестной модели «Черепахи» (рис. 5)⁶, при этом необходимо учесть контекст организации (условия, в которых функционирует организация), включая характеристику влияния внешних и внутренних факторов.

При определении источников рисков в качестве внешних факторов рассматриваются факторы внешней среды, такие как политическая обстановка в стране, требования стран-заказчиков, конкуренция, влияние рынка и курса валют, социальная ответственность и т.д., в качестве внутренних — ценности, культура, знания, ресурсы, показатели деятельности организации.

На следующем этапе с целью упрощения процедур идентификации и управления рисками целесообразно представить процесс по отдельным этапам.

Для определения источников рисков можно воспользоваться следующими источниками:

- картами (паспортами) процессов (при их наличии);
 - результатами оценки внутренней и внешней удовлетворенности процессами.
- Положениями о подразделениях, содержащих информацию о целях, задачах,

⁶ Управление процессами системы менеджмента качества. URL: <https://bsclass.org/sysfiles/files/Upravlenie-protsessami-SMK.pdf> (дата обращения: 08.2023).

функциональных обязанностях подразделений, а также требованиях к результатам деятельности;

- положениями, порядками, инструкциями и другими локально-нормативными актами организации, регламентирующими соответствующие процессы/подпроцессы.

Представив процесс по отдельным этапам и определив предварительно источники рисков, можно приступать к процедурам их идентификации с применением различных методик. В результате использования процессного подхода мы можем получить полный перечень рисков событий для каждого этапа процесса.

В Консультанте 2021 г. приведен вариант процессного подхода, который используется в АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» и состоит из основных, обеспечивающих и вспомогательных процессов. Рассмотрим, как соотносятся процессы с вероятными/возможными рисками. Стоит помнить, что основным риском для всех испытательных центров, выполняющих доклинические исследования, является получение некачественных данных. Соответственно большинство рисков рассматривается именно в этом контексте.

Необходимо учитывать, что плановая работа с рисками, даже на интуитивном уровне, ведется в ходе разработки внутренней нормативной документации, в рамках системы менеджмента качества, и многие предупреждающие меры там уже учтены. В табл. 6 приведены примеры рисков относительно основных, вспомогательных и обеспечивающих процессов.

Ярким примером интуитивной работы по оценке рисков является создание процедуры по работе бумажного архива. В указанной процедуре, помимо прочего, должны быть предусмотрены условия окружающей среды для сохранности документов (температура, влажность, автономная система пожаротушения, ловушки для насекомых, датчики затопления и т.д.). Соблюдение этих условий требует различных ресурсов: административных, технических, материальных и др. Имея хорошо спланированную процедуру и наличие всех необходимых ресурсов для ее соблюдения, нет необходимости проводить обязательную плановую оценку рисков. Однако если возникают условия, которые не позволяют качественно выполнить процедуру (например, отсутствие технической возможности установки кондиционера для поддержания температуры воздуха), тогда появляется необходимость оценить риск сохранности документов именно в текущих условиях.

В рамках проведения мастер класса «*GLP. Риск-ориентированный подход*» были рассмотрены некоторые риски. Выбор рисков был осуществлен с учетом следующих моментов: ситуация может случиться в испытательном центре, могут произойти события, про которые говорят: «дело-то житейское...», при этом способы оценки рисков тоже разнятся, об этом уже говорилось выше в данном разделе.

С презентациями докладов сессии «Практические аспекты GLP. Помещения, оборудование, персонал, тест-системы» можно ознакомиться по ссылкам:

- «Процессный подход в испытательном центре» (Марина Николаевна Макарова);
- «Перспективы инспектирования на соответствие требованиям GLP EAЭС в рамках регистрации лекарственных препаратов» (Алла Аркадьевна Трапкова);
- «Международное признание результатов неклинических исследований — необходимое условие для выхода на мировой рынок» (Аркадий Николаевич Мурашев);
- «Фундаментальные вопросы валидации биоаналитической методики в свете требований надлежущей лабораторной практики GLP OECD» (Валентина Станиславовна Шнаукшта);

Таблица 6

Примеры рисков относительно основных, обеспечивающих и вспомогательных процессов

ОСНОВНЫЕ ПРОЦЕССЫ	РИСКИ
Выполнение научно-исследовательской работы	Утрата первичных данных
Управление документацией системы менеджмента качества организации	Несоблюдение сроков актуализации документов. Отсутствие записей об обучении сотрудников
Внутренние инспекции	Определение критических фаз экспериментальной части научно-исследовательской работы
Обучение персонала	Повторяющиеся несоответствия при работе лаборантов-исследователей с экспериментальными животными
ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ПРОЦЕССЫ	РИСКИ
Жизненный цикл биологического материала в отделе гистологии и патоморфологии	Утрата или порча гистологического материала
Жизненный цикл биологического материала в отделе лабораторной диагностики	Утрата или порча биологического материала. Оценка риска контаминации биопроб при проведении токсикокинетических исследований
Обращение объектов исследования в провизорской службе	Нарушение маркировки. Неверное приготовление готовых доз для введения
Управление оборудованием	Использование оборудования ненадлежащего качества. Выход оборудования из строя во время выполнения исследования
Валидация оборудования	Использование невалидированного оборудования
Обеспечение организации лабораторными животными	Невозможность закупки лабораторных животных с необходимыми характеристиками (вид, пол, возраст). Использование животных ненадлежащего качества. Дезинфекция стеклянных поилок. Влияние отклонений влажности воздуха на здоровье лабораторных животных. Оценка влияния дефицита витаминов на иммунитет лабораторных животных. Риск возникновения зооантропонозных заболеваний. Использование полнорационного комбикорма ПК-120 для кормления лабораторных животных после окончания срока хранения. Безопасность хранения питьевой воды в аварийных резервуарах

ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ	РИСКИ
Архивирование	<p>Утрата бумажных версий документов.</p> <p>Утрата электронных версий документов</p>
Обеспечение благополучных условий окружающей среды	<p>Возникновение устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам.</p> <p>Уровень шума и вибрации в помещениях содержания и тестирования лабораторных животных.</p> <p>Качество дезинфекции уборочного инвентаря.</p> <p>Оценка выбросов загрязняющих веществ в атмосферу.</p> <p>Оценка сбросов загрязняющих веществ со сточными водами в систему канализации.</p> <p>Оценка негативного воздействия на окружающую среду отходов различных классов опасности</p>
Управление инженерными сетями	<p>Нарушения в работе котельной.</p> <p>Нарушение водоснабжения.</p> <p>Нарушения в работе канализационно-насосной станции.</p> <p>Нарушения в работе приточно-вытяжной системы.</p> <p>Нарушения в работе электроснабжения.</p> <p>Техногенные аварии.</p> <p>Светодиодное освещение в помещениях содержания животных</p>
Управление закупками и аудит поставщика	<p>Действия в случае поставщика-монополиста</p>
Валидация компьютеризированных систем	<p>Получение первичных данных неудовлетворительного качества.</p> <p>Возможность внесения изменений в первичные данные, полученные с помощью компьютеризированных систем</p>
Обеспечение охраны труда сотрудников организации	<p>Риск возникновения зооантропонозных заболеваний.</p> <p>Оценка количества взвешенных частиц в воздухе рабочей зоны в помещениях обеззараживания биологических отходов</p>

- «Управление оборудованием GLP-центра» (Полина Владиславовна Гремякова);
- «Требования к производственным помещениям» (Екатерина Юрьевна Клинаева);
- «Классификация и подходы к валидации оборудования центра неклинических испытаний» (Елена Петровна Гуляева);
- «Адаптация требований НПД под конкретную лабораторию» (Евгений Дмитриевич Семивеличенко);
- «Основные проблемы в реализации принципов GLP в испытательных центрах. Чем поможет оценка рисков?» (Светлана Владимировна Ходько).

Материалы мастер-класса «GLP. Риск-ориентированный подход»

Задача 1.

Оцените риск и составьте программу мониторинга здоровья лабораторных животных

Условия

Популяция лабораторных крыс Wistar проживает на территории питомника в Северо-Западном регионе России с рождения, животных из других регионов не завозят. Международные рекомендации по мониторингу животных рекомендуют проводить исследования на вирус Сендай, сальмонеллез, микоплазмоз, листериоз.

Парагрипп (*Sendai virus*) — это РНК-содержащий вирус, носителями вируса Сендай являются мыши, крысы, хомяки, иногда другие мелкие грызуны. Зооноз. Заразен среди крыс. Передается через дыхательные пути как воздушно-капельным, так и контактным путем. Гибель поголовья не возникает. Вирус неустойчив во внешней среде. Клиническая картина смазанная. Распространен по всему миру.

Сальмонеллез (*Salmonella spp.*) — заболевание передается алиментарным путем. Выявлен в Северо-Западном округе. Крысы могут быть бессимптомными носителями. Клиническая картина яркая. Заболевание заканчивается летально в половине случаев. Повсеместно распространено, поражает многие виды животных, опасно и для человека. Летальность среди людей до 20%. После контакта с больным животным руки очень тщательно моют, клетку дезинфицируют 5% эмульсией креолина и только через 6 ч повторно тщательно моют горячей водой с дезинфицирующим средством, затем хорошо просушивают. Устойчив в окружающей среде.

Микоплазмоз (*Mycoplasma pulmonis*) распространен повсеместно. По статистике до 60% декоративных крыс являются бессимптомными носителями микоплазмоза, но при снижении иммунитета появляются смазанные клинические признаки. Для постановки диагноза требуются специфические методы лабораторной диагностики. Полное выздоровление наступает редко, заболевание переходит в хроническую форму. Летальность от заболевания может быть до 20%. Заражение контактное и воздушно-капельное. Не передается другим животным и человеку.

Листериоз (*Listeria monocytogenes*) очень опасен для человека. Умирают до 20% зараженных людей. Распространяется дикими грызунами повсеместно. Выделяется в окружающую среду с калом. Заражение алиментарное, контактное, трансмиссивное. Клиническая картина у животных смазанная. Если наступает самовыздоровле-

Таблица 7

Значения составляющих риска (S, O, D)		
Составляющие риска	Значимость	Баллы
S Тяжесть вреда последствий	Катастрофическая (гибель поголовья 80–100%, высокая контагиозность для людей, тяжелые поражения, гибель 50–100%, длительное бессимптомное носительство с выделением возбудителя в окружающую среду)	5
	Критическая (гибель поголовья 50–80%, антропозооноз, вызывает тяжелое заболевание у людей с гибелью до 50%)	4
	Серьезная (гибель поголовья 20–50%, антропозооноз. Люди болеют, но смерть не наступает)	3
	Низкая (гибель поголовья до 20%, заболевание может перейти в хроническую форму, зооноз, люди заражаются редко)	2
	Незначительная (зооноз, условно-патогенный возбудитель, гибель не наступает)	1
O Вероятность возникновения опасности	Очень часто (распространен повсеместно, передача воздушно-капельным, алиментарным путем, патоген устойчив в окружающей среде, нужны специфичные средства для дезинфекции)	5
	Часто (выявлен в Северо-Западном округе, часто встречается у диких и домашних животных, заражение контактным, трансмиссивным путем, патоген неустойчив в окружающей среде)	4
	Иногда (выявлен на территории РФ, но не в Северо-Западном округе)	3
	Редко (выявлен в ближнем зарубежье)	2
	Практически невозможна (патоген отсутствует на территории РФ и близлежащего зарубежья)	1
D Вероятность выявления опасности	Очень низкая (симптомы отсутствуют, требуются специфические методы лабораторной диагностики)	5
	Низкая (симптомы слабо выражены, требуются специфические методы лабораторной диагностики)	4
	Средняя (симптомы смазаны, специфические методы лабораторной диагностики)	3
	Удовлетворительная (клиническая картина яркая, требуется микроскопия образцов)	2
	Высокая (клиническая картина специфическая)	1

Таблица 8

Определение категории риска

Патоген/заболевание	S	O	D	ПЧР = S × O × D	Категория риска
Вирус Сендай	1	5	3	15	Несущественный
Сальмонеллез	4	5	2	40	Приемлемый
Микоплазмоз	2	5	3	30	»
Листерииоз	4	5	3	60	Значительный

Таблица 9

Категории риска

Приоритетное число риска, баллы	Категория риска
Ниже 20	Несущественный
21–40	Приемлемый
41–70	Значительный
71 и выше	Неприемлемый

Таблица 10

Программа МЗЖ

Патоген/заболевание	Периодичность*
Сальмонеллез	1 раз в год
Микоплазмоз	1 раз в год
Листерииоз	1 раз в 6 мес

Примечание. * Более 40 баллов ПЧР — 1 раз в 6 мес, 21–40 баллов — 1 раз в год.

ние, то в течение 45 дней продолжается бессимптомное носительство с выделением возбудителя в окружающую среду. Инкубационный период до 2 нед.

Рассчитайте приоритетное число риска (ПЧР) для каждого патогена/заболевания. На основании данных табл. 7 определите значение составляющих риска (S, O, D).

Внесите баллы значимости риска по составляющим и определите категорию риска (табл. 8).

В соответствии с данными табл. 9 определите категорию риска.

В табл. 10 внесите информацию по воздействию на риск. На основании оценки рисков разработайте программу мониторинга здоровья животных (МЗЖ).

Задача 2

Оцените риск и составьте программу мониторинга здоровья лабораторных животных

Условия

Популяция лабораторных яванских макак проживает на территории питомника в Северо-Западном регионе России с рождения, животных из других регионов не завозят. Международные рекомендации по мониторингу макак рекомендуют проводить исследования на герпес вирус В, болезнь Эбола, туберкулез, оспу обезьян.

Герпес вирус В (*Herpesvirus saimiri*) — болят макаки, может заразиться человек. Протекает бессимптомно у 70–80% макак-резусов. При стрессе симптомы яркие. При появлении симптомов погибает до 80% поголовья. Легко заражаются от человека.

		Значения составляющих риска (S, O, D)	
Составляющие риска	Значимость	Баллы	
S Тяжесть вреда последствий	Катастрофическая (гибель поголовья 80–100%, высокая контагиозность для людей, тяжелые поражения, смерть 50–100%, длительное бессимптомное носительство с выделением возбудителя в окружающую среду)	5	
	Критическая (гибель поголовья 50–80%, антропозооноз, вызывает тяжелое заболевание у людей со смертельным исходом до 50%)	4	
	Серьезная (гибель поголовья 20–50%, антропозооноз. Люди болеют, но смерть не наступает)	3	
	Низкая (гибель поголовья до 20%, заболевание в хронической форме, зооноз, люди заражаются редко)	2	
	Незначительная (зооноз, условно-патогенный возбудитель, гибель не наступает)	1	
O Вероятность возникновения опасности	Очень часто (распространен повсеместно, передача воздушно-капельным путем, патоген устойчив в окружающей среде, нужны специфические средства для дезинфекции)	5	
	Часто (выявлен в Северо-Западном округе, часто встречается у диких и домашних животных, заражение алиментарным путем, патоген неустойчив в окружающей среде)	4	
	Иногда (выявлен на территории РФ, но не в Северо-Западном округе, животные заражаются контактным путем)	3	
	Редко (выявлен в ближнем зарубежье, заражение контактным путем)	2	
	Практически невозможно (заболевание отсутствует на территории РФ и близлежащего зарубежья, передача трансмиссивным, половым, трансплацентарным путем)	1	
D Вероятность выявления опасности	Очень низкая (симптомы отсутствуют, требуются специфические методы лабораторной диагностики)	5	
	Низкая (симптомы слабо выражены, требуются специфические методы лабораторной диагностики)	4	
	Средняя (симптомы смазаны, специфические методы лабораторной диагностики)	3	
	Удовлетворительная (клиническая картина яркая, требуется микроскопия образцов)	2	
	Высокая (клиническая картина специфическая)	1	

Таблица 12

Определение категории риска

Патоген/заболевание	S	O	D	ПЧР = S × O × D	Категория риска
Герпес вирус В	5	2	2	20	Несущественный
Болезнь Эбола	5	1	2	10	»
Туберкулез	4	5	3	60	Значительный
Оспа обезьян	2	4	2	16	Несущественный

Таблица 13

Категории риска

Приоритетное число риска, баллы	Категория риска
Ниже 20	Несущественный
21–40	Приемлемый
41–70	Значительный
71 и выше	Неприемлемый

Таблица 14

Программа МЗЖ

Патоген/заболевание	Периодичность*
Туберкулез	1 раз в 6 мес

Примечание. * Более 40 баллов ПЧР — 1 раз в 6 мес, 21–40 баллов — 1 раз в год.

содержали как домашних животных. Выделение возбудителя начинается в разгар болезни. По разным данным, умирают до 50% заболевших людей. Больных обезьян рекомендовано забивать. Клиническая картина смазанная. Для постановки диагноза необходимы специфические методы диагностики. Пути передачи воздушно-капельный, контактный.

Оспа обезьян (*Orthopoxvirus*) — антропозооноз. Человек при заболевании не умирает, у макак гибель до 30%. Клиническая картина яркая. Передается контактно, алиментарно. Зарегистрировано в Африке, США, Англии, Азии. Два случая заболевания в России. Одно из них недавно зафиксировано в Санкт-Петербурге.

Рассчитайте ПЧР для каждого патогена/заболевания. На основании данных табл. 11 определите значение составляющих риска (S, O, D).

Внесите баллы значимости риска по составляющим и определите категорию риска (табл. 12).

В соответствии с данными табл. 13 определите категорию риска.

В табл. 14 внесите информацию по воздействию на риск. На основании оценки рисков разработайте программу МЗЖ.

Летальность у человека при заболевании достигает 70%. Выздоровевшие единичные больные остаются инвалидами. Макаки заражаются в течение жизни. Путь передачи контактный. Распространен в Африке, Азии.

Болезнь Эбола (*Ebola virus disease*) — антропозооноз. Клиническая картина яркая. Эндемичен для Центральной Африки. При заражении люди умирают в 70% случаев. Может быть бессимптомное носительство как у макака, так и у людей. Передается трансмиссивно и контактно. Есть эффективная вакцина.

Туберкулез (*Mycobacterium tuberculosis*) — антропозооноз. Обезьяны заражаются от людей так же, как и люди от обезьян. Проходит бессимптомно до нескольких лет, распространен повсеместно, в том числе регистрировался в РФ у обезьян, которых

Значения составляющих риска (S, O, D)

1. Определите тяжесть вреда последствий (S)

При повышении температуры в помещениях содержания лабораторных животных до 30 °С у животных наблюдается стрессовое состояние, животные принимают лежачее положение, не реагируют на раздражители, кожная складка расправляется очень медленно. Гибель поголовья маловероятна.

Значимость	Баллы
Катастрофическая (гибель более 50% поголовья)	5 <input type="checkbox"/>
Критическая (ухудшение состояния лабораторных животных/гибель до 50% поголовья)	4 <input type="checkbox"/>
Серьезная (одышка, выраженное снижение активности, сниженный тургор)	3 <input checked="" type="checkbox"/>
Низкая (незначительное снижение двигательной активности, вялость, увеличение потребности в питье)	2 <input type="checkbox"/>
Незначительная (отсутствие клинических проявлений)	1 <input type="checkbox"/>

2. Определите вероятность возникновения опасности (O)

За последние 3 года в регионе систематически наблюдалась аномальная жара в летний период. С июня по август температура держалась в диапазоне 20–27 °С, часто достигая 30 °С в дневное время. Необходимо определить вероятность повышения температуры выше 26 °С **в летнее время**.

Значимость	Баллы
Очень часто (вероятность возникновения выше 95%)	5 <input checked="" type="checkbox"/>
Часто (вероятность возникновения 81–95%)	4 <input type="checkbox"/>
Время от времени (вероятность возникновения 41–80%)	3 <input type="checkbox"/>
Редко (вероятность возникновения 21–40%)	2 <input type="checkbox"/>
Практически невозможно (вероятность возникновения менее 20%)	1 <input type="checkbox"/>

3. Определите вероятность выявления опасности (D)

Регистрация температуры в помещениях осуществляется сотрудниками 2 раза в сутки с помощью поверенных приборов утром и вечером. Фиксация температуры проводится в листах регистрации температуры. Клинический осмотр животных проводится ежедневно.

Значимость	Баллы
Высокая (вероятность выявления выше 95%)	1 <input type="checkbox"/>
Удовлетворительная (вероятность выявления 81–95%)	2 <input checked="" type="checkbox"/>
Средняя (вероятность выявления 46–80%)	3 <input type="checkbox"/>
Низкая (вероятность выявления 21–45%)	4 <input type="checkbox"/>
Очень низкая (вероятность выявления менее 20%)	5 <input type="checkbox"/>

Задача 3

Оцените риск «Ухудшение состояния лабораторных животных при повышении температуры содержания выше 26 °С» до и после проведения предупреждающих мероприятий

Условия

Допустимая температура содержания лабораторных крыс 20–26 °С. В регионе нахождения испытательного центра (Северо-Западный регион) зафиксировано резкое аномальное повышение температуры атмосферного воздуха до 27 °С. Метеоцентр сообщает о возможном повышении температуры до 30 °С в следующие 10 дней. В связи с отсутствием системы охлаждения поступающего воздуха в помещении содержания лабораторных животных на текущий момент температура повысилась до 26 °С (до верхней границы нормы) (табл. 15).

Рассчитайте приоритетное число риска (ПЧР): $ПЧР = S \times O \times D = 3 \times 5 \times 2 = 30$.

Определите категорию риска (табл. 16) по значению ПЧР (см. табл. 15).

Предложите перечень предупреждающих мероприятий по устранению риска (табл. 17).

Оцените остаточный риск после проведения предупреждающих мероприятий (табл. 18).

Определите категорию риска по значению ПЧР (табл. 19).

Задача 4

Оцените риск «Загрязнение поилок для поения лабораторных животных» до и после проведения предупреждающих мероприятий

Условия

В испытательном доклиническом центре разработана процедура мытья и дезинфекции поилок для поения лабораторных животных, которая состоит из двух этапов:

1 этап — механическая очистка (очистка под проточной водой с использованием ершика и дезинфицирующего средства);

2 этап — автоматическое мытье в моечной машине (ополаскивание при температуре 70 °С).

Для выполнения 1 этапа необходимо двое сотрудников. На смену вышел только один сотрудник, так как второй сотрудник внезапно заболел.

На основании данных табл. 20 определите значение составляющих риска (S, O, D).

Таблица 16

Категории риска	
Приоритетное число риска, баллы	Категория риска
Ниже 10	Несущественный
11–40	Приемлемый
41–70	Значительный
71 и выше	Неприемлемый

Категория риска: Приемлемый риск

Таблица 17

Перечень предупреждающих мероприятий

Предупреждающие мероприятия
Установка охлаждающего оборудования в вентиляционную систему
Установка вентилятора в помещение
Увеличение кратности влажной уборки
Увеличение кратности замен клеток и поилок с водой у животных

Таблица 18

Остаточный риск после проведения предупреждающих мероприятий

Значимость	ПЧР	Баллы
Катастрофическая (гибель более 50% поголовья)		5 <input type="checkbox"/>
Критическая (ухудшение состояния лабораторных животных/гибель до 50% поголовья)		4 <input type="checkbox"/>
Серьезная (одышка, выраженное снижение активности, сниженный тургор)	Тяжесть вреда последствий (S)	3 <input checked="" type="checkbox"/>
Низкая (незначительное снижение двигательной активности, вялость, увеличение потребности в питье)		2 <input type="checkbox"/>
Незначительная (отсутствие клинических проявлений)		1 <input type="checkbox"/>
Очень часто (вероятность возникновения выше 95%)	Вероятность возникновения опасности (O)	5 <input type="checkbox"/>
Часто (вероятность возникновения 81–95%)		4 <input type="checkbox"/>
Время от времени (вероятность возникновения 41–80%)		3 <input type="checkbox"/>
Редко (вероятность возникновения 21–40%)		2 <input type="checkbox"/>
Практически невозможно (вероятность возникновения менее 20%)		1 <input checked="" type="checkbox"/>
Высокая (вероятность выявления выше 95%)	Вероятность выявления опасности (D)	1 <input type="checkbox"/>
Удовлетворительная (вероятность выявления 81–95%)		2 <input checked="" type="checkbox"/>
Средняя (вероятность выявления 46–80%)		3 <input type="checkbox"/>
Низкая (вероятность выявления 21–45%)		4 <input type="checkbox"/>
Очень низкая (вероятность выявления менее 20%)		5 <input type="checkbox"/>
Итого:	$S \times O \times D$	6

Таблица 19

Категории риска

Приоритетное число риска, баллы	Категория риска
Ниже 10	Несущественный
11–40	Приемлемый
41–70	Значительный
71 и выше	Неприемлемый

Категория остаточного риска: _____ Несущественный риск

Таблица 20

Значения составляющих риска (S, O, D)

1. Определите тяжесть вреда последствий (S)

В связи с отсутствием достаточного количества человек на смене часть поилок (около половины) может поступить в моечную машину без проведения предварительной механической очистки. Соответственно часть поилок пройдет ненадлежащую обработку и в итоге может быть загрязнена биологическими (размножение в воде бактерий и паразитов) и/или химическими агентами (остатки дезинфицирующих средств). Загрязненная вода может потерять вкусовую ценность и вызвать отказ животных от питья. Все это может привести к заболеваниям животных. При этом часть животных находится в эксперименте, что потенциально может повлечь искажение экспериментальных данных.

Значимость	Баллы
Катастрофическая (влияние на состояние здоровья лабораторных животных/гибель)	5 <input type="checkbox"/>
Критическая (влияние на состояние здоровья лабораторных животных в исследовании и искажение экспериментальных данных)	4 <input checked="" type="checkbox"/>
Серьезная (ухудшение состояния лабораторных животных)	3 <input type="checkbox"/>
Низкая (временное ухудшение состояния лабораторных животных без влияния на их жизненные показатели и экспериментальные данные)	2 <input type="checkbox"/>
Незначительная (влияние на лабораторных животных и процедуры не выражено)	1 <input type="checkbox"/>

2. Определите вероятность возникновения опасности (O)

Один сотрудник может качественно обработать только половину поилок за смену, все поилки также может обработать один сотрудник, но менее качественно. Оценить вероятность того, что часть поилок будет обработана не качественно.

Значимость	Баллы
Очень часто (вероятность возникновения выше 95%)	5 <input checked="" type="checkbox"/>
Часто (вероятность возникновения 81–95%)	4 <input type="checkbox"/>
Время от времени (вероятность возникновения 41–80%)	3 <input type="checkbox"/>
Редко (вероятность возникновения 21–40%)	2 <input type="checkbox"/>
Практически невозможно (вероятность возникновения менее 20%)	1 <input type="checkbox"/>

3. Определите вероятность выявления опасности (D)

Загрязнение поилок проводят визуально. Осмотр поилок проводится при наборе в них воды. Микробиологические загрязнения визуально не определить.

Значимость	Баллы
Высокая (вероятность выявления выше 95%)	1 <input type="checkbox"/>
Удовлетворительная (вероятность выявления 81–95%)	2 <input type="checkbox"/>
Средняя (вероятность выявления 46–80%)	3 <input type="checkbox"/>
Низкая (вероятность выявления 21–45%)	4 <input checked="" type="checkbox"/>
Очень низкая (вероятность выявления менее 20%)	5 <input type="checkbox"/>

Рассчитайте приоритетное число риска (ПЧР): $PЧР = S \times O \times D = 4 \times 5 \times 4 = 80$.

Определите категорию риска по значению ПЧР (табл. 21).

Предложите предупреждающие мероприятия по устранению риска:

- вызов работника из другой смены;
- прием на работу дополнительного сотрудника.

Оцените остаточный риск после проведения предупреждающих мероприятий (табл. 22).

Определите категорию риска по значению ПЧР (табл. 23).

Таблица 21

Категории риска	
Приоритетное число риска, баллы	Категория риска
Ниже 10	Несущественный
11–40	Приемлемый
41–70	Значительный
71 и выше	Неприемлемый

Категория риска: Неприемлемый риск

Задача 5

Оцените риск и выберите поставщика корма

Условия

В связи с прекращением деятельности производителя корма для лабораторных животных было принято решение о смене поставщика. В результате проведенного мониторинга производителей корма для лабораторных животных выбраны 3 потенциальных поставщика. Поставляемая продукция определена как критичная, так как оказывает прямое влияние на процесс проведения доклинических исследований. При этом наши потребности на 3 мес на 10 000 голов составляют 4,5 т.

В связи с этим были проведены выездные аудиты, в ходе которых выявлены следующие проблемы.

- **Поставщик 1** — отсутствие регистрации параметров температуры и влажности на складе готовой продукции, ненадлежащее санитарное состояние складских помещений; стоимость 1 т составляет 25 000 руб.
- **Поставщик 2** — состав корма покрывает потребности лабораторных животных в питательных веществах только на 85%; стоимость 1 т составляет 30 000 руб.
- **Поставщик 3** — минимальная партия, изготавливаемая и отпускаемая производителем, составляет 5 т со сроком хранения 3 мес. Стоимость 1 т составляет 35 000 руб. Излишки потребуются утилизировать или перепродать.

Идентификация рисков: завышенные затраты на кормление лабораторных животных.

Метод СВА

Анализ затрат и выгод (Cost and Benefit Analysis, CBA) позволяет взвесить общую ожидаемую стоимость изменений в денежном выражении против их общих ожидаемых выгод, чтобы выбрать наиболее эффективный или наиболее выгодный вариант.

Таблица 22

Значения составляющих риска (S, O, D)		
Значимость	ПЧР	Баллы
Катастрофическая (влияние на состояние здоровья лабораторных животных/гибель)	Тяжесть вреда последствий (S)	5 <input type="checkbox"/>
Критическая (влияние на состояние здоровья лабораторных животных в исследовании и искажение экспериментальных данных)		4 <input checked="" type="checkbox"/>
Серьезная (ухудшение состояния лабораторных животных)		3 <input type="checkbox"/>
Низкая (временное ухудшение состояния лабораторных животных, без влияния на жизненные показатели животных и экспериментальные данные)		2 <input type="checkbox"/>
Незначительная (влияние на лабораторных животных и процедуры не выражено)		1 <input checked="" type="checkbox"/>
Очень часто (вероятность возникновения выше 95%)	Вероятность возникновения опасности (O)	5 <input type="checkbox"/>
Часто (вероятность возникновения 81–95%)		4 <input type="checkbox"/>
Время от времени (вероятность возникновения 41–80%)		3 <input type="checkbox"/>
Редко (вероятность возникновения 21–40%)		2 <input type="checkbox"/>
Практически невозможно (вероятность возникновения менее 20%)		1 <input type="checkbox"/>
Высокая (вероятность выявления выше 95%)	Вероятность выявления опасности (D)	1 <input type="checkbox"/>
Удовлетворительная (вероятность выявления 81–95%)		2 <input type="checkbox"/>
Средняя (вероятность выявления 46–80%)		3 <input type="checkbox"/>
Низкая (вероятность выявления 21–45%)		4 <input checked="" type="checkbox"/>
Очень низкая (вероятность выявления менее 20%)		5 <input type="checkbox"/>
Итого:	$S \times O \times D$	16

Таблица 23

Категория риска	
Приоритетное число риска, баллы	Категория риска
Ниже 10	Несущественный
11–40	Приемлемый
41–70	Значительный
71 и выше	Неприемлемый

Категория остаточного риска: _____ **Приемлемый риск**

Чистая приведенная стоимость (NPV) рассчитывается по формуле:

$$NPV = PVB - PVC,$$

где *PVB* — текущая стоимость выгод;

PVC — текущая стоимость всех затрат.

Таблица 24

Текущая стоимость выгод			
Показатель	Поставщик 1	Поставщик 2	Поставщик 3
Стоимость 100 голов	30 000 руб.		
Прогнозируемая выбраковка	30%	10%	5%
Объем поголовья	10 000 голов		
Стоимость корма при перепродаже	—	—	20 000 руб./т
Текущая стоимость выгод	?	?	?

Таблица 25

Текущая стоимость всех затрат			
Показатель	Поставщик 1	Поставщик 2	Поставщик 3
Стоимость 1 т, руб.	25 000	30 000	35 000
Стоимость закупки	4,5 т = 112 500 руб.	4,5 т = 135 000 руб.	5 т = 175 000 руб.
Стоимость лабораторного анализа корма	20 000 руб.	Не требуется	Не требуется
Риск потери всей партии в результате неудовлетворительного качества	10% (11 250 руб.)	0%	0%
Стоимость утилизации корма (излишки или плохое качество)	10 000 руб.	Не требуется	10 000 руб.
Увеличение расхода корма	Нет	1,17 раза (22 950 руб.)	Нет
Необходимость закупки дополнительных нутриентов	»	15 000 руб.	»
Увеличение трудозатрат на кормление	»	5% (2000 руб./мес)	»
Логистические расходы при перепродаже излишков	»	Нет	5000 руб.

Таблица 26

Показатель	Решение задач			
	Поставщик 1	Поставщик 2	Поставщик 3	
			Утилизация	Перепродажа
Текущая стоимость выгод, руб.	$(30\,000/100) \times (10\,000 - 30\%) = 2\,100\,000$	$(30\,000/100) \times (10\,000 - 10\%) = 2\,700\,000$	$(30\,000/100) \times (10\,000 - 5\%) = 2\,850\,000$	$(30\,000/100) \times (10\,000 - 5\%) + 20\,000 \times 0,5 = 2\,860\,000$
Текущая стоимость всех затрат, руб.	$25\,000 \times 4,5 + 20\,000 + 11\,250 + 10\,000 = 153\,750$	$30\,000 \times 4,5 + 22\,950 + 15\,000 + 2\,000 \times 3 = 178\,950$	$35\,000 \times 5 + 10\,000 = 185\,000$	$35\,000 \times 5 + 5\,000 = 180\,000$
Чистая приведенная стоимость, руб.	1 947 250	2 521 050	2 665 000	2 680 000

Положительный *NPV* подразумевает, что инвестиции являются целесообразными (табл. 24–26).

Задача 6

Оцените риск для проведения научно-исследовательской работы неблагоприятного события: «во время проведения исследования ломается биохимический анализатор»

Условия

- Вероятность проведения корректного анализа в случае поломки анализатора составляет 1%.
- Вероятность того, что пробы можно заморозить на длительный период, составляет 70%.
- Вероятность экстренного ремонта в течение срока годности проб составляет:
 - 80% для замороженных проб;
 - 10% для незамороженных проб.
- Вероятность того, что ваши пробы смогут проанализировать в сторонней организации:
 - 80% для замороженных проб;
 - 5% для незамороженных проб.

Оцените вероятности в соответствии с методом анализ «дерева» событий ЕТА для следующих исходов:

- вы сможете самостоятельно провести анализ вовремя;
- вы сможете провести анализ после ремонта;
- сторонняя организация сможет провести анализ;
- пробы невозможно будет проанализировать.

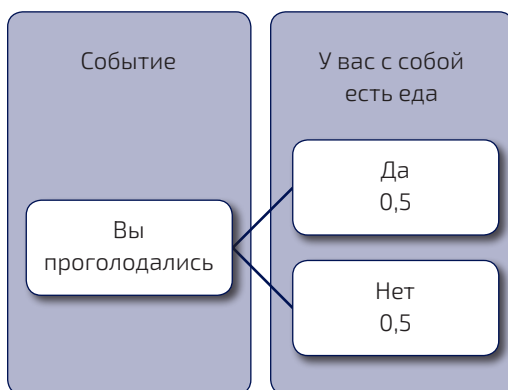


Рис. 6. Пример расставления вероятностей

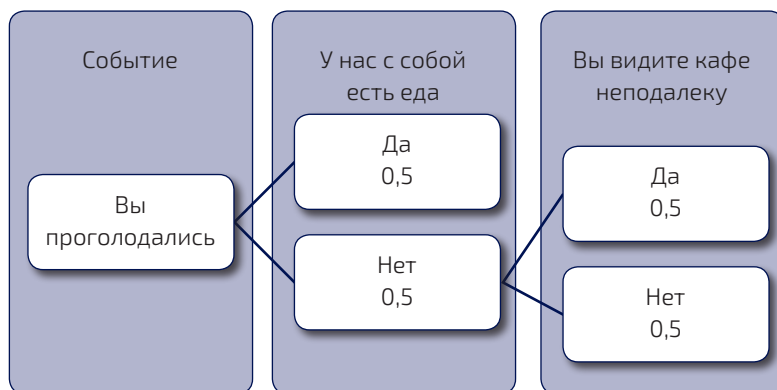


Рис. 7. Пример заполнения веток событий

Для проведения данного анализа расставьте в бланке вероятности для каждого события (для удобства сразу выразите вероятности в долях от единицы), например (рис. 6, 7):

Так заполните все ветки событий, учитывая их взаимосвязь.

После того, как вы заполните все вероятности, сформулируйте исходы в конце каждой цепи:

- вы проголодались — у вас есть с собой еда (да) → **вы смогли перекусить**;
- вы проголодались — у вас есть с собой еда (нет) — вы видите неподалеку кафе (да) → **вы можете пообедать в кафе**.

Перемножьте вероятности каждого из событий в каждой цепочке:

$$\text{вы можете пообедать в кафе} = 0,5 \times 0,5 = 0,25.$$

Таким образом, вы получите вероятности всех возможных исходов. В сумме эти вероятности должны составить единицу.

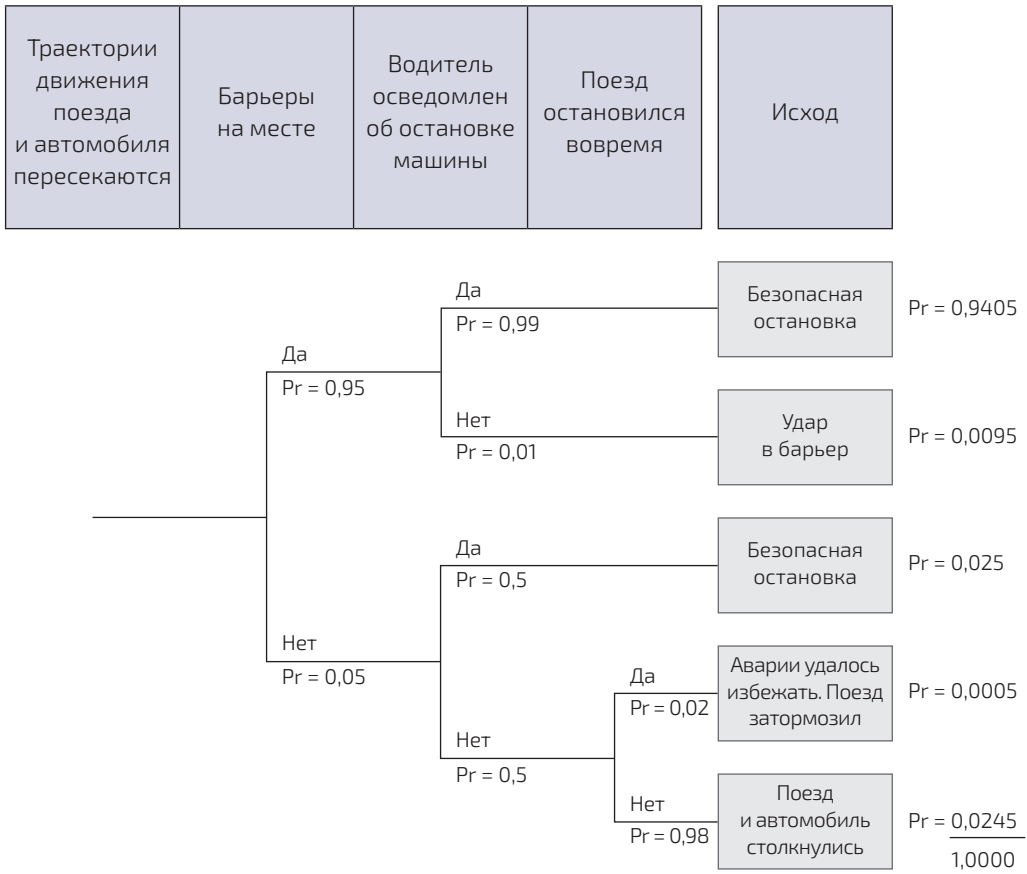


Рис. 8. Пример анализа «дерева» событий

Предложите действия, направленные на получение более благоприятного исхода.

1.
2.
3.

ETA (анализ «дерева» событий) — это графический метод, который представляет взаимоисключающие последовательности событий, следующих за исходным событием, в соответствии с функционированием или нефункционированием различных систем, разработанных для уменьшения их последствий. Может применяться как качественно, так и количественно (рис. 8).

Построение «дерева» событий начинается с выбора исходного события, которым может быть инцидент, например, нарушение электроснабжения. Затем

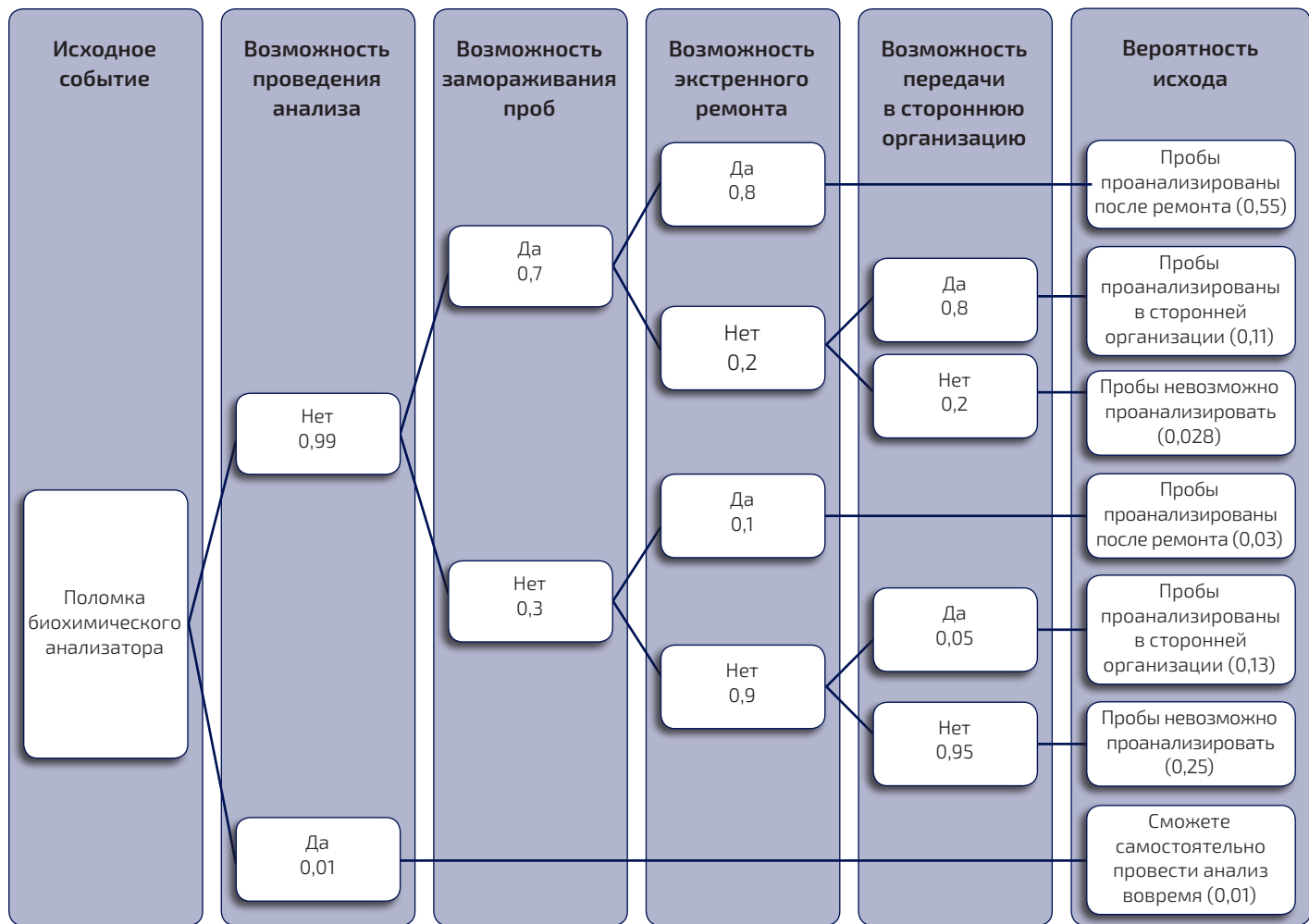


Рис. 9. Заполненное «дерево» событий

Таблица 27

Вероятность исходов				
Исход	Вы сможете самостоятельно провести анализ вовремя	Вы сможете провести анализ после ремонта	Сторонняя организация сможет провести анализ	Пробы невозможно будет проанализировать
Вероятность	0,01	0,58	0,12	0,28

последовательно перечисляют имеющиеся функции или системы, направленные на уменьшение результатов. Для каждой функции или системы чертят линию, чтобы отобразить их исправное состояние или отказ. Конкретная вероятность отказа может быть указана для каждой линии при наличии количественной оценки данной условной вероятности, полученной, например, экспертным методом или при анализе «дерева» неисправностей. Таким образом моделируются различные способы развития событий, начиная с исходного случая.

Следует учесть, что вероятности на «дереве» событий весьма условны, например, вероятность функционирования системы пожаротушения не является вероятностью, полученной из испытаний при нормальных условиях, а становится вероятностью функционирования в условиях пожара, вызванного взрывом. Каждый путь событий, проходящий по древовидной схеме, отображает вероятность того, что все входящие в него события произойдут. Поэтому частота результата представлена произведением отдельных условных вероятностей и частоты исходного события, при условии, что различные события являются независимыми.

Решение задачи указано на рис. 9 и в табл. 27.

Мастер-класс имел исключительный успех. С неподдельным интересом в доступной игровой форме сотрудники различных организаций решали ситуационные задачи. Была развернута занимательная животрепещущая дискуссия.

Ниже, в качестве примера приведен (сокращенный) реестр рисков АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (табл. 28). Документированная процедура по управлению рисками сводится к оформлению карты оценки рисков (КОР) на каждый известный риск.

О чем может рассказать приведенный реестр?

1. Кодировка КОР свидетельствует, что для управления рисками существует документированная процедура и документооборот является управляемым.
2. Название КОР отражает суть риска, описанного в документе.
3. Владелец риска — наиболее заинтересованное лицо в уменьшении всех вероятных потерь при возникновении данного риска.
4. Остаточный риск — необходимая информация для контроля за рисками, где остаточный риск сохраняется в значимой категории.
5. Самое главное — документ [стандартная операционная процедура (СОП), инструкция и т.д.], в котором описано воздействие и/или контроль риска!

Формировать реестр рисков можно различными путями в зависимости от того, как работает система менеджмента качества и риск-менеджмента в организации.

Таблица 28

Реестр рисков АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (в сокращении)

Код КОР	Название КОР	Владелец риска	Дата создания КОР	Остаточный риск в соответствии с КОР	Документ (СОП, инструкция и т.д.), в котором описано воздействие и/или контроль риска
АБ — аналитика и биохимия					
АБ-1/1	Использование пластиковой бутылки для хранения дистиллированной воды	Фамилия И.О.	04.12.19	Отсутствует	Инструкция АБ-6
АБ-2/1	Установление сроков хранения стерильной воды, приготовленной в лаборатории микробиологии	То же	06.11.20	»	Инструкция МБЛ-14
Т — техническая служба					
Т-2/1	Нарушения электроснабжения	Фамилия И.О.	28.09.21	Отсутствует	Руководство по непрерывности деятельности
Т-5/1	Влияние потока воздуха, вибрации и электромагнитного излучения (близкорасположенных центрифуг) на работу аналитических весов	То же	04.07.23	»	Инструкции группы ПР на весы и центрифуги
Т-11/1	Нарушения в работе приточно-вытяжной системы	»	30.09.19	Приемлемый	Руководство по управлению инженерными сетями

Окончание таблицы 28

Код КОР	Название КОР	Владелец риска	Дата создания КОР	Остаточный риск в соответствии с КОР	Документ (СОП, инструкция и т. д.), в котором описано воздействие и/или контроль риска
Ж — животные					
Ж-2	Пищевая депривация лабораторных животных	Фамилия И.О.	04.12.19	Отсутствует	СОП ЭЖ-15 Пищевая депривация
Ж-3/1	Возникновение устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам	То же	22.08.22	»	Инструкция ББ-3
ЭК — экология					
ЭК-1/1	Качество дезинфекции уборочного инвентаря	Фамилия И.О.	04.12.19	Отсутствует	Инструкция П-4
ЭК-4/1	Оценка выбросов загрязняющих веществ в атмосферу	То же	27.08.21	»	Руководство по системе экологического менеджмента
ЭК-5/1	Оценка сбросов загрязняющих веществ со сточными водами в систему канализации	»	27.08.21	»	

Возможен плановый порядок, когда все имеющиеся риски по возможности предусмотрены и документированы, а также порядок документирования рисков по мере их возникновения.

Заключение

Существование в организации, выполняющей доклинические исследования, системы менеджмента качества, которая реализует процессный подход и управление рисками, позволит получить исчерпывающий реестр рисков событий. Такой подход представляет собой наиболее эффективный процесс принятия решений для высшего руководства, максимально сокращает финансовые, материальные и временные потери, а также позволяет оптимизировать работу испытательного центра в целом.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Трифонов Ю.В., Трифонов В.Ю., Брыкалов С.М. Процессный подход при идентификации рисков организации // Экономика, предпринимательство и право. 2020. Т. 10. № 12. С. 3139–3148. DOI: [10.18334/epp.10.12.111229](https://doi.org/10.18334/epp.10.12.111229).

Риск-ориентированный подход к созданию лекарственного препарата

<https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-2-8-s2>

М. В. Карлина¹, В. М. Косман¹, Р. А. Абрамович², О. А. Арчакова³, Т. Н. Барыбина¹, Ю. В. Власенко⁴, Л. С. Гузеватых⁵, Е. Л. Ковалева⁶, Т. Н. Комаров³, А. В. Корель⁷, Д. В. Кощиц¹, В. Р. Нягматуллина⁸, Е. М. Петрова¹, Д. А. Рождественский⁹, А. Ю. Романенко¹, А. В. Стрелкова¹⁰, И. И. Тернинко¹¹, А. У. Тулегенова¹²

¹ АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,

² ФГБОУ ВПО МГУ им. М. В. Ломоносова,

³ ООО «Центр фармацевтической аналитики»,

⁴ ООО «Ферринг Продакшн»,

⁵ АО «Р-Фарм»,

⁶ ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России,

⁷ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный технический университет»,

⁸ ООО «ПФК «Алиум» (входит в ООО «Биннофарм Групп»),

⁹ Евразийская экономическая комиссия,

¹⁰ ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России,

¹¹ Испытательная лаборатория Центра контроля качества лекарственных средств ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России,

¹² РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств и медицинских изделий» КМ и ФК МЗ РК

Введение

Создание лекарственного препарата — это многостадийный, сложный и дорогостоящий процесс. **На первом этапе разработки** лекарственного препарата (ЛП) проводят поиск фармакологически активных соединений, скрининг или моделирование новых веществ, способных оказать фармакологическое воздействие. Активность потенциальных кандидатов в лекарственные средства может быть изучена как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*. По полученным результатам выбирают и оптимизируют наиболее перспективное соединение, доказывают его фармакологическую активность и безопасность, изучают стабильность. На этом же этапе проводят разработку технологии получения активной фармацевтической субстан-

ции (АФС) и ее стандартизацию. Необходимо отметить, что лишь 2% объектов, участвующих в исследованиях, оказываются действенными активными веществами, удовлетворяющими всем требованиям регулятора, предъявляемым к АФС (Булгаков А.Л., Космаков Р.В., 2018).

Второй этап — фармацевтическая разработка (ФР) ЛП в рациональной лекарственной форме (ЛФ) на основе выбранной АФС. По окончании стадии ФР проводят внедрение (масштабирование и трансфер технологии и аналитических методик) ЛП на производство и осуществляют опытно-промышленное и далее промышленное производство ЛП. Одновременно начинают формирование регистрационного досье на ЛП (Басевич А.В. и соавт., 2019).

По итогам этапа лабораторной ФР должен быть выбран состав ЛП, определена оптимальная технология его получения, разработаны и валидированы соответствующие аналитические методики, начата подготовка проекта нормативной документации, изучена стабильность лабораторных образцов и проведен выбор первичной упаковки для ЛП. Хорошо спланированная ФР позволяет получить ЛП соответствующего качества. Применение современной концепции Quality-by-Design (QbD, «качество путем разработки»), заявленной в руководстве ICH Q8 «Фармацевтическая разработка» [ICH Topic Q8 (R2), Басевич А.В. и соавт. 2019], позволяет минимизировать риск производства некачественного ЛП. В рамках данной концепции при разработке должен быть заложен целевой профиль качества препарата (quality target product profile, QTPP) — заранее сформулированные характеристики качества ЛП, которые в идеале будут достигнуты, чтобы обеспечить запланированный уровень качества с учетом безопасности и эффективности ЛП. Обычно целевой профиль качества препарата включает информацию о критериях качества ЛП для таких характеристик, как внешний вид, активность, дозировка, содержание примесей, микробиологическая чистота и др. Необходимо отметить, что подтверждение сохранения активности АФС в ходе лабораторного этапа разработки ЛФ не является обязательным и его, как правило, не проводят для опытных (неитоговых) вариантов составов создаваемого ЛП. Все доклинические исследования обычно осуществляют уже для одного окончательного состава ЛП. Однако в ходе ФР новый продукт должен приобрести свойства, удовлетворяющие основным требованиям к ЛП, — безопасность, эффективность и качество (Рожнова С. А., Цыпкина А.В., 2017).

После окончания лабораторной стадии ФР необходимо осуществление трансфера технологии на производство и воспроизведение параметров качества АФС и ЛФ при переходе от лабораторных к опытно-промышленным и промышленным партиям. Трансфер технологии и аналитических методик из лаборатории на производство достаточно длительный и трудоемкий процесс.

На основе спецификации качества ЛП на конец срока годности с учетом требований фармакопеи финализируют проект нормативной документации по качеству ЛП, предназначенного для контроля его качества в пострегистрационный период.

Третьим этапом создания ЛП являются комплексные **доклинические исследования** (ДКИ), в ходе которых должна быть доказана его безопасность и эффективность. ДКИ включают изучение фармакокинетики, специфической активности (*in vitro* и *in vivo*), детализацию механизма действия, изучение токсичности (острая, хроническая и специфические виды токсичности) и др.

Четвертый этап — это клинические исследования препарата, которые проходят в несколько стадий и могут длиться в среднем от 3 до 7 лет. Фаза I — включает исследования преимущественно на здоровых добровольцах (изучение переносимости, безопасности, фармакокинетики и фармакодинамики); фаза II — изучение эффективности ЛП, определение дозирования и схемы приема, оценка профиля безопасности ЛП у пациентов с конкретным заболеванием; фаза III — преимущественно мультицентровые, подтверждающие исследования всех аспектов эффективности и безопасности применения на больших группах пациентов; фаза IV — пострегистрационные клинические исследования, выходящие за рамки создания ЛП, однако входящие в его жизненный цикл.

На каждом из вышеперечисленных этапов могут возникать разнообразные проблемные ситуации, вопросы, ответы на которые напрямую не описаны ни в одном соответствующем руководстве. Каждый из этапов характеризуется своими рисками, которые могут приводить к увеличению сроков разработки ЛП, повышению материальных затрат или вообще к невозможности вывода его на рынок. В целом риски при создании новых ЛП крайне высоки (Булгаков А.Л., Космаков Р.В., 2018).

Учитывая, что разработка ЛП требует огромных инвестиций, а также остро стоит вопрос об ускорении ФР и быстром выводе ЛП на рынок в связи с текущей политической обстановкой, необходимо применение риск-ориентированного подхода к каждому этапу создания ЛП для минимизации негативных последствий реализации возможных рисков, создания безопасного и эффективного ЛП и успешного вывода его к конечному потребителю. Внедрение риск-ориентированного подхода способствует повышению эффективности выполнения работ, позволяет сократить текущие и перспективные затраты на создание ЛП, поскольку заблаговременно выявленные и правильно оцененные риски, своевременное их предотвращение способны создавать синергетический эффект в виде уменьшения субъективных оснований риска.

Управление рисками представляет собой процесс, связанный с идентификацией, анализом рисков и принятием решений, направленных на максимизацию положительных и минимизацию отрицательных последствий наступления рискованных событий, а также их профилактику.

Дмитрий Анатольевич Рождественский («Доклиническая разработка высокотехнологичных, гибридных и воспроизведенных лекарственных препаратов», Евразийская экономическая комиссия — ЕЭК) подробно представил в своем докладе ряд аспектов по ФР высокотехнологичных, гибридных и воспроизведенных ЛП, основные жизненные этапы которой включают доступ на рынок, обеспечение качества и производство. Характеризуя этап доступа на рынок, докладчик напомнил классификацию ЛП в рамках раздела биологических ЛП (пояснив понятия ЛП: референтный, биоаналогичный, генотерапевтический, на основе соматических клеток, тканеинженерный ЛП), рассказал о документах, рассматриваемых ЕЭК и регулирующих продукт-специфические требования к высокотехнологичным, гибридным и воспроизведенным ЛП, а также о специальных процедурах доступа на рынок ЕАЭС (раздел VII правил регистрации) и роли специальных консультативных органов союза в отношении регистрации ЛП такого рода. Он также упомянул о роли фармакопеи союза и правил GMP для производства и оценки качества в аспекте создания новых общих фармакопейных статей (ОФС) и разделов, связанных со стандарти-

зацией высокотехнологичных, гибридных и воспроизведенных ЛП. Характеризуя этап ФР гибридных и воспроизведенных ЛП, докладчик представил схему (рис. 1), систематизирующую направленность и объем ДКИ в зависимости от разрабатываемого ЛП (гибридный, оригинальный, воспроизведенный). Возможными источниками новых примесей при создании воспроизведенного ЛП по сравнению с оригинальным могут быть изменения синтеза (исходные компоненты, интермедиаты, катализаторы и продукты синтеза), рецептуры (путь деградации, элементы упаковки и укупорки), новый путь производственного процесса (посторонние загрязнители). Эти риски обуславливают необходимость углубленных исследований по изучению примесей (рис. 2, а) и особенности планирования ФР (рис. 2, б) ЛП на основе скопированной молекулы.

Риски поиска и/или синтеза АФС

Поиск фармакологически активных соединений, скрининг или моделирование новых веществ, способных оказать фармакологическое воздействие, может быть связан с такими рисками, как отличие реально происходящих процессов направленного химического синтеза от теоретически ожидаемых и планируемых, что может обуславливать необходимость дополнительных этапов по изменению выбранных ранее химических реакций, положенных в основу синтеза, введению дополнительных экспериментов по расшифровке структур полученных продуктов, стадий и манипуляций по очистке целевого продукта. В случае выделения активных компонентов из природного сырья одним из наиболее распространенных рисков может быть потеря биологической активности индивидуальных компонентов по сравнению с уникальными естественными сбалансированными комплексами растительного, животного, минерального происхождения. Создание ЛП на основе природного сырья может быть связано с рисками естественной изменчивости его компонентного состава (действующих веществ) в зависимости от места и условий произрастания и обитания, сбора и обработки (Косман В.М. и соавт., 2010, 2013, Galambosi B. и соавт., 2016, 2016a, Elameen A. и соавт., 2020).

Начальные этапы синтеза АФС и всесторонней характеристики полученного продукта, прежде всего с помощью различных физико-химических методов, могут обуславливать необходимость применения широкого спектра уникального, дорогостоящего и редкого аналитического и испытательного оборудования. Возникает риск отсутствия необходимого оборудования у разработчика, который может повлечь невозможность проведения необходимых испытаний и характеристики целевого продукта, выбор неверной дальнейшей стратегии экспериментальной работы (отброшены, не выявлены перспективные объекты или, наоборот, не установлены критические свойства тех объектов, с которыми принято решение продолжить работу). В связи с этим актуальным и удобным инструментом решения ряда вопросов становится создание и привлечение к работе центров коллективного пользования (ресурсных центров), оснащенных разнообразным современным оборудованием и укомплектованных штатом квалифицированных специалистов, которых можно привлечь для решения конкретных задач. Об одном из таких центров

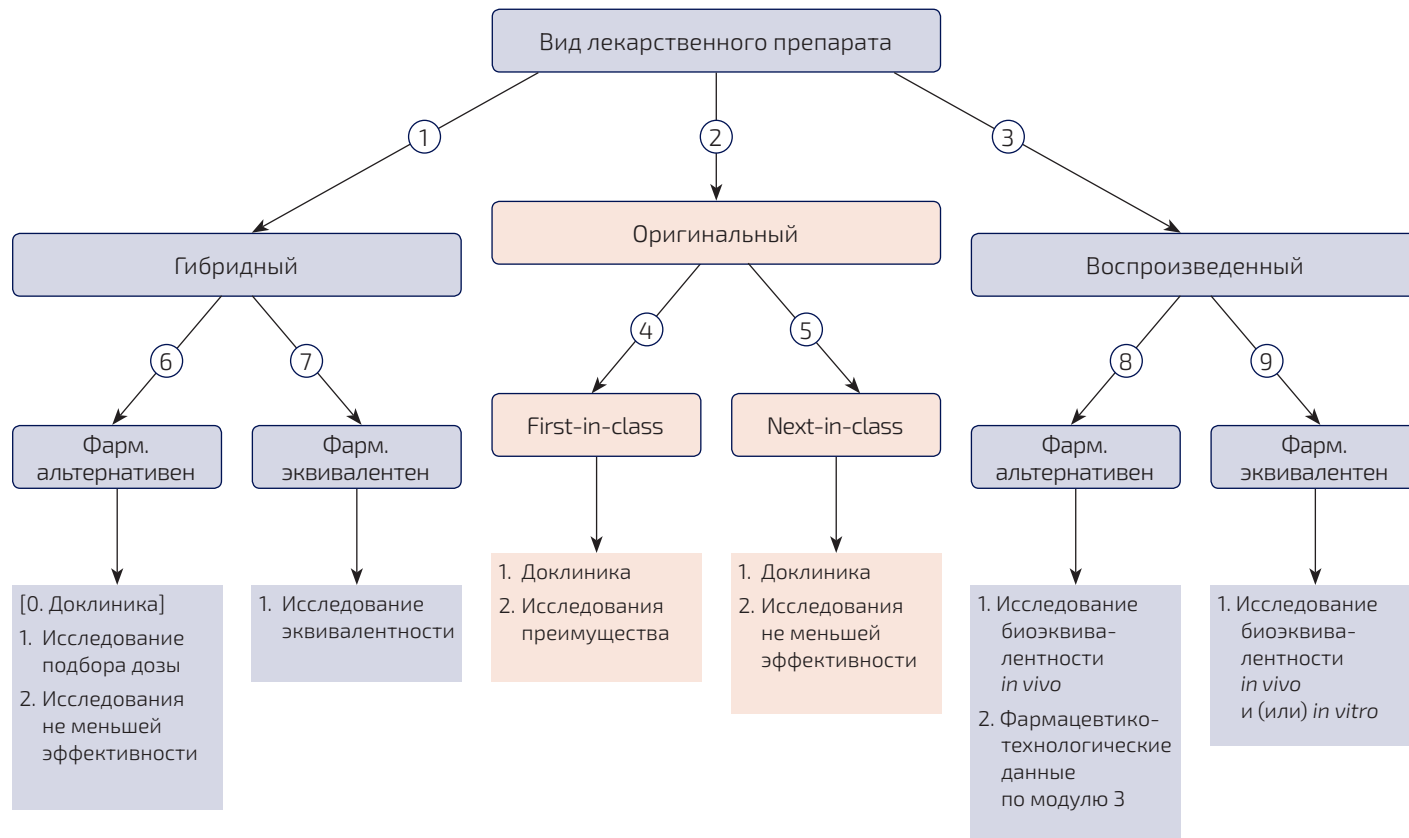
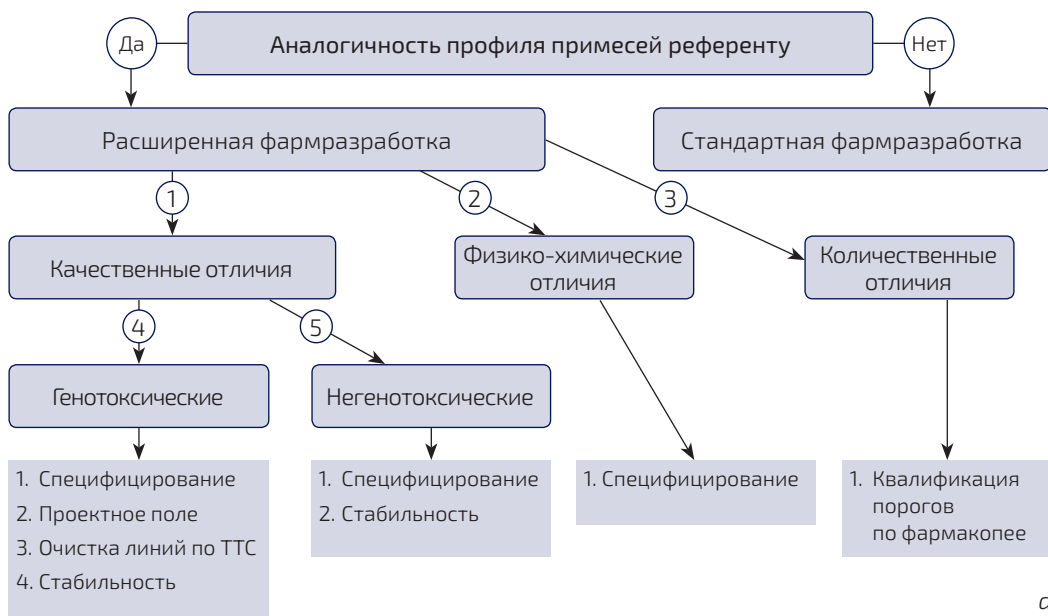
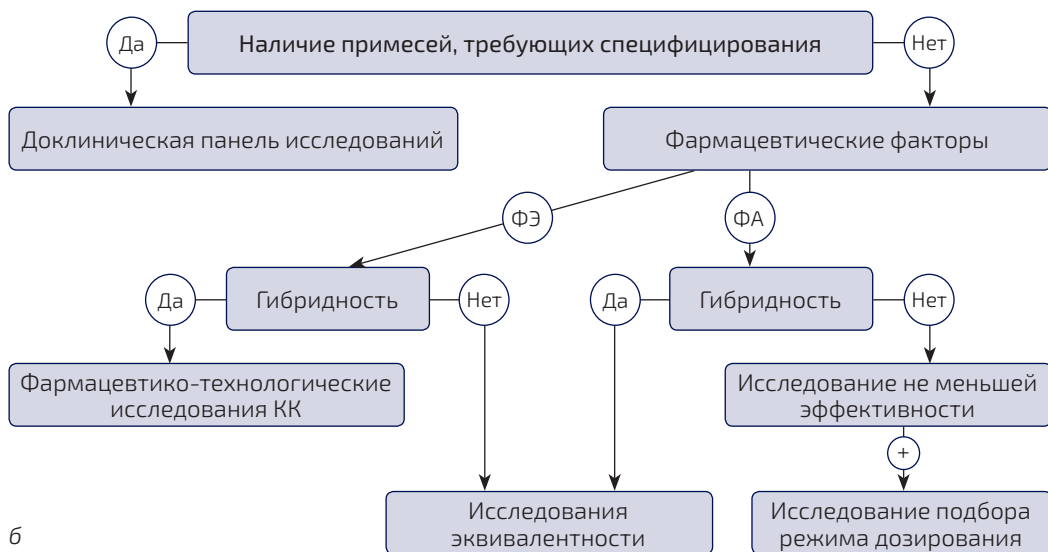


Рис. 1. Общие подходы к объему ДКИ при создании ЛП (фарм. — фармацевтически, в остальном сохранена терминология автора)



а



б

Рис. 2. Алгоритм действий по изучению примесей (а) и планирование исследований (б) при разработке скопированной молекулы (ТТС — порог токсической угрозы, ФЭ — фармацевтически эквивалентен, ФА — фармацевтически альтернативен, КК — критерии качества)

рассказала Елена Владимировна Флисюк в своем докладе («[Центр коллективного пользования — основа фундаментальных и прикладных исследований СПФХУ](#)», ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), посвященном Центру коллективного пользования (ЦКП) СПФХУ, составляющему основу фундаментальных и прикладных исследований, выполняемых как самим университетом, так и его партнерами. Стоит подчеркнуть, что на всех этапах ФР, трансфера технологий и аналитических методик значимая роль принадлежит специалистам, участвующим в процессах с передающей и принимающей стороны. Важны их квалификация, владение профессиональными знаниями в конкретной области, умение находить гибкие и действенные решения и взаимопонимание. С этой точки зрения важным становится аспект квалификации персонала и уровня его подготовки и образования, который также активно обсуждается в профессиональной литературе различного уровня (Елшибекова К.М. и соавт., 2014, Сидоров К.О., Марченко Н.В., 2016, Буденкова Е.А., Литвинова Т.М., 2020).

Еще одна группа рисков может быть связана с изменением производителя или поставщика АФС в связи с изменениями рынка, уходом компаний с внутренних рынков различных стран, в том числе Российской Федерации, в связи с санкциями или иными причинами, или, наоборот, появлением новых производителей при смене ориентации рынка на получение внутренней продукции вместо ее ввоза из-за рубежа (Сидоров К.О. и соавт., 2017).

Риски, характерные для этапа фармацевтической разработки

Одним из первых рисков на стадии лабораторной ФР является неверный подбор вспомогательных веществ в составе лекарственной формы, а также неверный выбор технологии получения ЛФ. При этом может произойти снижение эффективности, а также усиление токсических свойств и побочных эффектов ЛП.

Для минимизации вероятности возникновения данной проблемы необходимы определение критических параметров сырья и детальный анализ качества АФС и вспомогательных веществ от разных производителей с целью подбора поставщиков качественных ингредиентов, а также детальное изучение возможного взаимодействия компонентов, используемых в составе разрабатываемого ЛП.

На этапе выбора состава и технологии целесообразно использование концепции Quality by Design, или «программируемого качества». Это углубленный подход к ФР, основанный на надежных научных данных и управлении рисками для качества продукции, который изложен в руководящих указаниях Международной конференции по гармонизации требований к регистрации лекарственных препаратов (ICH): Q8 (R2) «Фармацевтическая разработка»; Q9 «Управление рисками для качества»; Q10 «Фармацевтическая система качества»; Q11 «Разработка и производство активных фармацевтических субстанций — химических и биотехнологических/биологических соединений». При реализации подхода QbD должен быть выбран целевой профиль качества препарата (ЦПКП) — предварительный обзор характеристик ЛП, которые должны быть обеспечены для достижения желаемого его качества, в том числе с точки зрения его безопасности и эффективности. Обычно ЦПКП включает

информацию о критериях качества ЛП для таких характеристик, как внешний вид, дозировка, содержание или активность действующих веществ, наличие примесей и их содержание, микробиологическая чистота и других, а также сведения об их допустимых пределах, обеспечивающих достижение ЦПКП. Уже на этапе планирования работ по ФР должны быть выбраны критические показатели качества (КПК) — те свойства (физические, химические, технологические, биологические и др.), которые должны соответствовать установленным допускам, диапазону или характеру распределения для достижения желаемого уровня качества. Также должны быть установлены критические параметры процесса — параметры технологического процесса, вариабельность которых может сказаться на качестве целевого продукта, а следовательно, эти установленные параметры должны подлежать контролю для получения продукции желаемого качества.

О применении риск-ориентированного подхода при ФР на примере создания твердых лекарственных форм воспроизведенных ЛП (дженериков) рассказала Дарья Викторовна Кошиц («Риск-ориентированный подход/использование подхода Quality-by-Design при фармацевтической разработке на примере создания ТЛФ препаратов-дженериков», АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»). Воспроизведенный ЛП (дженерик) должен иметь тот же количественный и качественный состав действующих веществ и ту же ЛФ, что и оригинальный ЛП. Вспомогательные вещества могут быть другими (как качественно, так и количественно), однако это может быть одной из причин снижения качества дженериков по сравнению с оригинальными ЛП. Использование тех же вспомогательных веществ позволяет уменьшить количество прорабатываемых вариантов, время разработки и максимально приблизиться к оригинальному ЛП, а также снизить вероятность ошибок при разработке, которая и так высока из-за отсутствия в открытом доступе оригинальной технологии производства. На конкретном примере автор продемонстрировал последовательность ФР, состоящую из формулирования ЦПКП (рис. 3), включающего характеристики качества ЛП, которые в идеале будут достигнуты, и последовательных экспериментальных шагов по его достижению с учетом возникающих рисков и путей их снижения или устранения.

По материалам работы может быть проведена занятная аналогия ФР воспроизведенного ЛП (дженерика) с приготовлением вкусного блюда (табл. 1).

В целом риск-ориентированный подход эффективен для разработки воспроизведенных ЛП, что позволяет сократить затраты времени и материальных средств на более поздних этапах и обеспечить высокую сопоставимость разрабатываемого продукта с оригинальным ЛП. Аналогичный подход был применен авторами для обоснования состава и технологии двухкомпонентных суппозиторий (Смехова И.Е. и соавт., 2022).

Основной тенденцией последних лет является расширение спектра разрабатываемых биологических ЛП, предназначенных для профилактики, диагностики и лечения инфекционных, аллергических, аутоиммунных, опухолевых заболеваний (Олефир Ю.В. и соавт., 2016). Принципы QbD, сочетающие понимание продукта (product understanding) и понимание [процессов (process understanding)], применимы и к таким сложным воспроизведенным биологическим ЛП (биосимилярам), как например, пембролизумаб (Jaffar-Aghaei M. и соавт., 2022).

Показатели целевого продукта	Объект
Лекарственная форма	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой
Профиль растворения	Немедленное высвобождение
Способ применения	Перорально
Дозировки действующих веществ	150 мг, АФС
Условия хранения и срок годности	При температуре 20–25 °С в оригинальной упаковке (пачке), 2 года; после вскрытия банки использовать в течение 4 мес
Упаковка	По согласованию со спонсором
Показатели качества лекарственного препарата (ПК + КПК)	Идентификация/подлинность
	Прочность
	Распадаемость
	Внешний вид/описание
	Растворение
	СТКР
	Однородность дозирования (расчетно-массовый способ)
	Количественное определение

Рис. 3. Пример целевого профиля качества препарата:
 АФС — активная фармацевтическая субстанция, СТКР — сравнительный тест кинетики растворения, КПК — критические показатели качества

Таблица 1

Аналогия фармацевтической разработки
 воспроизведенного ЛП (дженерика) и приготовления вкусного блюда

Оригинальный ЛП защищен патентом	Оригинальный ЛП не защищен патентом хотя бы в одной стране
Известен качественный состав, но неизвестен количественный. Технология неизвестна	Известен качественный и количественный состав, но неизвестна технология
Например, в некоем очень вкусном блюде есть яйца, вода, соль, сахар и мука. Из такого сочетания компонентов можно приготовить бесконечное число блюд. Однако все же трудно «попасть» в оригинальное блюдо, необходимо хотя бы обладать этим оригинальным блюдом (иметь оригинальный рецепт), чтобы узнать его свойства (настоящий вкус)	Например, в очень вкусном блюде 93% муки, 5% яиц, 1% соли, 0,01% сахара, а вода присутствует в остаточных количествах. Да это же яичная лапша! Можно применить технологию, уже использованную когда-то для спагетти, и сравнить результат

Римма Александровна Абрамович («Опыт разработки биомедицинских клеточных продуктов и биологических препаратов», ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова») в своем докладе поделилась опытом разработки биомедицинских клеточных продуктов и биологических ЛП. Она охарактеризовала этапы разработки и производства биомедицинских клеточных ЛП и ЛП «клеточной терапии без клеток» (cell-free cell therapy) и продемонстрировала возможности для их практической реализации на базе научно-производственного участка Института регенеративной медицины, являющегося уникальной площадкой для наработки ЛП, стимулирующих регенерацию органов и тканей, для клинических исследований.

Еще одним подходом, который может сократить сроки исследований и в ряде случаев способствует экономии ресурсов, является реверс-инжиниринг. Деформуляция (реверс-инжиниринг) — системный подход, включающий оценку свойств референтного ЛП (RLD — Reference Listed Drug), АФС для определения оптимальной стратегии разработки безопасного и эффективного воспроизведенного ЛП. Для анализа могут быть использованы различные методы от простых, например, титриметрия, до сложных методов идентификации и количественного определения входящих в состав ЛП веществ (высокоэффективная жидкостная хроматография, газовая хроматография, атомно-абсорбционная спектроскопия и т.д.). Применению реверс-инжиниринга на ранних этапах ФР был посвящен доклад Виктории Рафаэлевны Нягматуллиной («Применение реверс-инжиниринга на ранних этапах фармацевтической разработки», ООО «ПФК «Алиум», входит в ООО «Биннофарм Групп»). Обратный инжиниринг фармацевтических составов может потребоваться по различным причинам, связанным, например, с дизайном и разработкой общей рецептуры, проблемами со стабильностью, вопросами безопасности и/или интеллектуальной собственности (соблюдение патентных прав). При разработке и выводе на рынок первого дженерика важным преимуществом является скорость ФР. В состав реверс-инжиниринга могут входить такие элементы, как расшифровка количественной формулы (в практике встречается очень редко и направлено преимущественно на расшифровку качественной формулы), характеристика АФС в твердом состоянии, идентификация производственного процесса, определение материалов упаковки, химико-аналитические характеристики (количественное определение, родственные примеси, остаточные органические растворители, профиль растворения, pH и др.). Автор привела алгоритм, схематично отражающий дерево решений для выполнения реверс-инжиниринга (рис. 4) (сформулировала предполагаемые результаты, заключающиеся в целостном понимании характеристик референтного ЛП, его состава, физических свойств, характеристик АФС в его составе, являющихся основой для формирования ЦПКП. Алгоритм включает также получение знаний о свойствах и характеристиках АФС как из литературно-документальных источников, так и полученных инструментальным путем, являющихся основой управления рисками дальнейшей формуляции дженерика. Кроме положительных сторон данного подхода, автором отмечены и его недостатки, заключающиеся в отсутствии унифицированной стратегии исследований и необходимости индивидуального подхода к каждому ЛП, что может существенно увеличивать сроки и стоимость разработки.

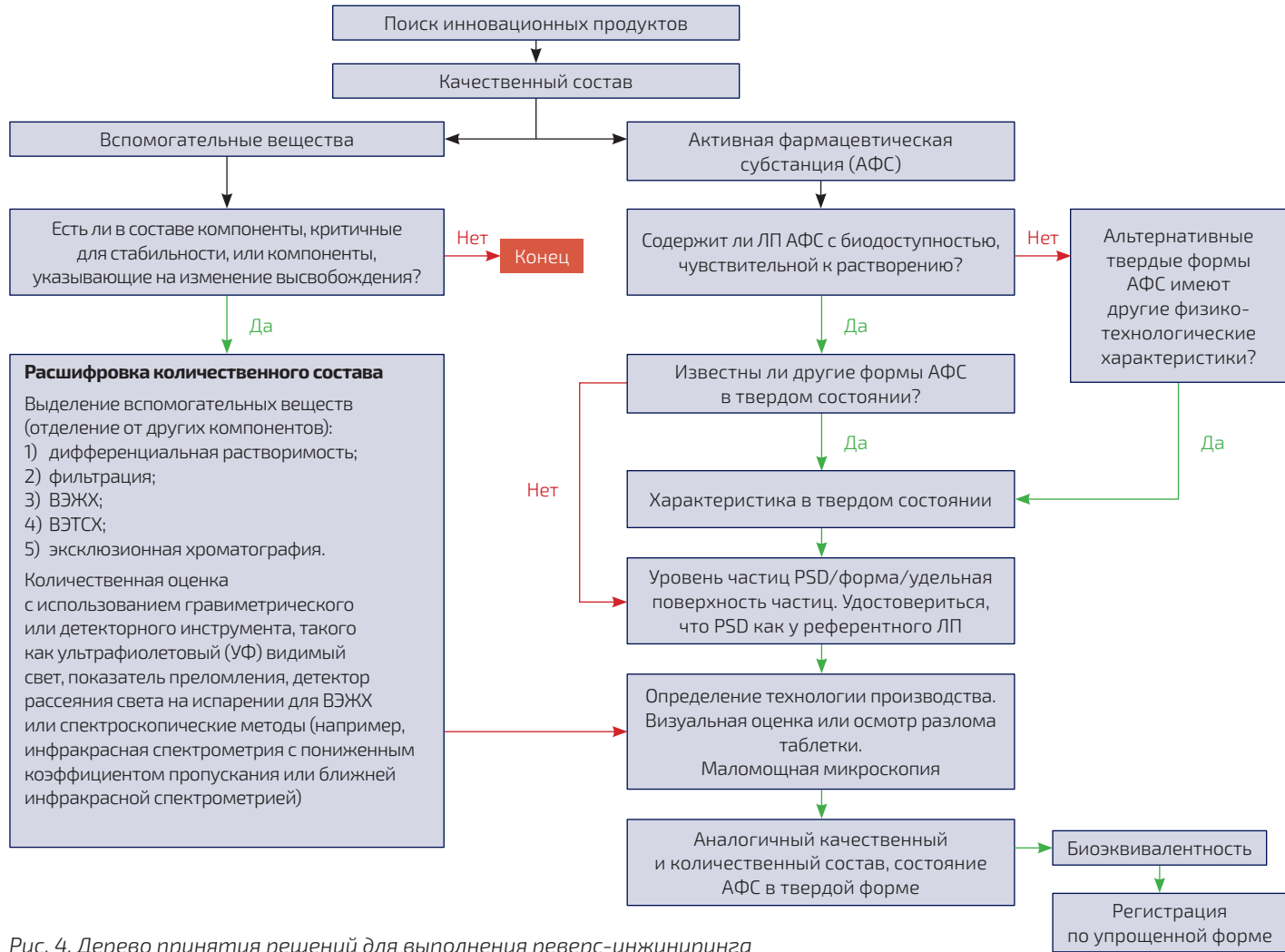


Рис. 4. Дерево принятия решений для выполнения реверс-инжиниринга

Уже на стадии лабораторного этапа ФР необходимо понимать, насколько эффективен будет разрабатываемый ЛП. И здесь возникает вопрос о методах оценки разрабатываемых составов для выбора оптимального. Исследования на животных на этом этапе не являются обязательными и, как правило, разработчик обходится исследованиями *in vitro* (Ампилогова И.Н. и соавт., 2023). Так, для твердых лекарственных форм для перорального применения незаменимым инструментом при изучении составов ЛП является тест кинетики растворения, который позволяет в первом приближении оценить и предсказать будущую биодоступность лекарственного вещества из ЛФ. Для других ЛФ могут быть реализованы иные подходы.

Оценке цитотоксичности и проницаемости назальных составов *in vitro* был посвящен доклад Юлии Васильевны Власенко («Оценка цитотоксичности и проницаемости назальных составов *in vitro* как инструмент скрининга, трансляционность», ООО «Ферринг Продакшн»). Автор рассказала о формулировании подхода Efficacy and Safety by Design, основанного на тезисе о том, что эффективность и безопасность ЛП определяются свойствами действующего вещества и состава. На стадии ФР цитотоксичность состава компонентов и состава в целом может быть маркером потенциального местно-раздражающего действия, а биодоступность оценена по сочетанию физико-химических свойств компонентов, способа введения, анатомических и физиологических особенностей тест-системы и параметров окружающей среды. Тесты проницаемости *in vitro* с использованием искусственных мембран (например, целлюлозных) и/или релевантных клеточных линий могут быть использованы для целей скрининга составов, так как позволяют сократить ресурсные затраты, а также соблюсти принцип 3R. Исследования проницаемости на искусственных мембранах и клетках RPMI2650 показали схожие результаты (в относительных значениях), а тенденции, полученные в исследованиях проницаемости *in vitro* для составов назального применения, позволили спрогнозировать его биодоступность при введении в живой организм.

На этапе ФР важно изучать свойства не только АФС, но и вспомогательных веществ, а также возможность их использования в составе различных ЛФ. В докладе Анастасии Викторовны Корель («Аспекты выбора фармакологических точек приложения для хитозанпроизводных гелевых носителей, перспективных для медицинского применения», ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный технический университет») подробно изложены аспекты выбора фармакологических точек приложения для хитозанпроизводных гелевых носителей, перспективных для медицинского применения. Программа исследований хитозанпроизводных гелевых носителей включает исследования *in vitro* (электронная микроскопия и определение состава образцов материала, основных физико-химических характеристик материала — динамики набухания и деградации гелей при разных pH, температурных режимах и др., а также подбор способа стерилизации для максимально полного сохранения характеристик). Также необходимо оценить цитотоксическое влияние гелей на клеточные культуры животных и человека, на клеточный цикл и пролиферацию, определить эмиссию красителя-индикатора из геля при разных величинах и диапазонах pH. Потенциальные фармакологические точки приложения гелевых носителей (создание гелей для ран и для ЖКТ) определяют особенности необходимых экспериментов *in vivo*.

В ходе лабораторного этапа ФР должны быть выбраны методы контроля будущего ЛП, параметры качества и установлены критерии их приемлемости, а также разработан проект нормативной документации. Необходимо отметить, что такой показатель, как «родственные примеси», требует детального изучения и проработки. Инна Ивановна Тернинко («Родственные примеси в лекарственных средствах — «минное поле» фармацевтической разработки», испытательная лаборатория Центра контроля качества лекарственных средств ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) в своем докладе осветила наиболее острые вопросы, касающиеся родственных примесей в лекарственных средствах. Данному вопросу посвящен ряд отечественных и зарубежных регуляторных документов, в том числе утвержденные сравнительно недавно решением ЕАЭК №138 от 04.10.22 «Требования к проведению исследований (испытаний) лекарственных средств в части оценки и контроля содержания примесей». Автор подробно отразила вопросы, затронутые в данном документе, и некоторые аспекты практической реализации схемы принятия решений (рис. 5) в отношении идентификации и квалификации примесей в новых АФС. В рамках дискуссии был обсужден вопрос, является ли необходимым выделение и накопление примеси для проведения дополнительных токсикологических исследований, или целесообразнее использовать для этого обогащенный примесью образец АФС. Докладчик акцентировала внимание на отсутствии единства в подходе к оценке родственных примесей в рекомендациях ведущих мировых фармакопей и регуляторных документов (Британская, Американская, ГФ РФ, Руководство по надлежащей фармакопейной практике).

Цель трансфера технологии и аналитических методик на производственную площадку — передача информации о лекарственном средстве, процессе его производства и контроле качества в пределах одной производственной площадки или между производственными площадками, а также передача аналитических методик в лабораторию, которая будет выполнять серийный контроль (отдел контроля качества или иную лабораторию в случае передачи этой функции в рамках аутсорсинга). На основании указанной информации определяют параметры процесса производства, стратегию контроля качества ЛП и процесса его производства, подход к валидации процесса производства и непрерывного его улучшения. Трансфер предусматривает передачу процесса вместе с соответствующей документацией и профессиональными экспертными знаниями от передающей стороны к принимающей. Это систематизированная процедура, которую выполняют с целью передачи принимающей стороне документально оформленной информации и опыта, полученных во время ФР и/или выпуска лекарственных средств, в том числе передачи документации, информации о процессах производства, навыков и знаний от передающей стороны и практическое подтверждение способности принимающей стороны эффективно выполнять критические операции согласно передаваемой технологии в целях обеспечения прослеживаемости данного процесса для всех заинтересованных сторон и уполномоченных органов (экспертных организаций) [Рекомендация коллегии Евразийской экономической комиссии от 8 июня 2021 г. № 11 «О Руководстве по трансферу технологий и (или) аналитических методик при производстве лекарственных средств»]. Трансфер должен быть основан на принципах управления рисками для качества, основные показатели которого приведены в табл. 2.

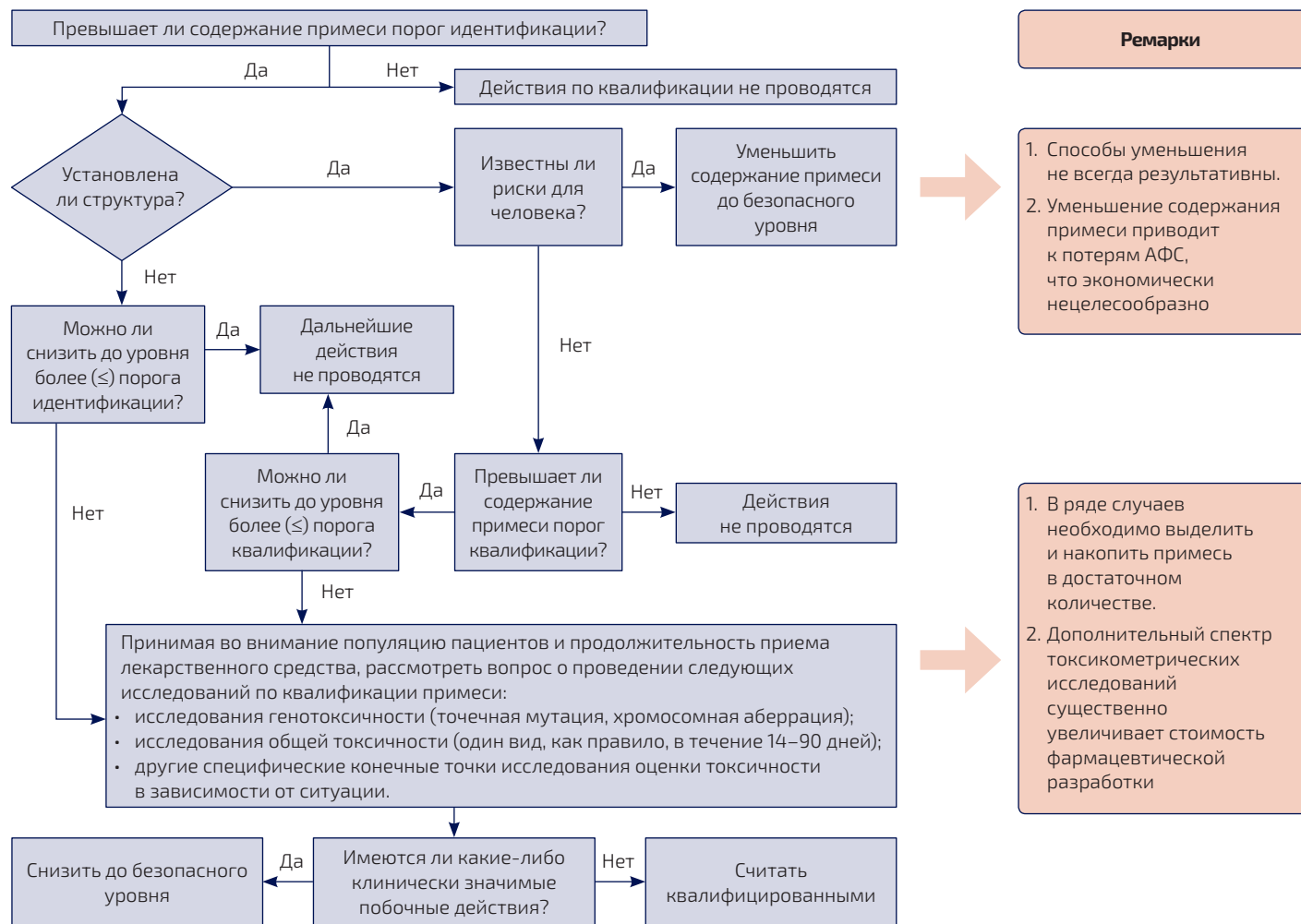


Рис. 5. Схема принятия решений в отношении идентификации и квалификации примесей в новых АФС с ремарками автора

Таблица 2

Показатели качества (аналитические методики), подвергающиеся трансферу

Показатель качества (вид испытания, методика)	АФС	Лекарственные формы						
		Твердые	Парентеральные	Ингаляции	Мягкие	Жидкие (суспензии)	Трансдер- мальные	Офталь- мологические
Количественное определение (активность)	+	+	+	+	+	+	+	+
Однородность дозированных единиц	—	+	+	+	+	+	+	+
Примеси (продукты разложения)	+	+	+	+	+	+	+	+
Растворение [скорость высвобождения, время растворения (диспергирования)]	—	+	+	—	+	+	+	—
Подлинность	+	+	+	+	+	+	+	+
Микробиологическая чистота	+	+	—	+	+	+	+	—
Соответствие дозы	—	—	—	+	—	—	—	—
Стерильность	—	—	+	—	—	—	—	+
Физические критерии	+	+	+	+	+	+	+	+
Остаточные количества активной фармацевтической субстанции (проверка очистки)	+	+	+	+	+	+	+	+

Риск-ориентированный подход к созданию лекарственного препарата

В современной научной литературе вопросу трансфера аналитических методик и технологии уделено достаточно много внимания (Кулешова С.И., 2017, Старчак Ю.А. и соавт., 2020, Шангареева Р., 2020, Эпштейн Н.А. 2021, 2022, Иванова А., 2023), однако различные детали, вопросы и тонкости остаются актуальными для дальнейшего обсуждения.

При переносе технологии получения ЛП на производство и воспроизведении параметров АФС и ЛФ при переходе от лабораторных к пилотным и промышленным партиям заданные параметры качества могут не воспроизводиться, может возникать необходимость корректировки состава и проведения дополнительных исследований (биодоступность *in vivo*, тест кинетики растворения); при получении опытно-промышленных серий ЛП может происходить снижение его качества, например, стабильности, безопасности и эффективности ЛФ. Масштабирование технологии может потребовать повторения доклинических и клинических исследований. Способы минимизации рисков, возникающих на этапе трансфера, — это «привязка» проекта к конкретному производству уже на этапе формулирования задачи по разработке ЛП, максимально широкое изучение возможного влияния на конечные свойства ЛП различных технологических факторов, что, безусловно, требует достаточно много времени и ресурсов. Основное требование к производителю лекарственных средств при трансфере технологий — сохранение качества выпускаемой продукции и соблюдение правил GxP при экономии материальных ресурсов, времени и площадей.

Доклад Анны Владимировны Стрелковой («Актуальные вопросы трансфера технологии лекарственных средств на примере процесса нанесения покрытия на таблетки», ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) был посвящен актуальным вопросам трансфера технологии лекарственных средств на примере процесса нанесения покрытия на таблетки. Основными видами трансфера технологий являются передача технологии от одного структурного подразделения другому (из лаборатории на производство или между производственными площадками) и масштабирование технологии (с изменением размера загрузки на одной единице оборудования или на новом оборудовании). Докладчик на конкретных примерах проанализировала причины, стадии возникновения и критичность различных дефектов продукции, проиллюстрировав их яркими и наглядными фотографиями. Классификация дефектов приведена на рис. 6. Представленные автором материалы свидетельствуют о многообразии рисков при трансфере даже одной технологической стадии.

Ардак Уринбасаровна Тулегенова в своем докладе («Трансфер аналитических методик как трансфера технологий: требования Фармакопеи ЕАЭС», РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств и медицинских изделий» КМ и ФК МЗ РК) рассказала о требованиях Фармакопеи ЕАЭС к трансферу аналитических методик, основная цель которых заключается в оценке аналитической эффективности передаваемой аналитической методики в лаборатории принимающей стороны. Он основан на анализе рисков, учитывает опыт и знания принимающей стороны, сложность испытываемого образца, спецификации, особенности методики, его проводят до начала или в процессе трансфера технологий. Автор акцентировала внимание на области распространения трансфера аналитических методик, условиях отказа от его проведения, связанных с персоналом

Дефект	Таблетирование	Нанесение пленочной оболочки
Целлюлит		+
Сколы открытые		+
Сколы закрытые	+	+
Залип/выемка	+	
Разрыв оболочки		+
Расслоение	+	
Разлом таблетки	+	+
Потертость		+
Слипшиеся таблетки		+
Пигментация		+
Разнотон		+
Царапина	+	+
Трещина	+	+
Налип/нарост/бородавка		+
Механическое включение	+	+

Рис. 6. Классификация дефектов по стадии возникновения

принимающей стороны и/или особенностями аналитической методики, областях ответственности передающей и принимающей сторон и их совместной ответственности, этапах практической процедуры трансфера аналитических методик, особенностях и типах его проведения, установлении критериев приемлемости, а также документирования трансфера (подготовка отчета, действия в случае выявления отклонений).

На этапе организации производства ЛП важным вопросом является возможность его совмещения с другими продуктами на одной производственной линии. В процессе производства возможно загрязнение (перекрестная контаминация) ЛП и АФС другими ЛП или АФС, если на производственном участке осуществляется производство разных наименований продукции. Основные причины перекрестной контаминации — перепутывание продукции, удержание остаточных количеств на критических контактирующих поверхностях оборудования, механический перенос с критических неконтактирующих поверхностей и воздушный перенос. Для минимизации рисков перекрестной контаминации производитель должен разработать мероприятия, позволяющие снизить риски до приемлемого уровня, и этот уровень должен быть научно обоснован. С этой целью для каждого лекарственного средства должна быть проведена оценка активности и токсикологиче-

ская оценка. Людмила Сергеевна Гузевых (АО «Р-Фарм») в своем докладе привела научные данные токсикологической оценки для подтверждения возможности совмещения продуктов на одной производственной линии, продемонстрировав подходы к измерению риска для здоровья пациента и установлению допустимых пределов воздействия (Health-based exposure limits, HBELs) на основе принципа обеспечения безопасности здоровья человека или животного, подвергающихся непреднамеренному воздействию лекарственного средства. Производитель проводит оценку потенциальной угрозы здоровью вследствие непреднамеренного пожизненного действия остаточных количеств лекарственного средства в условиях отсутствия ограничений, прописанных в инструкции по медицинскому применению, и при фармацевтическом и фармакологическом взаимодействии с другим лекарственным средством. Сложность проведения токсикологической оценки связана с необходимостью определения допустимых пределов воздействия по косвенным данным (на основании исследований, полученных с целью регистрации лекарственных средств по определенным показаниям) при отсутствии прямых исследований действия лекарственного средства, контаминированного остаточными количествами других лекарственных средств.

Все данные, полученные в ходе ФР и внедрения ЛП на производство, составляют основу 3 модуля общего технического документа. О фармакопейных требованиях и подготовке материалов регистрационного досье в части качества лекарственных средств рассказала в своем докладе Елена Леонардовна Ковалева (Центр экспертизы и контроля ГЛС ФГБУ НЦ ЭСМП). Докладчик остановилась на вопросах гармонизации и противоречий ведущих мировых фармакопей по ряду процедур и испытаний, напомнила о том, что фармакопея устанавливает минимальный уровень требований, которым должно удовлетворять лекарственное средство. При регистрации ЛП в государствах — членах ЕАЭС могут потребоваться дополнительные испытания, регламентированные регуляторными документами (государственной фармакопеей) конкретного государства, что необходимо учитывать при подготовке соответствующего регистрационного досье.

Риски, характерные для этапа доклинических исследований, имеющих аналитическую часть

При оценке безопасности ЛП основным возможным риском на данном этапе выступает риск получения некачественного досье (неполные данные об эффективности, биомиметизме, механизме действия, фармакокинетике), следствием данного риска является возврат досье на доработку, потеря времени и дополнительные затраты из-за непродуманного дизайна ДКИ, неквалифицированного исполнения, а также отсутствия единого координирующего центра. Тщательное планирование ДКИ (обоснованный выбор моделей патологии, релевантных видов животных, их количества, методов статистической обработки данных и т.д.) является одним из ключевых моментов минимизации данного риска.

Елизавета Михайловна Петрова («Риск контаминации биопроб в исследованиях токсикокинетики», АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ») рассказала о возможных

рисках контаминации биопроб в исследованиях токсикокинетики и путях их минимизации. В качестве экспериментальных примеров рассмотрены два исследования токсикокинетики ЛП, выполненные с использованием самцов и самок кроликов при пероральном введении исследуемых ЛП в течение 28 (исследование 1) или 90 (исследование 2) дней. В исследовании 1 выявлен уровень контаминации, составивший 17–25% (в первый и последний дни введения исследуемого ЛП соответственно). Контаминация биопроб может происходить *in vivo* (контаминация организма животного) и *ex vivo* (на этапе забора биопроб, преаналитическом и аналитическом этапе). Характер обнаружения аналита в пробах позволил исключить контаминацию *in vivo*, а результаты внутреннего расследования дали возможность предположить, что она происходила на этапе отбора биопроб. В исследовании 2 реализован ряд профилактических мер, и получен незначительный уровень контаминации (0–0,83%), не оказавший влияния на полноту и корректность интерпретации результатов. Докладчиком сформулированы рекомендации по минимизации и профилактике контаминации контрольных образцов при выполнении биологической части, преаналитического и аналитического этапов исследований. Материалы доклада вошли в публикацию (Косман В.М. и соавт., 2023а).

Об особенностях биоаналитических и регуляторных аспектов изучения фармакокинетики лекарственных средств для терапии Covid-19 в рамках процедуры ускоренной регистрации рассказал Тимофей Николаевич Комаров («Биоаналитические и регуляторные аспекты изучения фармакокинетики лекарственных средств для терапии COVID-19 в рамках процедуры ускоренной регистрации», ООО «Центр фармацевтической аналитики»). Автор обобщил опыт трех биоаналитических исследований, включавших разработку и валидацию методик, анализ биопроб, расчет и сопоставление фармакокинетических параметров, выполненных центром в рамках клинического исследования по оценке биоэквивалентности ЛП, показанных для лечения Covid-19, — фавипиравира в виде новой ЛФ для инъекционного введения, молнупиравира, впервые примененного в комбинации с фавипиравиром, и нирматрелвира и ритонавира.

Биоаналитическим исследованиям лекарственных средств с неустановленным метаболизмом и фармакокинетикой при приведении регистрационного досье в соответствие был посвящен доклад Ольги Александровны Арчаковой («Биоаналитические исследования лекарственных средств с неустановленным метаболизмом и фармакокинетикой при приведении регистрационного досье в соответствие», ООО «Центр фармацевтической аналитики»). В докладе рассмотрены результаты двух биоаналитических исследований, включавших разработку и валидацию методик, анализ биопроб, расчет и сопоставление фармакокинетических параметров, выполненных центром в рамках клинического исследования по оценке биоэквивалентности ЛП с неустановленной ранее фармакокинетикой, — лаппаконитина (в биопробах анализировали также его метаболит) и ипидакрина. Авторами применен подход корректировки аналитического диапазона, предусматривающий выбор максимально возможного аналитического диапазона на этапе разработки методики, выполнение для него ограниченного объема валидационных исследований, пилотный анализ проб,

полученных от добровольцев, для оценки реального уровня определяемых концентраций в плазме крови человека с дальнейшей корректировкой (сужением) аналитического диапазона и финальной валидацией методики. Данная процедура предшествовала анализу проб от добровольцев, что позволило сократить временные затраты на выполнение аналитических этапов исследований при отсутствии предварительной информации об уровне ожидаемых концентраций аналитов в биоматериале.

К основным возможным источникам рисков при проведении ДКИ, в том числе имеющих аналитическую часть, можно отнести: персонал, тест-системы, объекты испытаний, помещения, условия окружающей среды, оборудование и средства измерений, включая процесс валидации оборудования, обеспечение качества ДКИ, методы и процедуры исследований.

При разработке биоаналитических методик критическими моментами могут стать стабильность растворов, время экстрагирования, состав, pH, скорость подвижной фазы, вид колонки, температура и т.д. Все вышеперечисленное — это минимальные параметры, которые устанавливаются при определении робастности методики.

Об особенностях применения метода мостикового ИФА для анализа моноклональных антител рассказала в своем докладе Татьяна Николаевна Барыбина («Реализация мостикового ИФА для оценки кинетики моноклональных антител на примере пембролизумаба», АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»). Пембролизумаб относят к принципиально новому классу противоопухолевых средств — моноклональным антителам (monoclonal antibodies, mAb). Его количественное определение в биологическом материале можно выполнить методом мостикового ИФА с использованием коммерчески доступных наборов реагентов (например¹) или отдельных антител². Автором вместо дорогостоящих наборов реагентов были использованы более доступные антитела, и воспроизведена методика анализа пембролизумаба, рекомендованная их производителем. По результатам анализа образцов сыворотки интактных животных и модельных смесей на их основе с концентрацией пембролизумаба на уровне нижнего предела количественного определения (НПКО) сделано заключение о селективности методики анализа пембролизумаба. Установлены минимальное разведение, необходимое для оптимизации правильности и прецизионности методики; НПКО аналита в сыворотке крови обезьян, а также калибровочный диапазон валидируемой методики (15,6–1000 нг/мл соответствует диапазону 78–5000 нг/мл с учетом минимально допу-

¹ Pembrolizumab (Keytruda) Pharmacokinetic ELISA Kit. <https://www.mybiosource.com/elisa-kits/pembrolizumab-keytruda-pharmacokinetic/378270> (дата обращения: 05.2023).

KRIBIOLISA™ Pembrolizumab ELISA (KEYTRUDA) (дата обращения: 05.2023).

Pembrolizumab ELISA Kit (ab237652). <https://www.abcam.com/products/elisa/pembrolizumab-elisa-kit-ab237652.html> (дата обращения 05.2023).

² Pembrolizumab antibody (AbD30689). <https://www.bio-rad-antibodies.com/monoclonal/pembrolizumab-antibody-abd30689-hca296.html?f=purified> (дата обращения: 05.2023).

Pembrolizumab antibody (AbD30685_hlgG1). <https://www.bio-rad-antibodies.com/monoclonal/pembrolizumab-antibody-abd30685-higg1-hca297.html?f=hrp> (дата: обращения 05.2023).

Protocol: PK Bridging ELISA for Use with Anti-Pembrolizumab Antibodies. URL: <https://www.bio-rad-antibodies.com/protocol-pk-bridging-elisa-pembrolizumab-antibodies.html> (дата обращения: 05.2023).

стимого разведения в 5 раз). Полученные результаты согласуются с данными ряда производителей наборов реагентов для определения содержания пембролизумаба в сыворотке крови человека, согласно которым НПКО биоаналитических методик составляет около 8–30 нг/мл³. По результатам валидационных испытаний показана правильность (точность) и прецизионность внутри цикла и между циклами, которые соответствовали требованиям, предъявляемым к полимерсвязывающим методам (метод связывания лиганда, отклонения не превышали 20%); установлена стабильность пембролизумаба в сыворотке крови обезьян при температуре 2–8 °С в течение 24 ч, долгосрочная стабильность пембролизумаба в сыворотке крови, хранящейся в условиях заморозки при температуре ниже –70±10 °С, а также возможность разбавления проб в 5–60 000 раз. Методика количественного определения пембролизумаба в сыворотке крови обезьян методом мостикового ИФА валидирована по всем требуемым показателям и применена для дальнейшего изучения фармакокинетики ЛП пембролизумаба. Полученные автором результаты позволили показать сопоставимость фармакокинетических профилей двух ЛП с международным непатентованным названием пембролизумаб, концентрат для приготовления раствора для инфузий, разрабатываемого отечественного биоаналога и оригинального ЛП сравнения при однократном внутривенном введении обезьянам *Macaca fascicularis*.

Один из ключевых моментов, влияющих на результат ДКИ и являющихся возможным источником риска, — статистическая обработка полученных в исследовании данных. Уже на этапе разработки плана исследования важно определить показатели, измеряемые в ходе исследования и методы их статистической обработки.

Вера Михайловна Косман («Ретроспективная оценка variability фармакокинетических параметров и особенности их расчета в исследованиях с дизайном “животное-точка”», АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ») в своем докладе подробно обсудила вопросы variability фармакокинетических параметров и особенности их расчета в исследованиях с дизайном животное—точка. При планировании экспериментальных исследований по фармако- и токсикокинетике ключевым моментом является выбор тест-системы и объема выборки. При проведении эксперимента с выборками минимального размера, регламентированными нормативными документами, существует риск получения недостаточно достоверных, сильно variability результатов. Вместе с тем увеличение числа животных в эксперименте обуславливает риски повышения стоимости и риски, связанные с этическими вопросами такого рода исследований. Ретроспективный анализ накопленных автором данных показал отсутствие преимуществ того или иного биологического вида в качестве тест-системы, а также влияния размера выборки на получение более однородных данных по фармакокинети-

³ KRIBIOLISA™ Pembrolizumab ELISA (KEYTRUDA). <https://www.krishgen.com/product/details/Pembrolizumab-ELISA-KEYTRUDA> (дата обращения: 05.2023).

Pembrolizumab ELISA Kit (ab237652). <https://www.abcam.com/products/elisa/pembrolizumab-elisa-kit-ab237652.html> (дата обращения: 05.2023).

Pembrolizumab ELISA Kit (Keytruda®) Free drug. <https://www.assaygenie.com/pembrolizumab-keytruda-elisa-kit/> (дата обращения: 05.2023).

ческим параметрам. Материалы доклада вошли в публикацию (Косман В.М., Карлина М.В., 2023).

Дизайн эксперимента животное—точка, предполагающий отбор биологического материала после эвтаназии животного, часто используют в фармакокинетических исследованиях с применением мелких лабораторных животных, прежде всего грызунов. Вопрос обработки экспериментальных данных и способ расчета фармакокинетических параметров в ситуации, когда все значения концентраций получены от разных особей, может быть решен различными путями, что обуславливает риск получения неидентичных результатов в зависимости от выбранного способа обработки данных. На примере нескольких исследований автором выполнен ретроспективный анализ данных и расчет фармакокинетических параметров тремя различными способами: по средним значениям концентраций на каждой временной точке; по данным, полученным для животных с одинаковыми порядковыми номерами в подгруппах, соответствующих временным точкам; с применением ресемплинга, основанного на моделировании индивидуальных фармакокинетических профилей. Для всех оцененных фармакокинетических параметров (C_{\max} , T_{\max} , AUC_{0-t} , MRT , $T_{1/2}$) получены близкие значения и/или интервалы, что свидетельствовало о корректности применения всех рассмотренных способов расчета. Указание использованного способа расчета фармакокинетических параметров при описании методологии исследований позволило бы совершенствовать их качество и снизить указанные выше риски. Материалы доклада вошли в публикацию (Косман В.М. и соавт., 2023б).

При планировании ДКИ в современных условиях, когда в связи с санкциями «недружественных стран» в отношении Российской Федерации нарушены многие логистические цепочки и остановлены поставки многих реагентов, необходимо учитывать и продумывать заранее возможные пути замены методов определения целого ряда показателей, контролируемых в ходе исследований.

Доклад Анны Юрьевны Романенко («**Определение ионов лития альтернативным методом в условиях отсутствия коммерчески доступных наборов**»), АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ») является иллюстрацией использования альтернативного метода, примененного при отсутствии коммерчески доступных наборов. В связи с невозможностью поставки в РФ в период выполнения работы коммерческих наборов реагентов для анализа лития колориметрическим методом ряда зарубежных производителей (Abcam, Sigma-Aldrich), автором был использован колориметрический метод определения ионов лития с хинизарином в щелочной среде в присутствии диметилсульфоксида (ДМСО) (Gracia L.C. и соавт., 1997, Kim J.H. и соавт., 2011). Принцип метода основан на образовании в среде 90% ДМСО в присутствии гидроксида натрия и карбоната натрия комплекса ионов лития с хинизарином (1,4-дигидроксиантрахиноном) с максимумом поглощения при длине волны 601 нм. Для линеаризации полученных зависимостей оптической плотности растворов от концентрации ионов лития в сыворотке крови карликовых свиней использовали десятичный логарифм концентрации, НПКО анализа составил 0,17 мкг/мл; калибровочный диапазон — от 0,17 до 5,45 мкг/мл (соответствует диапазону 0,51–16,35 мкг/мл с учетом минимально допустимого разведения в 3 раза). Полученные результаты не уступали характеристикам коммерческих

наборов реагентов (линейный диапазон от 0,1 до 2 ммоль/л лития в сыворотке крови человека⁴ соответствует диапазону 0,69–13,8 мкг/мл). Докладчик подробно рассказала о спектрофотометрической методике определения ионов лития, ее валидации и об успешном использовании для изучения фармакокинетики и токсикокинетики препарата ЛП на основе лития хлорида.

Риски, характерные для этапа клинических испытаний, имеющих аналитическую часть

Возможные проблемы и риски этапа клинических исследований (КИ) можно разделить на малоуправляемые (низкая эффективность, выявление нежелательных реакций, незаявленных свойств, редких побочных эффектов) и управляемые (риски, обусловленные ошибками при разработке дизайна КИ, при подготовке протокола и отчета, при организации КИ, риски, связанные с недостатками при доклинических исследованиях).

В клинических исследованиях возможные риски также делят на группы, соответствующие этапам КИ⁵:

- на этапе получения одобрения регуляторных органов могут происходить задержки в получении одобрения исследования (локальный этический комитет или Минздрав РФ);
- на этапе запуска КИ риски могут быть обусловлены задержкой с подписанием контракта с клиническим центром и аналитической лабораторией, отклонением сроков набора пациентов/здоровых добровольцев, низкой (ниже запланированной) скоростью набора субъектов, а также риском включения добровольцев в исследование (рандомизация) с несоблюдением критериев включения/невключения;
- непосредственно проведение КИ также имеет свои риски: остановка производства исследуемого ЛП, невозможность закупки ЛП сравнения, риск, связанный с невозможностью выполнения условий договора аналитической лабораторией/центральной лабораторией, остановка очного мониторинга исследования исследовательских центров, могут возникать проблемы с качеством данных (ведение первичной документации, ошибки переноса данных из первичной документации, ошибки ведения журналов исследовательского центра и исследования), несоблюдение требований протокола;
- на этапе подготовки отчета по КИ могут отсутствовать индивидуальные перечни отклонений, лабораторных показателей, нежелательных явлений; могут быть выявлены отклонения от плана статистического анализа, которые не зафиксированы в разделе «Отклонения от протокола и стати-

⁴ Lithium Assay Kit (Colorimetric) (ab235613) <https://www.abcam.com/products/assay-kits/lithium-assay-kit-colorimetric-ab235613.html> (дата обращения: 05.2023).

Lithium Assay Kit <https://www.sigmaldrich.com/RU/en/product/sigma/mak358> (дата обращения: 05.2023).

⁵ <https://x7cpr.com/ru/upravlenie-riskami-v-klinicheskikh-issledovaniyah/> (дата обращения: 05.2023).

стического анализа», не приведены нормы лабораторных и физикальных показателей.

Примером риск-ориентированного подхода к клиническим исследованиям может служить ситуация, сложившаяся с пандемией COVID-19 в первой половине 2020 г. Пандемия привела к быстрому снижению числа участников, набираемых в КИ во многих странах. Так, в США в апреле оно было на 70% ниже, чем в допандемический период, к июню эти потери удалось частично компенсировать, но этот показатель все равно оказался на 38% ниже предыдущих лет (COVID-19 and Clinical Trials, 2020), возник риск остановки КИ по всему миру, что привело к значимым изменениям в методах проведения КИ, которые во многом были направлены на использование современных коммуникационных технологий: виртуальные коммуникации с менеджерами КИ, независимыми этическими комитетами, клиническими базами, спонсорами и в некоторых случаях субъектами, такие процедуры, как информированное согласие и сбор данных о первичных исходах, были перенесены в онлайн-режим. Рекомендации регуляторов были направлены на тщательное планирование как уже идущих, так и предстоящих КИ, что позволило внедрить альтернативные подходы к планированию и проведению КИ, чтобы повысить эффективность и одновременно снизить затраты и риски, которые неотступно сопровождают пандемию COVID-19 (Водовозов А., 2020).

Заключение

Получение безопасных и эффективных ЛП напрямую связано с минимизацией рисков при проведении клинических исследований. Поддержание качества клинических исследований, основанного на управлении рисками, — это непрерывный, постоянный и динамический процесс, обеспечивающий успешность проведения исследования, что в свою очередь приводит к целостности собранных данных, безопасности субъектов и соблюдению законодательных требований, а также к экономии финансовых затрат фармацевтических компаний (Полозова Е.А., 2020).

Обобщенная схема риск-ориентированного подхода к созданию ЛП, отражающая основные векторы и источники возможных рисков, выполненная в форме диаграммы Ишикавы, приведена на рис. 7.

Подводя итоги, необходимо подчеркнуть, что при создании ЛП необходимо минимизировать риски на всех этапах, важно понимать, что качество должно быть заложено еще на самых ранних этапах разработки и обеспечено в течение всего жизненного цикла ЛП так, чтобы требуемые свойства сохранялись в течение всего срока годности. Чтобы достичь вышеобозначенную цель необходимо создание многостороннего партнерства (рабочей группы) между всеми участниками разных этапов процесса, в том числе с разработчиком ЛП, производственной площадкой, доклиническим и клиническим центрами. Создание единой системы менеджмента качества для обеспечения целостности данных на протяжении всей разработки, исследований и производства, систематизация

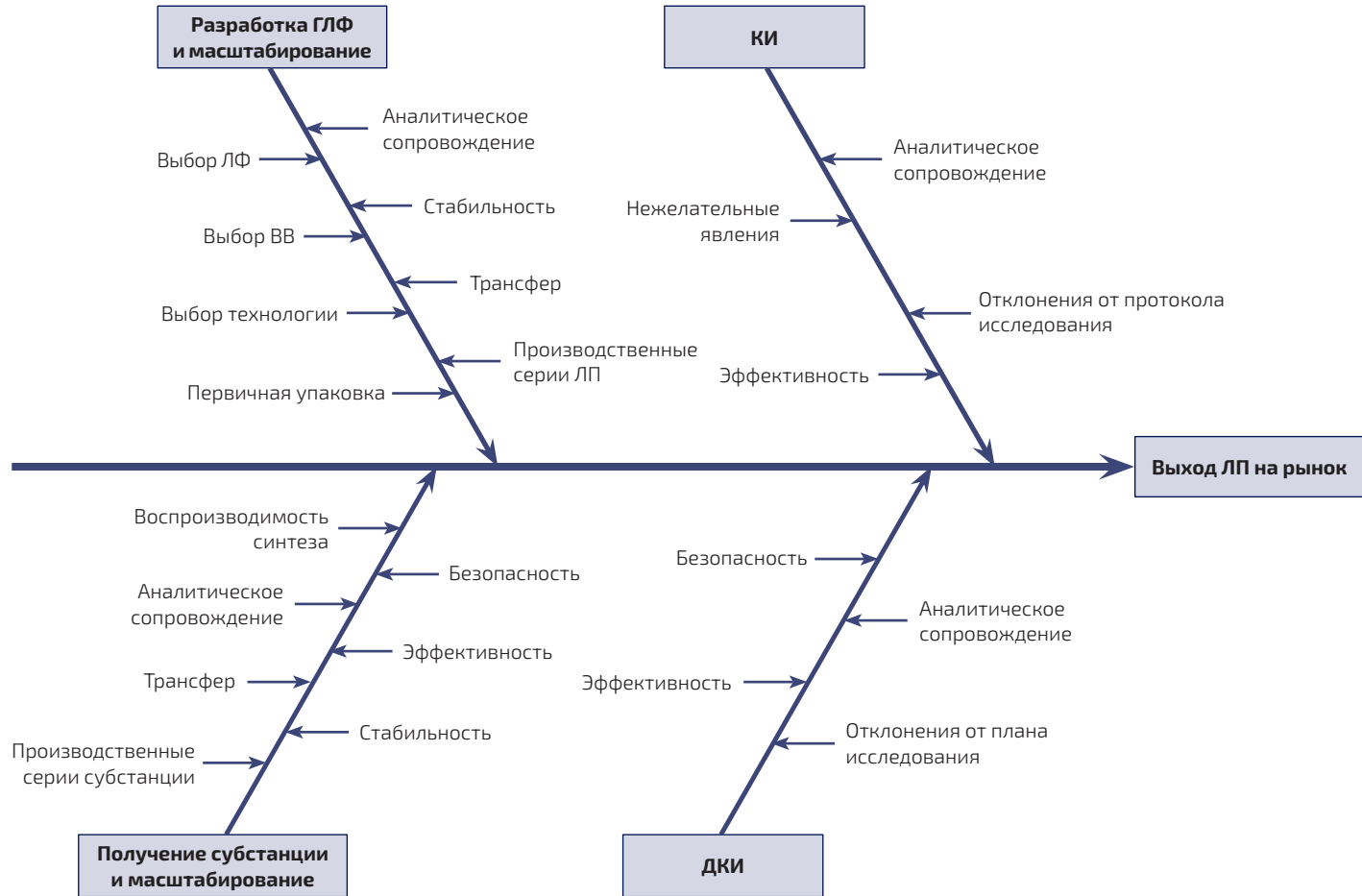


Рис. 7. Обобщенная схема риск-ориентированного подхода к созданию ЛП (ВВ — вспомогательное вещество; ГЛФ — готовая лекарственная форма; ЛФ — лекарственная форма; ЛП — лекарственный препарат; ДКИ — доклинические исследования; КИ — клинические исследования)

работы специалистов из разных областей является актуальной задачей, решение которой позволит создавать ЛП с минимальными финансовыми и временными затратами.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. COVID-19 and Clinical Trials: The Medidata Perspective. Release 7.0. Medidata Solutions, Inc., a Dassault Systèmes company. 2020. P. 1–18.
2. Elameen A., Kosman V.M., Tomsen M.G. et al. Variability of major phenyletanes and phenylpropanoids in 16-year-old *Rhodiola rosea* L. clones in Norway // *Molecules*. 2020. Vol. 25. N. 15. P. 3463–3475. DOI: [10.3390/molecules25153463](https://doi.org/10.3390/molecules25153463).
3. Galambosi B., Galambosi Zs., Kosman V.M. et al. Optimization of the fermentation of *Bergenia* sp. green leaves. In book: Fireweed, roseroot, *Bergenia* and chokeberry — joint research for supporting the herb production / Ed. by S. Kauppinen, B. Galambosi. Helsinki: Natural resources institute Finland. 2016. P. 11–22.
4. Galambosi B., Galambosi Zs., Shikov A.N. et al. Optimization of the fermentation of fireweed (*Epilobium angustifolium*) shoot. In book: Fireweed, roseroot, *Bergenia* and chokeberry — joint research for supporting the herb production / Ed. by S. Kauppinen, B. Galambosi. Helsinki: Natural resources institute Finland. 2016a. P. 34–45.
5. Gracia L.G., Rodríguez L.C., Ceba M.R. Spectrophotometric determination of lithium with Quinizarin in drugs and serum // *Talanta*. 1997. N. 44 (1). P. 75–83. DOI: [10.1016/s0039-9140\(96\)02018-8](https://doi.org/10.1016/s0039-9140(96)02018-8).
6. Jaffar-Aghaei M., Khanipour F., Maghsoudi A. et al. QbD-guided pharmaceutical development of Pembrolizumab biosimilar candidate PSG-024 propelled to industry meeting primary requirements of comparability to Keytruda® // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2022. Vol. 173. P. 106171. DOI: [10.1016/j.ejps.2022.106171](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106171).
7. Kim J.H., Diamond D., Lau K.T. Development of portable device for monitoring the lithium level from bipolar disorder patients // *Pervasive Health*. 2011. P. 230–233. DOI: [10.4108/icst.pervasivehealth.2011.246070](https://doi.org/10.4108/icst.pervasivehealth.2011.246070).
8. Ампилогова И.Н., Карлина М.В., Макаров В.Г., Макарова М.Н. Взаимосвязь фармацевтической разработки и доклинических исследований (обзор) // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023. № 12(2). С. 155–163. DOI: [10.33380/2305-2066-2023-12-2-155-163](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-155-163).
9. Басевич А.В., Дзюба А.С., Каухова И.Е., Андреева П.И. Разработка алгоритма создания нового препарата. Стадия 1: Фармацевтическая разработка // *Формулы фармации*. 2019. Т. 1. № 1. С. 22–31. DOI: [10.17816/phf18519](https://doi.org/10.17816/phf18519).
10. Буденкова Е.А., Литвинова Т.М. Анализ зарубежного опыта подготовки кадров для фармацевтической отрасли в Евросоюзе // *Ремедиум*. 2020. С. 7–8. DOI: [10.21518/1561-5936-2020-7-8-79-83](https://doi.org/10.21518/1561-5936-2020-7-8-79-83).
11. Булгаков А.Л., Космаков Р.В. Фармацевтические партнерства при разработке новых лекарственных средств // *Фармация и фармакология*. 2018. № 6(1). С. 86–98. DOI: [10.19163/2307-9266-2018-6-1-86-98](https://doi.org/10.19163/2307-9266-2018-6-1-86-98).
12. Водовозов А. Клинические исследования в эпоху коронавируса: управление рисками // *Ремедиум*. 2020. С. 11–12. DOI: [10.21518/1561-5936-2020-11-12-18-24](https://doi.org/10.21518/1561-5936-2020-11-12-18-24).

13. Елшинбекова К.М., Дахтаев У.М., Шопабаетова А.Р. Кадровые ресурсы для фармацевтической промышленности: как и где готовить // Вестник КазНМУ. 2014. № 3(2). С. 95–96.
14. Иванова А. Трансфер технологий в здравоохранении, фармацевтике и секторе медицинских изделий. 2023. URL: <https://brace-lf.com/informaciya/farmatsevticheskoe-i-meditinskoe-pravo/1863-transfer-tekhnologij-v-zdravookhraneni-farmatsevtike-i-sektore-meditinskikh-izdelij> (дата обращения: 08.2023).
15. Косман В.М., Карлина М.В., Петрова Е.М., Макарова М.Н., Макаров В.Г. К вопросу об оценке контаминации и анализе контрольных проб в исследованиях токсикокинетики // Трансляционная медицина. 2023а (в печати).
16. Косман В.М., Карлина М.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Сопоставление приемов расчета фармакокинетических параметров в исследованиях с дизайном «животное-точка» // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2023б; № 3. С. 39–47.
17. Косман В.М., Пожарицкая О.Н., Шиков А.Н. и др. Изменчивость состава биологически активных веществ *Bidens tripartita* (Asteraceae) при интродукции на северо-западе России и в Финляндии // Растительные ресурсы. 2010. № 1. С. 77–86.
18. Косман В.М., Фаустова Н.М., Пожарицкая О.Н., Шиков А. Н, Макаров В.Г. Накопление биологически активных веществ в подземных частях лапчатки белой (*Potentilla alba* L.) в зависимости от срока культивирования // Химия растительного сырья. 2013. № 2. С. 139–146.
19. Косман В.М., Карлина М.В. Ретроспективная оценка вариабельности фармакокинетических параметров в зависимости от биологического вида и числа особей в экспериментальной группе // Лабораторные животные для научных исследований. 2023. № 1. С. 60–69. DOI: [10.57034/2618723X-2023-01-06](https://doi.org/10.57034/2618723X-2023-01-06).
20. Кулешова С.И. Перенос (трансфер) методик, параметры валидации/верификации // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2017. № 7(2). С. 77–80.
21. Олефир Ю.В., Медуницын Н.В., Авдеева Ж.И. и др. Современные биологические/биотехнологические лекарственные препараты. Актуальные вопросы разработки и перспективы использования // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2016. № 16(2). С. 67–77.
22. Полозова Е.А. Современные аспекты управления рисками при проведении клинических исследований // Качественная клиническая практика. 2020. № 1. С. 45–52. DOI: [10.37489/2588-0519-2020-1-45-52](https://doi.org/10.37489/2588-0519-2020-1-45-52).
23. Рожнова С.А., Цыпкина А.В. Анализ системы организации фармацевтической разработки лекарственных средств // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 3. С. 170–176.
24. Сидоров К.О., Лин А.А., Марченко Н.В. Активные субстанции для отечественных производителей лекарств: прошлое, настоящее и будущее // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 4. С. 298–302.
25. Сидоров К.О., Марченко Н.В. Кадровое обеспечение локализованных фармацевтических предприятий // Сборник материалов IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации». 2016. С. 51–53.

26. Смехова И.Е., Шигарова Л.В., Андреева П.И., Флисюк Е.В., Дзюба А.С. Применение подхода Quality-by-Design для обоснования состава и технологии двухкомпонентных суппозиториев // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022. № 11(4). С. 142–149. DOI: [10.33380/2305-2066-2022-11-4-142-149](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-142-149).
27. Старчак Ю.А., Гаврилин М.В., Шинева Н.В. Трансфер аналитических методик // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2020. № 9(3). С. 182–187. DOI: [10.33380/2305-2066-2020-9-3-182-187](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-182-187).
28. Шангареева Р. Трансфер технологий — заметки практика. 2020. URL: <https://gxpnews.net/2020/05/transfer-texnologij-zametki-praktika> (дата обращения: 08.2023)
29. Эпштейн Н.А. Трансфер методик «количественное определение» и «растворение»: сравнительное испытание, критерии приемлемости (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2022. № 56(1). С. 39–43. DOI: [10.30906/0023-1134-2022-56-1-39-43](https://doi.org/10.30906/0023-1134-2022-56-1-39-43).
30. Эпштейн Н.А. Трансфер методик определения примесей: сравнительное испытание, валидация, критерии приемлемости (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021. № 10(2). С. 137–146. DOI: [10.33380/2305-2066-2021-10-2-137-146](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-137-146).

Особенности подготовки программы исследований биологических лекарственных средств

<https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-2-8-s3>

К. Л. Крышень¹, А. А. Берчатова², А. А. Головина¹, Г. Н. Енгальцева², И. Н. Исакова-Сивак³,
И. В. Красильников⁴, М. А. Оганова⁵, Т. Ю. Остроухова⁵, Р. Д. Сюбаев², Е. В. Шипаева⁶, И. Е. Шохин⁷

¹ АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,

² ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России,

³ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,

⁴ АО «Развитие Биотехнологий»,

⁵ АО «БИОКАД»,

⁶ АО «Р-Фарм»,

⁷ ООО «ЦФА»

На IV конференции GLP-PLANET (2023) в докладах секции «Биотехнологические лекарственные средства. Программа доклинических исследований» и секции «Высокотехнологические лекарственные средства. Эффективность и безопасность» были освещены вопросы доклинических исследований биоаналогов моноклональных антител (МкАТ), иммунобиологических препаратов и генотерапевтических лекарственных средств.

Биоаналогичные препараты на основе моноклональных антител

Биотехнологические препараты на основе МкАТ начали появляться на мировом рынке в конце 1990-х — начале 2000-х годов. За последние 30 лет достигнуты значительные успехи в применении МкАТ для лечения онкологических, аутоиммунных, инфекционных и других заболеваний (рис. 1). На сегодняшний день зарегистрировано порядка 170 оригинальных препаратов на основе МкАТ (Kaplon H. и соавт., 2023).

Окончание сроков действия патентов ряда оригинальных препаратов в начале 2000-х годов привело к бурному развитию рынка биоаналогичных лекарственных препаратов, а также становлению национальных и международных регуляторных

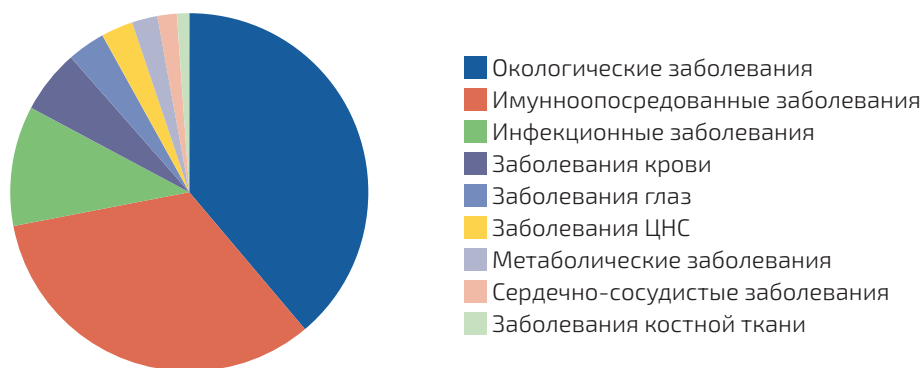


Рис. 1. Области применения моноклональных антител (Луи Х. и соавт., 2023)

требований. Несмотря на то, что стоимость терапии некоторыми оригинальными препаратами может достигать десятков и даже сотен тысяч долларов, разработка биоаналогов представляется крайне актуальной с точки зрения доступности лечения, а также сокращения времени ожидания необходимого лекарства медицинскими учреждениями (Уваров Д.А. и соавт., 2021).

Цель терапии, основанной на использовании моноклональных антител, — выведение из организма или нейтрализация патогенной инфекции или специфической мишени, связанной с заболеванием, например, бактериальной, вирусной или опухолевой. Терапевтические антитела могут выполнять три принципиальные задачи (Корепанов А.С. и соавт., 2016):

- 1) блокировка действия определенной молекулы;
- 2) связывание с определенными клетками;
- 3) выполнение функции сигнальной молекулы.

Механизмы действия МкАТ определяются их структурно-функциональными характеристиками. МкАТ лекарственных препаратов, как правило, относятся к иммуноглобулинам класса G (IgG). На рис. 2 представлена схема строения молекулы IgG. Молекула IgG состоит из четырех полипептидных цепей — двух легких (L-цепь) с молекулярной массой по 25 кДа и двух тяжелых (H-цепь), молекулярная масса которых составляет по 50 кДа. Каждая легкая цепь состоит из переменного (VL) и константного (CL) доменов, каждая тяжелая цепь — из одного переменного (VH) и трех константных (CH1, CH2 и CH3) доменов. Структуру молекулы антитела поддерживают дисульфидные связи, которые соединяют между собой тяжелые цепи, легкие цепи с тяжелыми цепями, структуру каждого из доменов стабилизируют внутридоменные дисульфидные связи (Авдеева Ж.И. и соавт., 2016).

Fab-фрагмент содержит переменные домены, отвечающие за специфическое взаимодействие с мишенью, Fc-фрагмент играет важную роль в эффекторных функциях, таких как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), комплементзависимая цитотоксичность (CDC), а также может давать другие общие регуляторные эффекты на клеточный цикл. CH2-домен является местом присоединения углеводов и связывания белка системы комплемента C1q.

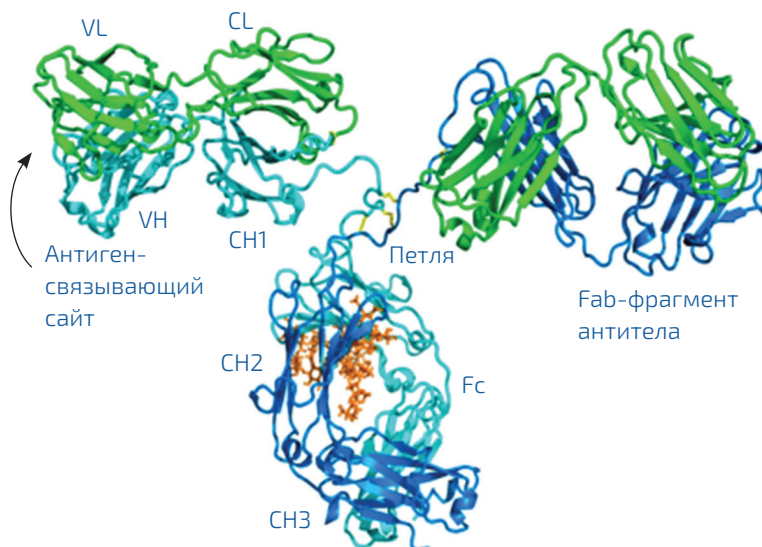


Рис. 2. Структура моноклонального антитела (Chiu M.L. и соавт., 2019)

CH3-домен взаимодействует с Fc-рецепторами (FcγR), расположенными на поверхности клеток, принимающих участие в иммунологических реакциях, таких как естественные киллеры; киллеры, активированные цитокинами; макрофаги; нейтрофилы. Указанные клетки экспрессируют рецепторы к Fc-фрагменту IgG–FcγRI (CD16), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD64) (Авдеева Ж.И. и соавт., 2016).

Участок, соединяющий CH2–CH3-домены IgG, взаимодействует с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), а также с бактериальными белками A и G. Указанный рецептор присутствует на клетках эндотелия сосудов, эпителия кишечника, эндотелия ЦНС, антигенпрезентирующих клетках, подоцитах (висцеральные эпителиальные клетки) почек и легких. FcRn-рецептор ответственен за перенос IgG через эпителиальный и эндотелиальный барьеры, что напрямую влияет на фармакокинетический профиль МкАТ (Авдеева Ж.И. и соавт., 2016).

Принимая во внимание сложную структуру МкАТ, разнообразие их функциональных свойств, становится очевидно, что разработка биоаналога МкАТ является непростой задачей.

«Один процесс — один продукт»

Биологические препараты, как эталонные, так и биоаналоги, представляют собой крупные и сложные молекулы, полученные с использованием многоступенчатого производственного процесса. Поскольку используемое сырье и клеточные линии, экспрессирующие биоаналог и исходный биологический препарат, могут различаться, а этапы очистки биоаналога и эталонного продукта индивидуальны для каждого процесса, потенциальная разница между обоими продуктами определяется уникальными характеристиками каждого технологического процесса.

МкАТ характеризуются не только аминокислотной последовательностью, но также третичной и четвертичной структурой, степенью расположения сайтов гликозилирования, уникальным профилем изоформ и степенью агрегации белка.

Микрогетерогенность является общей чертой всех биотехнологических препаратов. Посредством нескольких ферментативных процессов каждая система клеточной экспрессии производит различные посттрансляционные модификации (ПТМ), которые могут отличаться между клеточными линиями, различными клонами, полученными из одной и той же родительской клеточной линии, и даже между отдельными белками, продуцируемыми одной и той же клеткой (Putnam W.S. и соавт., 2010; Vulto A.G. и соавт., 2017).

Биохимическая изменчивость, возникающая в результате ПТМ, присуща всем биотехнологическим препаратам и может включать гликозилирование, фосфорилирование, дезаминирование, метилирование, ацетилирование. Интересно, что типичная молекула антитела может иметь миллионы молекулярных вариантов (до 10^8 согласно Kozlowski S. и соавт., 2006), при этом влияние отдельных ПТМ или их совокупности на биологическую активность, биораспределение и безопасность предсказать зачастую невозможно. Тем не менее для ряда ПТМ известен их общий вклад в основные характеристики МкАТ. Например, суммарный заряд молекулы антитела может влиять на фармакокинетику и биораспределение в тканях при подкожном введении за счет электростатических взаимодействий с отрицательно или положительно заряженными радикалами молекул клеточных мембран. Наиболее распространенным источником гетерогенности заряда является удаление карбоксипептидазой концевых остатков лизина тяжелых цепей IgG1 (Putnam W.S. и соавт., 2010).

Гликозилирование можно считать наиболее важной ПТМ. Особенности гликоформы белка могут влиять на его фолдинг, агрегацию, устойчивость к протеолитической деградациии, растворимость, транспорт, а также изменять его функциональную активность и иммуногенность (Розов С.М. и соавт., 2018).

Большинство терапевтических МкАТ (относящиеся к классу IgG) содержат сайт гликозилирования в Fc-области в положении 297 аминокислоты (аспарагина) и в некоторых случаях в Fab-области. Гликаны, оказывающие основное влияние на фармакокинетику и фармакодинамику МкАТ, включают маннозу, сиаловые кислоты, фукозу и галактозу (рис. 3).

Маннозилированные гликаны (см. рис. 3, б) могут влиять на фармакокинетику молекулы, приводить к повышению клиренса и снижению эффективности. Наличие фукозы (см. рис. 3, а, д, е, и) в структуре гликана уменьшает связывание антител с Fc-рецептором IIIa, что в свою очередь приводит к снижению антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). Системы экспрессии на основе яичников китайского хомяка (CHO) могут продуцировать афукозилированные МкАТ, которые обладают, напротив, повышенной ADCC. Наличие концевого остатка галактозы играет важную роль в комплементзависимой цитотоксичности (CDC). Влияние отдельных типов гликозилирования на биологические характеристики МкАТ представлены в табл. 1.

Клеточная линия является одним из ключевых факторов, определяющих характер гликозилирования биологических препаратов. Например, клеточные линии

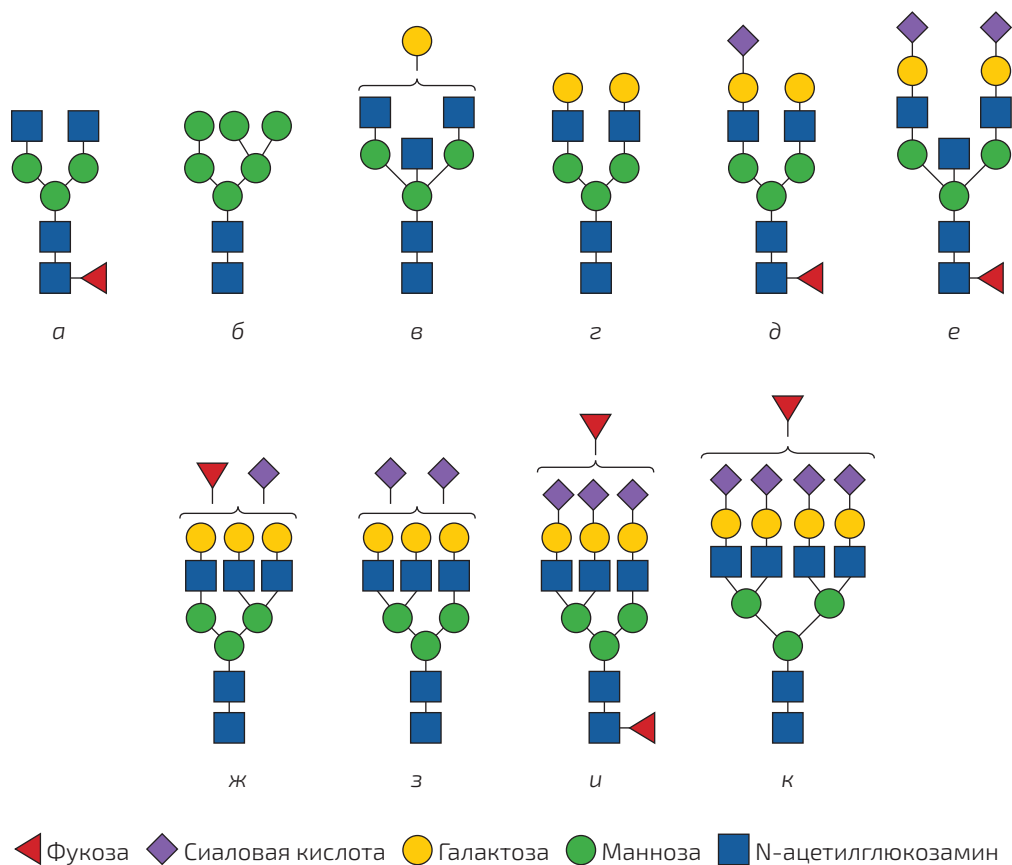


Рис. 3. Примеры структур N-гликанов (заимствовано у Шарипова и соавт., 2023):

б — гликан с большим числом остатков маннозы, остальные гликаны имеют комплексную структуру; а, в, г-е — бiantеннарные гликаны; ж-и — триантеннарные гликаны; к — тетраантеннарный гликан. У структур а, д, е, и присутствует фукозилирование остова N-гликана; структуры ж, и, к антеннарно фукозилированы (фукоза присоединена к антенне). В структурах в, е присутствует бiantеннарный остаток N-ацетилглюкозамина (GlcNAc). В структурах в-к, д-к присутствуют остатки галактозы и сиаловой кислоты соответственно

на основе яичников китайского хомячка (CHO) наиболее популярны при разработке биологических препаратов, потому что в них, как правило, осуществляется гликозилирование, сходное с таковым у человека, кроме того, эта клеточная линия способна расти в суспензии с высоким удельным выходом и стабильна к изменениям pH и концентрации кислорода. Однако в клеточных линиях яичников китайского хомячка не продуцируются некоторые характерные для человека гликаны, напротив, продуцируются определенные гликаны, которые не типичны для людей (такие

Влияние отдельных типов гликозилирования
на основные характеристики МкАТ (Liu L. и соавт., 2015)

Гликан	Влияние
Манноза	<ul style="list-style-type: none"> • Повышает клиренс МкАТ. • Повышает степень связывания с FcγRIIIa/ADCC. • Уменьшает степень связывания C1q/CDC моноклонального антитела
Фукоза	<ul style="list-style-type: none"> • Препятствует связыванию с FcγRIIIa. • Дефукозилирование повышает степень связывания с FcγRIIIa/активность в виде ADCC
Галактоза	<ul style="list-style-type: none"> • Доступная галактоза может повышать клиренс МкАТ. • Усиливает CDC моноклонального антитела
GlcNAc	<ul style="list-style-type: none"> • Биантенарный GlcNAc повышает степень связывания с FcγRIIIa/ADCC. • Усиливает клиренс Fc-слитых белков
N-ацетил-нейраминовая кислота (NANA)	<ul style="list-style-type: none"> • Критически важна для уменьшения клиренса Fc-слитых белков. • Противовоспалительное действие
N-гликолилнейраминовая кислота (NGNA)	<ul style="list-style-type: none"> • Препятствует связыванию с FcγRIIIa и снижает активность МкАТ в виде ADCC. • Может быть иммуногенной у человека
Остаток Galα1-3Galβ1-GlcNAc-R	<ul style="list-style-type: none"> • Иммуногенный у человека и может вызывать анафилактические реакции

как α-gal и N-гликолилнейраминовый), что может привести к повышению иммуногенности белковой молекулы (Vulto A.G. и соавт., 2017).

Важно отметить, что микрогетерогенность является следствием не только системы экспрессии целевого белка, но и всего множества технологических процессов. Температура, pH и концентрация глюкозы в среде для культивирования клеток, продолжительность культивирования клеток и даже тип используемого реактора потенциально могут изменять основные характеристики МкАТ. Различные этапы фаз очистки белка также могут влиять на окисление, дезаминирование, фрагментацию и агрегацию биологических молекул.

Таким образом, биоаналог никогда не может быть полностью идентичен оригинальному биологическому продукту, и даже небольшие изменения процесса производства могут напрямую влиять на его безопасность и эффективность. Более того, каждая серия биотехнологического препарата — это каждый раз уникальная молекула.

Шаг назад, преодолевающий пробел в знаниях, или «снятие отпечатков пальцев»

В отличие от воспроизведенных низкомолекулярных препаратов, создание точной копии рекомбинантного белка практически невозможно из-за сложности процесса производства, который является неотъемлемой частью оригинального лекарственного средства. Например, первичная аминокислотная последовательность оригинальной молекулы может быть хорошо охарактеризована, однако посттрансляционные модификации, влияющие на конечный продукт, являются менее предсказуемыми из-за вышеупомянутых влияний системы экспрессии, систем очистки и других факторов и присущей им микрогетерогенности.

Разработка биоаналога должна начинаться с тщательной характеристики как можно большего числа атрибутов качества оригинального препарата и установления диапазона вариаций каждого критического параметра.

Аналитическая характеристика обычно включает в себя оценку физико-химических свойств (анализ первичной аминокислотной последовательности, структур более высокого порядка, чистоту и степень гликозилирования). Параллельно необходимо изучать биологическую активность *in vitro*, что в дальнейшем позволит определить потенциальное влияние наблюдаемых структурных различий между биоаналогом и эталонным биологическим препаратом на эффективность или безопасность продукта.

В совокупности все охарактеризованные параметры и соответствующие им диапазоны составляют так называемый «отпечаток пальцев» оригинального продукта, обеспечивающий основу или исходные целевые ориентиры, в соответствии с которыми разрабатывается биоаналог. Цель разработки биоаналога состоит в том, чтобы соответствовать этому «отпечатку» (Vulto A.G. и соавт., 2017).

Снятие «отпечатков пальцев» оригинальной молекулы является обширной работой, включающей предварительную разработку высокочувствительных аналитических методов для измерения соответствующих параметров качества эталонного продукта. Чтобы установить диапазон, представляющий ожидаемую изменчивость исходного биологического продукта, приобретается и тестируется несколько серий оригинального препарата. Соответственно, чем больше серий оригинального препарата анализируется в ходе этого этапа, тем больше уверенности у разработчика биоаналога будет в определении пределов сходства для каждого отдельного критического параметра (Vulto A.G. и соавт., 2017).

Например, при разработке биоаналога этанерцепта SB4 компания-разработчик разработала 61 аналитический метод и протестировала 30 партий оригинального препарата, выпускаемого в ЕС, и более 30 партий оригинального препарата, выпускаемого в США (Cho I.H. и соавт., 2016).

Программа исследований. Перевернутый треугольник

Если целью производителя оригинального лекарственного средства является четкая демонстрация безопасности и эффективности в ходе клинических испытаний, то путь для производителя биоаналога совершенно иной (Isaacs J. и соавт., 2017).

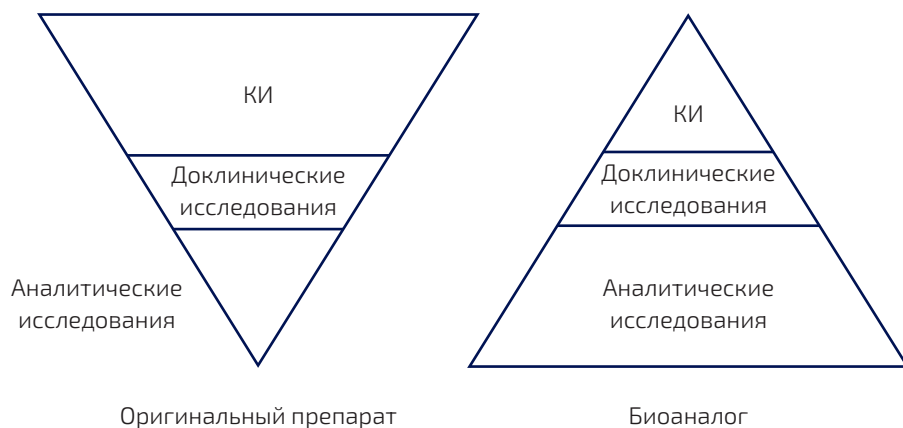


Рис. 4. Схематическое отображение объема разных стадий исследований оригинального препарата МкАТ и биоаналога (Isaacs J. и соавт., 2017)

На рис. 4 представлено схематическое отображение объема разных стадий исследований оригинального препарата МкАТ и биоаналога.

Так, биоаналогичность сначала нужно доказать в ходе обширного аналитического исследования по сопоставимости, систематической оценке качества и сходства биоподобного и оригинального продукта по десяткам физико-химических критериев качества, прежде чем устанавливать эквивалентность в доклинических и клинических исследованиях (Isaacs J. и соавт., 2017).

Согласно решению ЕЭК № 89¹, доклиническая оценка сопоставимости биоаналога с препаратом сравнения проводится поэтапно.

Шаг 1. Сравнительные исследования биологической активности.

- Связывание с антигеном-мишенью.
- Связывание с репрезентативными изоформами соответствующих трех Fc-гамма-рецепторов (FcγRI, FcγRII, FcγRIII), FcRn и комплементом (C1q).
- Определение Fab-ассоциированных функций (например, оценка нейтрализации растворимого лиганда, активации или блокады рецептора).
- Определение Fc-ассоциированных функций (например, оценка антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), активации комплемента).

Аналитические и биоаналитические методики, используемые для оценки основных характеристик продукта, должны быть разработаны и надлежащим образом валидированы. В своем докладе «**Биоаналитические исследования биопрепаратов: вчера, сегодня, завтра**» Игорь Евгеньевич Шохин, генеральный директор ООО «ЦФА» обратил внимание на новое руководство ICH M10 on bioanalytical method validation (2023). В рамках текущей регуляторной базы ЕЭК документ пока носит

¹ Решение Совета ЕЭК от 03.11.16 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

рекомендательный характер, тем не менее он содержит целый ряд ценной информации, которую можно принимать во внимание при проведении соответствующих исследований.

Очевидно, что при таких сложных возникающих перед разработчиком биоаналога задачах, включающих разработку и валидацию десятков методик, проведение множества экспериментов, необходимо особое внимание уделять планированию и организации научно-исследовательских работ. Игорь Евгеньевич Шохин поделился опытом рискориентированного подхода в проектном управлении аналитическими и биоаналитическими исследованиями, который включает в себя рассмотрение рисков, связанных с поставщиками критических реагентов и сложностями в цепочках поставок, с рекомендацией проведения проверки качества реагентов, апробации и частичной валидации наборов для анализа, проведение пилотных экспериментов.

*Шаг 2. Установление потребности в исследованиях в условиях *in vivo*.*

Общепризнано, что некоторые МкАТ могут опосредовать эффекты, которые невозможно полностью выявить с помощью исследований *in vitro*. В связи с этим могут потребоваться исследования *in vivo* при условии, что имеется релевантная по виду животного и дизайну модель *in vivo*. При определении необходимости проведения дополнительных доклинических исследований *in vivo* необходимо рассмотреть ряд факторов (перечень не исчерпывающий):

- наличие значимых показателей качества, которые не были обнаружены в оригинальном (референтном) лекарственном препарате (например, новая посттрансляционная структурная модификация);
- наличие показателей качества, значимо различающихся количественно от таковых оригинального (референтного) лекарственного препарата;
- значимые различия по составу, например, наличие вспомогательных веществ, редко используемых в препаратах МкАТ.

Темпы развития биотехнологий требуют от разработчиков препаратов не только значительных финансовых вложений, но и применения современных научных концепций. Одной из них является концепция Quality-by-Design (QbD, «качество путем разработки»), заявленная в руководстве ICH Q8 «Фармацевтическая разработка»².

Подход QbD в разработке МкАТ подробно описан в работе Alt N. и соавт., 2016. Ключевыми элементами QbD является определение целевого профиля продукта и критических атрибутов качества с последующим научно-обоснованным анализом рисков. Zhang E. и соавт. 2020, применяя принципы QbD в разработке биоаналога препарата Хумира®, установили основные атрибуты качества биоаналога с ранжированием рисков для клинического применения от низкого до высокого (табл. 2).

Очевидно, что ряд характеристик, например, химическая модификация остатка или замена аминокислоты в критической области Fab, определяющей комплементарность, является примером атрибута качества, который оказывает прямое влияние на связывание с мишенью и имеет соответственно высокий риск с точки зрения клинического применения. Также можно обратить внимание, что для адалимумаба риски, связанные с Fc-ассоциированными функциями (ADCC, CDC), являются низкими, поскольку главной задачей молекулы являются связывание и ней-

² ICH Q8 (R2) Pharmaceutical development. 2009.

Таблица 2

Пример оценки рисков для основных атрибутов качества биоаналога препарата Хумира® (МНН: адалимумаб, анти-TNF α моноклональное антитело) в соответствии с Zhang E. (Zhang E. и соавт., 2020)

Группа показателей	Атрибут качества	Риск
Физико-химические свойства	Аминокислотная последовательность	Высокий
	Молекулярная масса	Средний
	Дисульфидная связь	Высокий
	Свободные тиоловые группы	»
	Наличие сайта гликозилирования	»
	Вторичная и третичная структура	Средний
	Заряд	»
	Афукозилирование	Низкий
	Наличие остатков галактозы	»
	Увеличение числа остатков маннозы	»
	Наличие остатков сиаловой кислоты	Средний
Функциональные свойства	Взаимодействие с FcRn	»
	Fc γ R1a	Низкий
	Fc γ R11a	»
	Fc γ R11b/c	»
	Fc γ R111a (V)	»
	Fc γ R111a (F)	»
	Fc γ R111b	Средний
	C1q	Низкий
Биологическая активность	Связывание свободного TNF α	Высокий
	Нейтрализация свободного TNF α	»
	ADCC	Низкий
	CDC	»
Примеси	ДНК	Высокий
	Белки клеток системы экспрессии	»
	Белок А	»
	Концентрация субмикронных частиц	Средний
	Концентрация субвидимых частиц	»

трализация TNF α . В то же время для некоторых антител, например, трастузумаба (анти-HER2) или ритуксимаба (анти-CD20), эффекты которых связаны с активацией системы комплемента и антителозависимой клеточной цитотоксичностью, можно предположить, напротив, средний или высокий риск снижения фармакодинамических свойств при клиническом применении.

Представленный рискориентированный подход может помочь в обосновании необходимости проведения тех или иных исследований на животных. Например, если наблюдаются отличия в связывании с FcRn, играющим важную роль в клиренсе антител, то необходимость в проведении как минимум фармакокинетики на животных возрастает. Если анализ физико-химических и функциональных свойств выявил отличия в атрибутах качества, связанных с фармакодинамическими характеристиками, то для обоснования дальнейших рисков клинического применения могут потребоваться дополнительные исследования *in vivo* на соответствующих моделях. Если для оригинального препарата хорошо изучен токсикологический профиль на приматах при многократном применении, выявлены органы-мишени токсического воздействия и определены соответствующие уровни доз, при которых наблюдаются побочные эффекты, то сравнительная оценка токсичности, в том числе степени нежелательных явлений, может дать дополнительную информацию о дальнейших рисках, связанных с безопасностью применения у человека.

Шаг 3. Исследования в условиях *in vivo*.

Таким образом, исследования *in vivo* проводят только при наличии существенных отличий физико-химических свойств, а также биологической активности *in vitro*. Исследование *in vivo* также может быть необходимо, если имеющихся аналитических и биологических тестов недостаточно для адекватной характеристики продукта, или если влияние изменения недостаточно хорошо охарактеризовано или очевидно с точки зрения анализа взаимосвязи структура—активность.

При проведении исследований на животных необходимо понимать, какую дополнительную информацию о качественных характеристиках биоаналога оно может предоставить. Например, основываясь на знаниях о влиянии некоторых вариантов гликанов на клиренс МкАТ, проведение исследований фармакокинетики *in vivo* (в случае существенных отличий в профиле гликозилирования) кажется вполне актуальным.

При составлении дизайна исследования на нечеловекообразных приматах необходимо учитывать правила 3Rs. Анализ различных исследований биоаналогов МкАТ, проведенный Шарпан К. и соавт., 2016, показал, что минимально достаточным дизайном является использование трех групп животных: по 3 самца и 3 самки (контрольная группа, одна доза биоаналога и одна доза оригинального препарата) без использования дополнительных животных для оценки обратимости выявленных эффектов (Шарпан К. и соавт., 2016). Классический статистический анализ при таком дизайне не проводится, каждое животное рассматривается индивидуально. Длительность исследования должна быть обоснована исходя из фармакокинетики препарата и длительности клинического применения. Как правило, достаточным является продолжительность исследования, ограниченная 4 нед.

Выбор конечных точек в исследовании на нечеловекообразных приматах должен быть также обоснован с точки зрения получения дополнительной информации

для доказательства биоаналогичности. Например, требуется ли выполнение электрокардиографии или измерение давления, если у оригинального препарата отсутствует влияние на данные показатели? Следует ли подвергать животное эвтаназии с отбором органов на гистологию, если отсутствуют органы-мишени токсического воздействия для оригинального МкАТ? Требуется ли изучение местной переносимости с отбором тканей в месте введения для гистологического анализа, если состав готовой лекарственной формы биоаналога соответствует препарату сравнения? Интуитивно ясно, что объем оцениваемых параметров в сравнительных исследованиях может быть максимально сокращен в зависимости от целей исследования, а также доступной информации об оригинальном препарате.

Отдельный вопрос, поднятый на конференции, касался необходимости включения в дизайн исследования МкАТ на животных оценки иммуногенности (образования антилекарственных антител). Данный вопрос подробно осветила руководитель направления биоаналитических исследований компании АО «БИОКАД» Татьяна Юрьевна Остроухова в докладе «Изменение подходов к оценке иммуногенности инновационных биологических препаратов при доклинической разработке». Оценка образования антител к МкАТ на животных в целом обладает низкой прогностической значимостью, поскольку очевидно, что на любой чужеродный белок у животного будут образовываться антитела. Тем не менее информация о наличии связывающих антител может быть полезной при интерпретации данных токсикологических, фармакокинетических или фармакодинамических исследований. Например, искаженный (нехарактерный) фармакокинетический профиль может быть напрямую связан с образованием комплекса МкАТ и связывающих антител. В таких случаях данные животного, у которого были обнаружены антитела, могут быть исключены из общего массива. Согласно решению ЕЭК № 89³, рекомендуется проводить отбор биологических образцов, сохранять материал, а затем, в случае необходимости, проводить анализ.

Руководитель отдела доклинических исследований медицинской дирекции АО «Р-Фарм» Елена Владимировна Шипаева в своем сообщении подняла важный вопрос о частичном или полном отказе от исследований *in vivo* на нечеловекообразных приматах для биоаналогов МкАТ, которые для большинства препаратов данного класса являются единственным релевантным видом, поскольку проведенные в полном объеме исследования *in vitro* с применением современных аналитических методов позволяют дать надлежащую оценку биоаналогичности. Кроме того, в работе Шарпан К. и соавт., 2016 говорится, что среди 20 исследований, проведенных на приматах, ни одно не показало каких-либо значимых отличий биоаналога от оригинального лекарственного средства.

Тем не менее производители биоаналогов МкАТ в России в программу доклинических исследований включают исследования фармакокинетики, токсичности при многократном введении с токсикокинетикой и иммуногенностью на приматах, что позволяет упредить возможные риски на аналитическом этапе, который может занимать подчас более длительное время, чем стандартные токсикологические исследования, особенно в текущий период экономических ограничений и связанных

³ Решение Совета ЕЭК от 03.11.16 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

с ним логистических трудностей в поставке реактивов и тем более большего количества серий оригинальных лекарственных средств. Стоит также отметить, что исследования на приматах, проведенных даже на небольшой выборке, позволяют оценить ключевой аспект — безопасность первого применения биоаналога у человека.

Возможность повторного использования нечеловекообразных приматов. «За» и «против»

На страницах монографии «Консультант GLP-PLANET. Мнение фармацевтической отрасли» хотелось бы инициировать обсуждение еще одного крайне актуального вопроса — возможность повторного использования нечеловекообразных приматов в исследованиях МкАТ. Этот вопрос является, очевидно, своевременным в условиях экономических ограничений, нарушений цепочек поставки приматов из областей естественного обитания (например, Вьетнама) и охватывает как финансовые, так и этические аспекты. В решении ЕЭК № 89⁴, в главе 15.3 подчеркивается, что в случае оценки биоаналогичности не всегда существует необходимость в эвтаназии животных, в том числе в сравнительных исследованиях безопасности. Большинство отечественных разработчиков МкАТ имеют «осторожное» мнение относительно того, что в исследованиях на приматах необходимо использовать только «наивных» животных, ранее не использовавшихся в аналогичных исследованиях. Такая точка зрения является вполне обоснованной, учитывая, как правило, длительный период полувыведения препаратов МкАТ, образование антилекарственных антител, имеющих также длительный период жизни, возможность функционального нарушения органов и систем организма после проведения токсикологических или фармакокинетических исследований.

В рамках международного консорциума инноваций и качества в фармацевтической разработке (IQ, www.iqconsortium.org) была создана специальная рабочая группа, занимающаяся вопросом повторного использования приматов в исследованиях. В рабочую группу вошли представители 15 фармацевтических и биотехнологических компаний. В 2020 г. среди компаний-членов консорциума был распространен опросный лист, который касался общей информации о повторном использовании животных, типах исследований, критериях, позволяющих компаниям проводить подобные исследования. В опросе принимали участие администрация, ученые, руководители исследований, сотрудники по защите прав животных.

Большинство (94%) респондентов опроса указали, что в их организациях разрешено повторное использование приматов в исследованиях лекарственных средств на основе белковых субстанций. Более половины (60%) респондентов сообщили, что для биологических лекарственных средств не используют приматов, которых уже включали в исследования для препаратов на основе низкомолекулярных субстанций. Другими, часто упоминаемыми (67%) проблемами, были доступность и/или надежность истории предыдущих исследований испытательной площадки, если они проводились для другого спонсора. Половина (50%) респондентов указали, что подобные исследования увеличивают риск отклонения результатов экс-

⁴ Решение Совета ЕЭК от 03.11.16 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

перимента регулирующими органами, а 57% сообщили, что повторное использование приматов возможно только для non-GLP-исследований, таких как DRF (dose range finding). Наиболее частой проблемой (более 84% респондентов), связанной с повторным использованием нечеловекообразных приматов, был риск развития реакций гиперчувствительности или аутоиммунных патологий вследствие образования иммунных комплексов. Также озабоченность представляют долгосрочные фармакодинамические эффекты, которые теоретически могут сохраняться даже после длительного периода «отмывки». С более подробными результатами данного опроса можно ознакомиться в публикации Mattis C. и соавт., 2022.

Согласно результатам опроса, наиболее распространенными методами для обеспечения повторного использования приматов являются соблюдение достаточного периода «отмывки», а также скрининг антилекарственных антител. Скрининг наличия антилекарственных антител и перекрестной реактивности до начала исследования представляется практичным и вполне осуществимым подходом, который сопряжен с относительно небольшим риском, но требует дополнительного анализа. Это вполне осуществимо для испытательных площадок, имеющих собственную колонию и разведение приматов, когда известна полная история использования конкретного животного. В работе Mattis C. предложен пример схемы принятия решений о возможности повторного использования приматов (рис. 5).

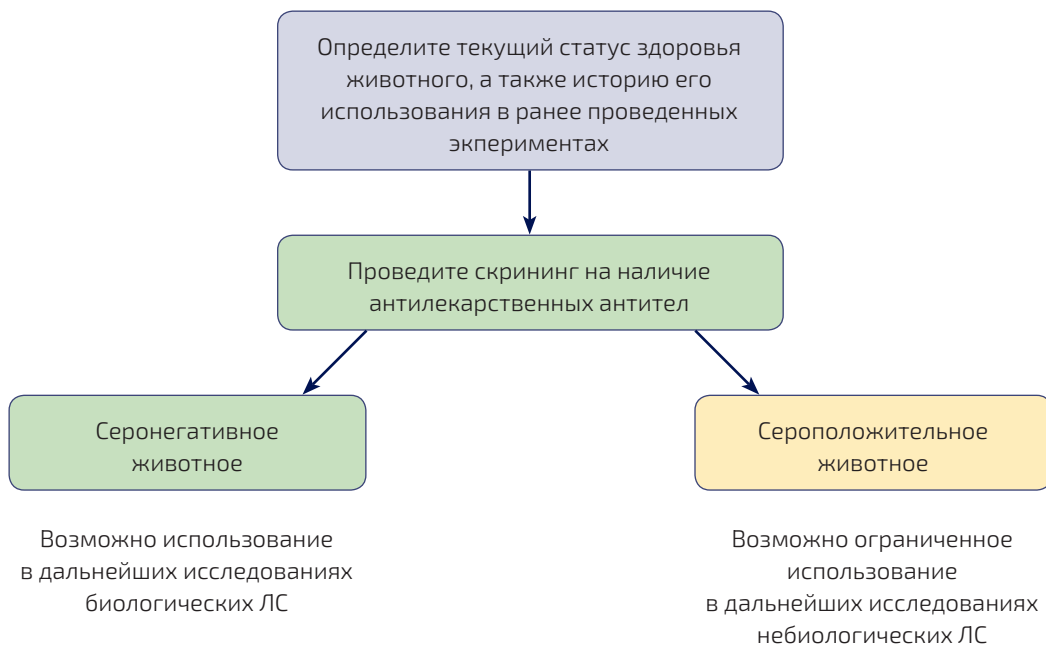


Рис. 5. Пример схемы принятия решения о повторном использовании нечеловекообразных приматов в доклинических исследованиях (Mattis C. и соавт., 2022). ЛС — лекарственное средство

Другие менее используемые критерии отбора животных, упомянутые в ответах на опрос, включали базовую оценку фармакологических конечных точек, мониторинг цитокинов, углубленный мониторинг общего состояния, использование инструментов *in silico* для прогнозирования вероятности иммуногенности, анализы стимуляции В-клеток/Т-клеток *in vitro*.

Приведенные выше результаты опроса подтверждают высокую заинтересованность как испытательных центров, так и фармацевтических компаний в повторном исследовании нечеловекообразных приматов при корректном научном обосновании. Преимуществом повторного использования приматов является общее сокращение количества животных, использованных в экспериментальных целях, существенное сокращение расходов на закупку и транспортировку, сокращение общего времени проведения исследований, использование адаптированных к манипуляциям животных. Для внедрения этой практики должна быть проведена большая совместная работа испытательных площадок и спонсоров по разработке оптимальных критериев повторного включения животных в эксперимент. И пусть это будет только начало пути, но пути в верном направлении.

Иммунобиологические лекарственные препараты. Вакцины

Хорошо известно, что вакцинация является одним из наиболее эффективных средств для профилактики серьезных, а иногда и смертельно опасных инфекционных заболеваний. Как видно во время эпидемии вируса Эбола, пандемий COVID-19 и гриппа, возникающие инфекционные заболевания с высокой контагиозностью и вирулентностью представляют существенную угрозу для общественного здравоохранения.

Технологии производства вакцин развивались на протяжении многих лет, и на сегодняшний день существуют десятки различных технологических платформ против вирусных и бактериальных инфекций (Ghattas M. и соавт., 2021). Например, для борьбы с новой коронавирусной инфекцией разработаны живые аттенуированные и инактивированные вакцины, субъединичные белковые и пептидные вакцины, векторные рекомбинантные, ДНК- и РНК-вакцины и др. (Онищенко и соавт., 2021).

В основе механизма действия всех типов вакцин лежит стимуляция и подготовка иммунной системы человека распознавать определенные патогены, реагировать на них и «запоминать» эту встречу. Для повышения иммуногенности (способности индуцировать иммунный ответ) в состав вакцин зачастую включают дополнительные компоненты адъюванты.

Для вакцин, как и для любого нового оригинального лекарственного средства, требуется доказательство безопасности и эффективности в доклинических и клинических исследованиях. Детальный обзор современных нормативных требований к проведению доклинических исследований профилактических вакцин представлен в недавно опубликованной работе ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Горенкова Д.В. и соавт., 2023 г. Так, с 2000-х годов Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) и ведущими регуляторными органами мира было подготовлено более 40 нормативных документов, в которых описаны те или иные стороны проведения доклинических исследований (ДКИ) эффективно-

сти и безопасности вакцин. В настоящее время проводится работа по подготовке нормативно-правовой базы ЕЭК для вакцин, включая основанные на инновационных платформах (Горенков Д.В. и соавт., 2023).

Поскольку вакцины представляют собой очень многообразный класс препаратов с разными механизмами иммунологической защиты и основанные на разных технологических платформах, единой стратегии для проведения доклинических исследований не существует. Основные документы разработаны ВОЗ, координирующей проведение мероприятий по борьбе с инфекционными заболеваниями (Горенков Д.В. и соавт., 2023). Общие принципы программы ДКИ вакцин изложены в руководстве ВОЗ 2005 г.⁵, также существует более 30 различных рекомендаций ВОЗ по тестированию отдельных видов вакцин, включая вакцины против гриппа, полиомиелита, энтеровирусной инфекции, вируса Эбола и др. (Горенков Д.В. и соавт., 2023).

В общем случае ДКИ вакцин включают в себя оценку иммуногенных свойств (способности стимулировать гуморальный и/или клеточный иммунный ответ), эффективности (протективных свойств) и безопасности (в том числе общетоксических свойств, местной переносимости, фармакологической безопасности, репродуктивной токсичности, пирогенности, в ряде случаев риска развития антителозависимого усиления инфекции).

В исследовании общетоксических свойств отдельное внимание необходимо уделить дизайну исследования. Так, для обеспечения уверенности в безопасности графика дозирования, количества введений в исследованиях токсичности вакцин рекомендуется превышать количество, запланированное в клинической практике, по крайней мере еще на одно введение (Forster R. и соавт., 2012), при этом интервал между введениями может быть сокращен до 2–3 нед.⁶ Традиционными путями введения при вакцинации являются внутримышечный, подкожный или внутривоженный пути. В руководящих документах подчеркивается необходимость введения полной дозы для человека (как правило, 0,5 мл), что для грызунов зачастую превосходит максимально возможный допустимый объем (в частности, для сирийских хомячков максимальный объем для внутримышечного введения составляет 0,2 мл на участок). В таких случаях допустимым считается разделение конечного объема на несколько участков (Forster R. и соавт., 2012).

Согласно решению ЕЭК № 89⁷, для большинства вакцин (живых аттенуированных, субъединичных рекомбинантных) не требуется изучение фармакокинетики/биораспределения, генотоксичности и канцерогенности. Тем не менее для вакцин нового поколения, таких как ДНК- или РНК-вакцины, в программе ДКИ необходимо учитывать соответствующие риски, связанные с особенностями их конструкции и механизмов действия.

Как подробно представлено в работе Горяева А.А. и соавт. 2018, потенциальные проблемы безопасности ДНК- и РНК вакцинации связывают с «...1) возмож-

⁵ WHO guidelines on non-clinical evaluation of vaccines, Annex 1, TRS No. 927. WHO. 2005.

⁶ Там же.

⁷ Решение Совета ЕЭК от 03.11.16 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

ной интеграцией плазмидной ДНК в хромосомы клеток человека; 2) развитием иммунопатологических реакций и рисков, связанных с образованием аутоантител к плазмидной ДНК, потенциально вызывая или ускоряя развитие системных аутоиммунных заболеваний (таких как системная красная волчанка), либо индуцированием местного воспалительного ответа против трансформированных клеток, экспрессирующих кодируемый вакциной антиген, способствуя развитию органоспецифического аутоиммунного заболевания, либо экспрессией цитокинов или костимуляторных факторов, используемых как адъюванты; 3) развитием толерантности к секретируемому антигену; 4) продолжительностью экспрессии антигена; 5) рисками, связанными с экспрессией других последовательностей гена в клетках млекопитающих или бактерий» [Горяев А.А. и соавт. 2018, с. 78].

Так, в отличие от классических вакцин для ДНК- и РНК-вакцин, необходимо изучать биораспределение, а также длительность присутствия сконструированных плазмид или РНК в организме животных. Такие исследования необходимо проводить в различных тканях и нескольких временных точках в диапазоне от нескольких суток до нескольких месяцев после введения⁸ (Горяев А.А. и соавт., 2018).

Основным вопросом при разработке любой программы ДКИ вакцин является выбор релевантной модели животных как для исследований безопасности, так и эффективности (иммуногенности и протективных свойств). Очевидно, что выбор вида животных должен основываться на совокупности двух обстоятельств.

1. Вид животных должен быть восприимчив к соответствующей инфекции. Это необходимо для адекватной оценки протективных свойств.
2. Исследуемая вакцина должна быть иммуногенна у животных, то есть в ответ на введение должны вырабатываться нейтрализующие антитела в достаточном титре, и/или развиваться Т-клеточный иммунный ответ в зависимости от механизма иммунологической защиты.

Например, для моделирования респираторно-синцитиальной вирусной (РСВ) инфекции в качестве экспериментальной животной модели для тестирования соответствующих вакцин широко используют хлопковых крыс. Известно, что хлопковые крысы наиболее восприимчивы к РСВ-инфекции, несут функциональный набор генов, кодирующих белки Mx1 и Mx2, важнейших компонентов врожденной системы противовирусной защиты человека. У хлопковых крыс можно зафиксировать наличие или отсутствие вакциноассоциированного усиления респираторного заболевания как важнейшего параметра безопасности вакцин для профилактики РСВ-инфекции, что и определило окончательный выбор этого вида животных в качестве незаменимой модели (Сергеева М.В. и соавт., 2022).

Считается, что универсальной моделью ротавирусной инфекции являются поросята-гнотобионты. Это обусловлено значительным сходством в физиологическом развитии, анатомических аспектах и механизмах формирования системного и местного иммунитета младенцев и новорожденных поросят. Благодаря аутбридингу поросята позволяют имитировать разнообразие человеческой популяции,

⁸ Guidelines for assuring the quality and non-clinical safety evaluation of DNA vaccines, Annex 1, TRS No. 941. WHO. 2007. Электронный ресурс: <https://www.who.int/publications/m/item/annex-1-trs941-dna-vax>.

они, как и младенцы, иммунокомпетентны в момент рождения, но иммунологически незрелые. Моделирование инфекции и/или вакцинации на поросятах-гно-тобиотах, получивших или не получивших молозиво, то есть с циркулирующими в кровотоке и присутствующими в кишечнике антителами или же без них, позволяет имитировать сценарии вакцинации детей, получающих смеси либо находящихся на грудном вскармливании (Латышев О.Е. и соавт., 2019).

Хорошо известно, что хорьки являются наиболее подходящей тест-системой для тестирования вакцин для профилактики гриппа. Восприимчивость хорьков к вирусам гриппа обусловлена наличием в их дыхательных путях α -2,6-связанной N-ацетилнейраминовой кислоты, которая облегчает связывание и инициацию репликации вируса (Ng P.S.K. и соавт., 2014). Вирус гриппа при интраназальном введении вирусосодержащего материала реплицируется как в верхних, так и нижних дыхательных путях. Инфекция у хорьков протекает с характерными клиническими симптомами, такими как повышение температуры тела, насморк, вялость, снижение массы тела. В зависимости от серотипа у хорьков может развиваться вирусная пневмония с типичной макро- и микроскопической картиной (Kiseleva I. и соавт., 2020). Формирование гуморального иммунитета в ответ на вакцинацию продемонстрировано не только для разных типов вакцин, включая классические живые (Kiseleva I. и соавт., 2020), цельновирионные инактивированные вакцины (Park J. и соавт., 2022), но и для вакцин нового поколения, например, поливалентной ДНК-вакцины (Guilfoyle K. и соавт., 2021).

В своем сообщении «**Особенности доклинических исследований вакцин против ОРВИ, содержащих адъювант**» генеральный директор АО «Развитие биотехнологий» Игорь Викторович Красильников поделился опытом доклинического исследования гриппозной четырехвалентной субъединичной вакцины на базе корпускулярного адъюванта «Бетусфера». В экспериментах на мышах, а также в клинических исследованиях были установлены достаточные титры нейтрализующих антител ко всем компонентам вакцины, однако у хорьков антитела отсутствовали. Это может быть связано с иммунологической «толерантностью» хорьков к антигенам, входящим в состав вакцины, и/или адъюванту.

Подобные примеры не являются редкостью. Так, например, сирийские хомячки, которых массово использовали как модельный объект инфекции SARS-CoV-2 для тестирования вакцин и синтетических лекарственных средств для профилактики или лечения COVID 19, по данным Меркулевой И. и соавт. (2022) оказались наименее подходящей тест-системой для тестирования иммуногенности и соответственно защитной эффективности вакцин на основе рекомбинантного белка RBD (Merkuleva I. и соавт., 2022).

Эти факты позволяют сформулировать важный тезис о необходимости предварительного подтверждения механизмов иммунологической защиты, а также достаточности иммунного ответа у животных для исследуемых вакцин перед проведением регистрационных доклинических исследований безопасности и защитной эффективности.

При выборе тест-системы для оценки протективных свойств вакцин необходимо учитывать различные аспекты патофизиологии отдельного инфекционного заболевания у человека, в том числе разнообразие симптомокомплекса и особенности

клинического течения у людей разного возраста и пола с наличием сопутствующих заболеваний, длительность и тяжесть заболевания и др. В период пандемии, вызванной новой коронавирусной инфекцией SARS-CoV-2 (2020–2023), были разработаны модели на разных видах животных — трансгенных и линейных мышах, сирийских хомячках, хорьках, нечеловекообразных приматах, карликовых свиньях, кошках и других, однако в полной мере воспроизвести все ключевые аспекты заболевания у человека ни у одного вида так и не удалось (Choudhary S. и соавт., 2022). В частности, такие симптомы, как полиорганная недостаточность, тромбозмимические осложнения, цитокиновый шторм, ассоциированные с тяжелым течением COVID-19 и развитием острого респираторного дистресс синдрома, не наблюдаются ни у одного вида. Степень тяжести патологии также отличается у разных видов, например, у трансгенных мышей и сирийских хомячков можно получить тяжелую степень патологических изменений в легких, в то время как у хорьков и макак-резусов в основном развивается легкая или реже — средняя степень тяжести. Внелегочные проявления, например, неврологические нарушения, наблюдаемые приблизительно у 20% пациентов с COVID 19, удалось воспроизвести только в легкой степени у трансгенных мышей K18-hACE2. В то же время у макак-резусов наблюдали гистологические изменения в центральной нервной системе, но без какой-либо клинической симптоматики. Наиболее распространенные патологические проявления COVID-19 у человека и на моделях животных приведены в табл. 3 (Choudhary S. и соавт., 2022).

Таким образом, не всегда удастся выбрать универсальную тест-систему, учитывающую все аспекты заболевания у человека, и для тестирования вакцин могут потребоваться разные виды животных. Так, наиболее широко в регистрационных исследованиях эффективности и безопасности вакцин для профилактики COVID-19 используют трансгенных мышей, сирийских хомячков, отражающих среднюю и тяжелую степень заболевания, а также макак-резусов с, как правило, легкой и реже средней степенью тяжести патологии.

Считается, что наибольшей трансляционностью в исследованиях вакцин для профилактики COVID 19 обладает модель SARS-CoV-2 инфекции именно у макак-резусов, которые эволюционно, физиологически (в том числе за счет сходства иммунной системы) и генетически наиболее близки к человеку. Модель макаки-резуса широко использовалась в программах доклинических исследований большинства зарегистрированных вакцин, основанных на разных платформах.

В связи с одновременной циркуляцией вируса гриппа и SARS-CoV-2, которое наблюдается в настоящее время, актуальным является разработка поливалентных вакцин с целью обеспечить иммунологическую защиту одновременно для двух острых респираторных инфекций. Так, в своем сообщении «Доклиническое изучение бивалентной вакцины против SARS-CoV-2 и гриппа на макаках-резус» руководитель лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций Ирина Николаевна Исакова-Сивак поделилась опытом доклинического изучения бивалентной вакцины, разрабатываемой в ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», направленной на профилактику вируса SARS-CoV-2 и вируса гриппа, на макаках-резус. В докладе Ирины Николаевны прозвучал важный тезис о необходимости тщательной отработки и валидации моделей

Таблица 3

Распространенные патологические изменения в разных органах и системах при COVID 19 у человека и в моделях инфекции SARS-CoV-2 у разных видов животных

Орган/система	Человек	Модели на животных
Верхние дыхательные пути	Некротический эпителий, воспаление	Хомяки (дикого типа и TГ hACE2), мыши TГ hACE2
Легкие	Диффузное альвеолярное повреждение (ДАП) или ДАП-подобные поражения (некротические пневмоциты, отек, гиалиновая мембрана, гиперплазия пневмоцитов II типа, септальный фиброз)	NHP, сирийские хомяки, мыши (Tг hACE2), хорьки, норки
	Воспаление (нейтрофилы, макрофаги, лимфоциты)	NHP, хомяки (дикого типа и TГ hACE2), мыши (TГ hACE2), хорьки
	Повреждение сосудов (эндотелиит, васкулит, тромбоз)	NHP, хомяки, мыши TГ hACE2, хорьки
	Нейтрофильные внеклеточные ловушки	Хомяки
	Индукцированные вирусом цитопатические изменения: цитомегалия, кариомегалия, двуядерные клетки, многоядерные клетки (синцитий), подозрение на внутрицитоплазмическое или внутриядерное включение	NHP, хомяки
Центральная нервная система	Энцефалит	Мыши TГ hACE2, хомяки TГ hACE2, макака-резус
	Церебральные микрокровоизлияния	Не определено
	Диффузная лейкоэнцефалопатия	»
Печень	Гепатит	Хорьки, мартышки
	Повышенный уровень аминотрансфераз и билирубина	Не определено
Сердце	Миокардит, кардиомиопатия, тромбоземболия	Хомяки (дикого типа и TГ hACE2)

Окончание таблицы 3

Орган/система	Человек	Модели на животных
Почки	Острое повреждение почек (некроз и воспаление канальцев)	Хомяки
	Повреждение сосудов (микротромбы, эндотелиит)	Не определено
	Гломерулопатия	»
Кожа	Воспаление, васкулит, микротромбы (сыпь, везикулы, петехии)	»
Желудочно-кишечный тракт	Воспаление, отек, эндотелиит	»
Эндокринная система	Тиреотоксикоз, гипергликемия, диабетический кетоацидоз	»
Гематологическая/ иммунная система	Количество клеток крови (лимфопения, лейкоцитоз, нейтрофилия, тромбоцитопения)	Африканская зеленая обезьяна, макаки-резус, мыши Tg hACE2
	Показатели свертываемости крови (повышенный уровень D-димера, фибриногена, протромбинового времени)	Не определено
	Маркеры воспаления (IL-6, С-реактивный белок)	»
	Синдром высвобождения цитокинов, цитокиновый шторм (высокая температура, полиорганная дисфункция)	»
	Тромбоэмболические осложнения (инсульт, тромбоз глубоких вен)	»

Примечание. NHP (*non-human primate*) — нечеловекообразные обезьяны;
Tg — трансгенные животные; ACE2 — *Angiotensin-converting enzyme 2*.

инфекционных заболеваний у человека с целью получения надежных результатов эксперимента.

Генотерапевтические лекарственные препараты

Одним из наиболее активно развивающихся направлений современной медицины является генная терапия. Генная терапия человека основана на простом принципе — если заболевание вызвано дефектным геном, то вылечить болезнь будет так же

просто, как заменить дефектную генетическую последовательность функциональной копией. Звучит действительно просто, однако реализовать этот принцип удалось сравнительно недавно.

В 1972 г. в журнале *Science* американскими учеными Теодором Фридманом и Ричардом Роблином была опубликована статья «Генная терапия генетических заболеваний человека?», в которой ученые описали огромный потенциал внедрения последовательностей ДНК в клетки пациентов для лечения генетических заболеваний. Однако они призвали к осторожности при разработке подобной технологии, указав на несколько «скользких» мест (Friedmann T. и соавт., 1976): «...Мы выступаем против любых дальнейших попыток генной терапии у людей, потому что (1) наше понимание таких базовых процессов, как регуляция генов и генетическая рекомбинация в клетках человека, скудно; (2) наше понимание деталей взаимосвязи между молекулярным дефектом и заболеванием является неполным; и (3) у нас нет информации о краткосрочных и долгосрочных побочных эффектах генной терапии» [Friedmann T. и соавт. 1976, с. 953].

Тем не менее очевидные перспективы новейших технологий подталкивали ученых к разработке новых методов лечения.

Первое испытание генной терапии у человека состоялось в 1974 г. В этом исследовании двум пациенткам, страдающим гипераргининемией, нарушением цикла мочевины, внутривенно вводили вирус папилломы Шоппа (SPV) дикого типа с целью введения гена аргиназы. Считалось, что вирус папилломы Шоппа кодирует ген аргиназы, и этот ген может быть передан при введении вируса пациентам. К сожалению, испытание было неудачным. Не было никаких изменений ни в уровне аргинина, ни в клиническом течении гипераргининемии (Carvalho M. и соавт., 2017).

После 16 лет дальнейших исследований в 1990 г. было проведено первое успешное применение препарата генной терапии. Четырехлетняя девочка по имени Ашанти Десилва прошла 12-дневный курс лечения от редкого генетического заболевания, известного как тяжелый комбинированный иммунодефицит. Девочке не хватало ключевого фермента, называемого «аденозиндезаминаза» (ADA), из-за чего ее иммунная система не работала, и она подвергалась постоянному риску заражения инфекцией. Вирусный вектор был использован для введения функциональной копии гена, кодирующего фермент ADA, в иммунные клетки пациентки. Это улучшило функцию ее иммунной системы и позволило жить нормальной жизнью без необходимости полной изоляции во избежание инфекции. Успех лечения стал важной вехой, и на протяжении 1990-х годов с энтузиазмом проводились многочисленные дальнейшие испытания. Однако атмосфера оптимизма длилась недолго, спустя 9 лет генная терапия столкнулась с сокрушительной неудачей — впервые сообщалось о смерти пациента во время клинического испытания⁹.

В 1999 г. 18-летний Джесси Гелсингер записался на экспериментальное исследование генной терапии в Университете Пенсильвании. У него было генетическое заболевание, известное как дефицит орнитинтранскарбамилазы. Болезнь, вызванная генетической мутацией, поставила под угрозу способность его печени обезвреживать токсичный аммиак, который накапливался в его крови. Целью испытания

⁹ Электронный ресурс: <https://www.labiotech.eu/in-depth/gene-therapy-history/>.

было введение рабочей копии отсутствующего гена в клетки его печени с использованием аденовируса для его доставки. Через 4 дня после лечения Гелсингер умер от полиорганной недостаточности, вызванной гиперреакцией иммунной системы¹⁰.

Смерть этого пациента повлияла на всю отрасль и привлекла значительное внимание средств массовой информации. FDA раскритиковало дизайн испытания, приостановило всю университетскую программу генной терапии (одну из крупнейших в мире на то время) и начало расследования 69 других испытаний генной терапии, проходивших по всей стране. Безопасность вирусных векторов оказалась под пристальным вниманием. Было замечено, что генная терапия продвинулась слишком далеко и слишком быстро. Настоятельно рекомендовался более медленный и осторожный подход¹¹.

В статье Arabi F. и соавт., 2022 представлен краткий обзор развития генной терапии начиная с 1909 г. (Arabi F. и соавт., 2022).

Первой страной, которая одобрила продукт на основе генной терапии для клинического применения, был Китай в 2003 г. (Gendicine®). Препарат представляет собой репликационно-дефектный аденовирус 5-го серотипа (rAV5), в котором область E1a, отвечающая за репликацию аденовируса, заменена на последовательность гена *p53* человека. Gendicine® применяется в лечении злокачественных опухолей головы и шеи путем инъекции непосредственно в опухоль курсом 1 раз в неделю на протяжении от 4–8 нед (Солдатов А.А. и соавт., 2022).

Одним из первых в мире и России был зарегистрирован инновационный генотерапевтический препарат Неоваскулген® (ОАО «Институт стволовых клеток человека», зарегистрирован в 2011 г.), представляющий собой кольцевую ДНК (плазмиду), несущую человеческий ген *VEGF 165*, кодирующий синтез фактора роста эндотелия сосудов (VEGF — Vascular Endothelial Growth Factor). С момента регистрации Неоваскулген® успешно используется в комплексной терапии для реваскуляризации при ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза, что, конечно, является гордостью отечественной фармацевтической индустрии.

В 2012 г. EMEA одобрила препарат Glybera® (на основе репликационно-дефектного аденоассоциированного вируса 1-го серотипа) для лечения ультраредкого заболевания, вызванного дефицитом липопротеинлипазы. Хотя первоначально препарат Glybera® был отмечен как прорыв в генной терапии, он в значительной степени потерпел коммерческий провал. При цене в 1 млн евро это был самый дорогой препарат в мире. В 2017 г. терапия была отменена после того, как ее провели лишь у одного пациента¹².

Таким образом, начиная с 2010-х годов, генная терапия переживает настоящий бум. Так, согласно отчету Американской ассоциации генной и клеточной терапии (American Society of Gene + Cell Therapy) совокупный объем привлеченных средств во II квартале 2023 г. в области генной, клеточной и RNA-терапии составил 1,3 млрд долларов США, что вдвое превышает сумму прошлого квартала¹³.

¹⁰ Электронный ресурс: <https://www.labiotech.eu/in-depth/gene-therapy-history/>.

¹¹ Там же.

¹² Электронный ресурс: <https://asgct.org/global/documents/asgct-citeline-q2-2023-report.aspx>.

¹³ Электронный ресурс: <https://asgct.org/global/documents/asgct-citeline-q2-2023-report.aspx#:~:text=Six%20new%20therapies%20were%20approved,approved%20for%20their%20respective%20indications.>

На текущий момент в мире одобрено для клинического применения более 30 препаратов генной терапии и зарегистрировано более 3000 завершенных и текущих клинических испытаний (по данным ресурса Gene Therapy Trials World-wide). Новое поколение препаратов генной терапии находит свое применение в различных областях медицины, в том числе в лечении редких (орфанных), онкологических, гематологических, сосудистых, нейродегенеративных, инфекционных и других заболеваний (Alhakamy N. A. и соавт., 2021).

В мае 2023 г. FDA одобрило первый генотерапевтический препарат «Vjjuvek» (вид-жуvek, беремаген геперпавек) компании Krystal Biotech для лечения дистрофического буллезного эпидермолиза (ДБЭ) у пациентов старше 6 мес. ДБЭ — это редкое хроническое наследственное заболевание, главный признак которого — образование пузырей и мокнущих ран на коже и слизистых оболочках, возникающих при незначительном травмировании. Болезнь вызывается одной или несколькими мутациями в гене *COL7A1*, который отвечает за белок, соединяющий внешний слой кожи с более глубокими слоями. Препарат «Vjjuvek» представляет собой функциональную копию гена *COL7A1*, включенную в вектор на основе непатогенного вируса простого герпеса 1 типа. Попадая в кератиноцит или фибробласт, этот ген, не встраиваясь в ДНК, экспрессируется с выработкой нормального коллагена VII типа. Необычным является то, что препарат представлен в лекарственной форме — мазь для местного применения. При нанесении на кожу трансдуцирует кератиноциты и фибробласты. После попадания в клеточное ядро векторный геном эписомально депонируется. Далее генерируются транскрипты *COL7A1*, что позволяет клеткам производить и секретировать белок COL7. Последний собирается в якорные фибриллы, удерживающие эпидермис и дерму вместе. Согласно интернет-ресурсу¹⁴, в планах Krystal Biotech стоит также разработка глазных капель «Vjjuvek». Для терапии муковисцидоза компания создает ингаляционный генотерапевтический лекарственный препарат (ГТЛП).

Выделяют два основных подхода генной терапии: *ex vivo* и *in vivo*. Терапия *ex vivo* включает в себя забор клеток пациента, модификацию клеточной ДНК (с помощью технологий геномного редактирования, например, CRISPR/CAS), культивирование модифицированных клеток и введение их обратно в организм пациента. Генная терапия *in vivo* подразумевает модификацию клеток-мишеней непосредственно в организме пациента. Подход требует разработки метода доставки генетического материала в конкретные ткани, где находятся пораженные клетки. В качестве систем доставки генетического материала используют вирусные векторы (лентивирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, герпесвирусы и др.), наночастицы, липосомы, а также различные физические методы доставки (электро-, соно-, фотопорация и др.) (Alhakamy N.A. и соавт., 2021; Shahryari A. и соавт., 2021).

Наиболее широко используемой платформой для создания ГТЛП являются аденоассоциированные вирусы (AAV), обладающие сравнительно низкой иммуногенностью, а также отсутствием способности интегрироваться в геном. Первоначально аденоассоциированные вирусы были выделены Atchison и соавт. в 1965 г. из препаратов лабораторного аденовируса в качестве контаминанта (Fakhiri J. и соавт., 2021).

¹⁴ Электронный ресурс: <https://expose-news.com/2023/05/23/fda-approves-first-gene-therapy-ointment/>.

В течение последующих 15–20 лет несколькими группами исследователей были изучены основные аспекты аденоассоциированных вирусов, включая секвенирование генома, механизмы транскрипции и репликации, их вирулентные свойства. AAV относятся к семейству парвовирусов и состоят из капсида, содержащего одноцепочечный геном ДНК длиной около 4,7 т.п.н. Выделено 13 серотипов AAV и более 100 вариантов этих серотипов описано у различных видов животных. Эти серотипы можно разделить на 6 кладов (A–F), имеющих общие функциональные и серологические особенности, и 2 клональных изолята (AAV4 и AAV5). Последовательности AAV были обнаружены в селезенке и печени человека и нечеловекообразных приматов, а также в различных других тканях, включая мозг, толстую кишку, легкие, почки и костный мозг. Уже давно было замечено, что замена генов репликации (*rep*) и капсида (*cap*) на новую ДНК может превратить AAV дикого типа в эффективное средство доставки новых генных последовательностей (Singh и соавт., 2023). В настоящее время зарегистрировано как минимум 6 препаратов на основе различных AAV — Luxturna® (AAV2), Zolgensma® (AAV9), Glybera® (AAV1), Roctavian® (AAV5), Upstaza® (AAV2) и Hemgenix® (AAV5) (Singh M. и соавт., 2023).

Учитывая сложность и инновационность препаратов генной терапии, у производителей возникает множество вопросов к программам как доклинических, так и клинических исследований. Вопросы подготовки программы доклинических исследований на конференции GLP-planet IV осветила Галина Нинелевна Енгальчева, главный эксперт управления № 2 по эффективности и безопасности лекарственных средств Минздрава России, которая предоставила доклад от группы экспертов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России «Рекомендации по доклиническому изучению генотерапевтических лекарственных средств».

Генотерапия является динамично развивающимся направлением, происходит регулярное обновление нормативно-методических рекомендаций по доклиническим исследованиям, появляются публикации по оценке соотношения пользы и риска. При разработке программы доклинических исследований необходимо проанализировать всю актуальную информацию и использовать актуальные международные рекомендации по изучению безопасности ГТЛП.

Из определения, представленного в решении ЕЭК № 78, следует, что ГТЛП — это биологический препарат, содержащий активное вещество, содержащее рекомбинантную нуклеиновую кислоту или состоящее из нее, используемую или вводимую человеку с целью регулирования, восстановления, замены, добавления или удаления генетической последовательности. В соответствии с данным документом ГТЛП подразделяют на препараты, содержащие последовательность рекомбинантных нуклеиновых кислот или генетически модифицированный микроорганизм или вирус, и ГТЛП, имеющие генетически модифицированные клетки. Вместе с препаратами тканевой инженерии, препараты на основе соматических клеток ГТЛП относят к высокотехнологическим лекарственным препаратам¹⁵. Для определения объема и видов доклинических исследований необходимо учитывать дизайн и вид ГТЛП. Особые требования ЕЭК к доклиническим исследованиям безопасности ГТЛП включают изучение токсичности готового препарата, а также отдельные испыта-

¹⁵ Решение Совета ЕЭК от 03.11.16 № 87.

ния фармацевтической субстанции и вспомогательных веществ с учетом эффектов в условиях *in vivo* продуктов экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, которые не предназначены для оценки их физиологической функции. В документе отмечено, что в зависимости от персистенции ГТЛП и ожидаемых потенциальных рисков продолжительность исследований может превышать стандартные токсикологические эксперименты. В досье необходимо представить результаты изучения интеграции ГТЛП или обоснование нецелесообразности проведения данного вида исследований. При этом если по результатам исследований биораспределения обнаруживается риск генеративной передачи ГТЛП, предположительно не способных к интеграции, исследования интеграции являются необходимыми.

Решение совета ЕЭК № 78¹⁶ рекомендует при разработке ГТЛП использовать рискориентированный подход для определения объема необходимых сведений, требований к качеству, доклиническим и клиническим исследованиям. В качестве основных рисков указаны:

- природа генотерапевтического лекарственного препарата;
- способность к репликации вирусов или размножению микроорганизмов, используемых *in vivo*;
- степень интеграции последовательностей нуклеиновых кислот или генов в геном;
- продолжительность функционирования (существования);
- риск онкогенности;
- способ введения или использования.

Риски генной терапии и возможности их снижения являются предметом широкого научного обсуждения. Табл. 4 иллюстрирует потенциальные идентифицированные на сегодняшний день риски генной терапии и стратегию их снижения.

Bittlinger и соавт. (2022) выделили 9 категорий риска ГТЛП, использующих технологию переноса генов (вирусные векторы, дизайнерские нуклеазы, технологии CRISPR/Cas) для проведения SWOT-анализа препарата.

1. Эпигенетическая нестабильность (Epigenetic instability) — потенциальная потеря функции трансгена в результате генетической нестабильности или снижения регуляции экспрессии.
2. Инсерционный мутагенез (Insertional mutagenesis) — нежелательная дерегуляция или нарушение работы клеточных генов в результате нецелевого внедрения трансгена в клеточную хромосомную ДНК, потенциально вызывающее клональный дисбаланс или злокачественную трансформацию.
3. Carrier genotoxicity — повреждения ДНК, такие как разрывы цепей ДНК, хромосомная нестабильность, дупликация ДНК или транслокация из-за процедур трансфекции, используемых для переноса нуклеиновых кислот, или ДНК-модифицирующих ферментов, используемых для генной инженерии клеток-мишеней.
4. Фенотоксичность (Phenotoxicity) — нежелательные эффекты, связанные с экспрессией трансгена и не опосредованные антигенами; например, передозировка трансгенного продукта из-за вмешательства в клеточный или системный метаболизм.

¹⁶ Решение Совета ЕЭК от 03.11.16 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

Таблица 4

Потенциальные риски генной терапии (по Anguela X.M. и соавт., 2019)

Риск	Стратегия снижения риска
Подавление гена — репрессия промотора	Применение эндогенных клеточных промоторов, исключение регуляторных последовательностей вирусного происхождения
Генотоксичность — осложнения, связанные с инсерционным мутагенезом	Применение векторных систем с более безопасным профилем интеграции (например, самоинактивирующиеся лентивирусные векторы). Интеграция, специфичная для конкретной последовательности (редактирование генома)
Фенотоксичность — осложнения, связанные с избыточной экспрессией или экспрессией трансгена в неверном регионе генома	Контроль экспрессии трансгена в пространстве (например, эндогенные, тканеспецифичные промоторы)
Иммунотоксичность — опасный иммунный ответ на вектор или трансген	Тщательный контроль реактивности Т-клеток к вектору и трансгену, использование при необходимости иммуносупрессии
Риск горизонтальной передачи — выделение инфекционного вектора в окружающую среду	Контроль выделения вектора в доклинических моделях при разработке новых векторов
Риск вертикальной передачи — внедрение донорской ДНК в клетки зародышевой линии	Использование методов барьерной контрацепции пока выделение вируса не прекратится

5. Иммунотоксичность трансгенного продукта (Transgene product immunotoxicity) — нежелательные иммунные реакции против трансгенного продукта, например, нейтрализация терапевтических белков, делеция генно-модифицированных клеток или аутоиммунные реакции.
6. Carrier immunotoxicity — нежелательные эффекты иммунных реакций на компоненты лекарственного средства, отличные от трансгенного продукта.
7. Токсичность (неиммуногенная), не связанная с трансгенным продуктом (Carrier toxicity, non-immunogenic), — все неиммунные и негенотоксические эффекты, отличные от трансгенного продукта, в том числе обусловленные способом применения ГТЛП (например, стереотаксическая нейрохирургия).
8. Горизонтальная передача (Horizontal transmission) — потеря вектора (распространение вирусов в жидкостях организма, таких как сыворотка, моча, сперма и др.) и выделение генетического материала в окружающую среду.
9. Передача по зародышевой линии (Germline transmission) — горизонтальная передача трансгена в половые клетки или вертикальная передача потомству человека, несущему последовательности трансгена во всех ядродержащих клетках организма.

Авторами статьи были опрошены 15 специалистов в области генной терапии/редактирования генома, которые признали полезность анализа выделенных рисков при принятии решения о возможности проведения клинического исследования ГТЛП. При этом все эксперты акцентировали внимание на том, что адекватная оценка соотношения пользы и риска ГТЛП должна проводиться в каждом конкретном случае с обязательным учетом информации о пациенте (патология, для которой разрабатывается ГТЛП, возраст, сопутствующие заболевания).

Перечень рисков ГТЛП не является исчерпывающим. С появлением новых технологий редактирования генома (например, CRISPR) гипотетически могут возникнуть новые формы токсичности, о которых на сегодняшний день ничего неизвестно (Anguela X.M. и соавт., 2019). В статье Рачинской О.А. и соавт. (2023) проведен анализ рисков, связанных с применением препаратов на основе систем редактирования генома, предложены методы их снижения.

В докладе Галина Нинелевна подчеркнула, что программа доклинических исследований разрабатывается отдельно для конкретного ГТЛП, а при обосновании ее адекватности применяют подход, основанный на анализе рисков, которые рекомендуется включать в досье на разрабатываемый лекарственный препарат.

В докладе были даны рекомендации по проведению отдельных видов токсикологических исследований ГТЛП.

Токсические эффекты необходимо оценить в отношении самого ГТЛП (ГТ-конструкции) и продуктов экспрессии.

Конечные точки исследований фармакологической безопасности (влияние на жизненно важные системы организма) могут быть включены в исследования общетоксического действия и биораспределения. При этом продолжительность наблюдения нуждается в коррекции для оценки отсроченных эффектов. Дополнительные/уточняющие исследования фармакологической безопасности проводят в зависимости от оценки биораспределения, селективности препарата, доклинических и клинических данных.

В табл. 5 указаны органы, ткани и биологические жидкости, анализируемые при изучении биораспределения ГТЛП¹⁷. Эта панель может быть расширена в зависимости, например, от типа переносчика/тканевого тропизма, продукта экспрессии, пути введения, патофизиологии заболевания, пола и возраста животного. Решение об окончательном отборе проб принимается в зависимости от особенностей ГТЛП, целевой клинической популяции, пути введения и имеющихся доклинических данных.

Применение ГТЛП может вызывать иммунологические реакции, в связи с чем необходимо предусмотреть мероприятия для снижения этого риска при проведении клинического исследования. Наличие в популяции иммунитета к различным серотипам вирусов, используемых в качестве платформ для векторов (адаптивный иммунитет к капсиду и чужеродному трансгену), снижает эффективность терапии. Существует риск иммуногенности, обусловленный технологией редактирования генома и иммуногенность невирусных векторов (например, липосом). При разработке ГТЛП целесообразно оценивать иммуногенность (антивекторный иммунный ответ) независимо от предполагаемой клинической частоты применения препарата. Изучение развития иммунологических реакций (иммунотоксичность, полиорганные воспа-

¹⁷ ICH harmonized guideline S12 on nonclinical biodistribution consideration for gene therapy products. 2023.

Таблица 5

Анализируемые органы/ткани/биологические жидкости (биораспределение)

Место введения	Печень
Половые железы	Почки
Надпочечники	Легкие
Головной и спинной мозг (шейный, грудной, поясничный отделы)	Сердце
	Селезенка
	Кровь

Примечание. Дополнительные ткани/биожидкости могут включать периферические нервы, ганглии дорсального корешка, спинно-мозговую жидкость, стекловидное тело, дренирующие лимфатические узлы, костный мозг, глаза и зрительный нерв.

лительные реакции, отложение иммунных комплексов, цитокиновый шторм и др.) может быть частью исследования общетоксического действия препарата. О риске перекрестной реактивности/фоновых аутоиммунных реакциях указано в руководстве ЕМА/CAT/80183/2014¹⁸. Также важно при разработке педиатрических ГТЛП учитывать незрелость иммунной системы у ювенильных животных.

Оценка местной переносимости при проведении токсикологических исследований является обязательной. Учитывают реакции в месте введения ГТЛП (наличие воспалительной инфильтрации, миодегенерации, состав клеточного инфильтрата и др.).

Программа доклинических исследований ГТЛП должна предусматривать оценку отдаленных рисков. Так, интеграцию векторной ДНК, онкогенный потенциал рекомендуется также изучить, даже если случайное встраивание не ожидается, и хранить образцы для последующих исследований интеграции по запросу регулятора. Стандартные исследования генотоксичности и канцерогенности ГТЛП не проводят, онкогенный потенциал рекомендуется оценивать *in silico* и при фиксации риска онкогенности выполнять соответствующие исследования.

Стандартные исследования репродуктивной токсичности ГТЛП являются малоинформативными. Руководство ЕМА/CAT/80183/2014¹⁹ рекомендует их проводить только для восполнения определенных пробелов в информации: проникновение через плацентарный барьер и влияние на эмбриофетальное развитие, уровень векторной ДНК в гонадах, гаметах, вирусывыделение (данные исследования должны быть проведены до первого применения у человека). В досье ГТЛП рекомендуется предоставлять обоснование нецелесообразности выполнения данного вида исследований.

Оценка риска для окружающей среды — это обязательный вид исследований, результаты которых должны быть представлены в досье ГТЛП. Согласно руководству ЕМА EMEA/CHMP/GTWP/125491/2006²⁰, риски включают выделение в окружающую

¹⁸ Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA/CAT/80183/2014. EMA. 2018.

¹⁹ Электронный ресурс: <https://asgct.org/global/documents/asgct-citeline-q2-2023-report.aspx>.

²⁰ Guideline on scientific requirements for the environmental risk assessment of gene therapy medicinal products. EMEA/CHMP/GTWP/125491/2006. EMA. 2008.

среду векторных частиц, образование рекомбинантных вирусов во время производства или после инфузии ГТЛП, инсерционный мутагенез. Также существует риск непреднамеренного воздействия на популяцию, для которой ГТЛП не предназначен, возникновения сверхэкспрессии нормального человеческого белка, индукция иммунного ответа против частиц-переносчиков. Для оценки рисков для окружающей среды могут быть рекомендованы исследования выделения ГТЛП с секретами и физиологическими жидкостями (слюной, слезами, потом и др.) методом ПЦР, которые целесообразно объединять с доклиническим изучением фармакокинетики. Не рекомендуется использование в генотерапевтическом препарате генов устойчивости к антибиотикам. В исключительных случаях при разработке такого препарата перед первым применением у человека необходимо изучить непреднамеренную экспрессию гена устойчивости в соматических клетках человека. Также необходимо оценить риск непреднамеренного образования способного к репликации провируса.

Детальное обсуждение программы доклинических исследований ГТЛП, включая особенности дизайна, ключевых экспериментальных точек, описание отдаленных рисков, представлено в недавней публикации ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России «Генотерапевтические препараты: аспекты доклинического изучения безопасности» (Астапова О.В. и соавт., 2023).

Как и для любого биологического лекарственного препарата, вопрос выбора релевантной модели животных для регистрационных исследований безопасности и эффективности ГТЛП является ключевым при подготовке программы исследований. Выбор релевантных животных для доклинических исследований разрабатываемого ГТЛП должен быть подробно обоснован разработчиком в материалах регистрационного досье и основываться на сходстве между экспериментальным видом животного и человеком (Астапова О.А. и соавт., 2023). Примеры критериев для обоснования релевантности экспериментальных животных с человеком:

- трансдукция;
- тканевое распределение;
- экспрессия клеточных рецепторов вектора (селективность, изоляция);
- способность вектора к репликации в тканях;
- активность регуляторных элементов (промоторов, энхансеров и др.);
- гомологичность;
- биологический ответ на продукт трансгена;
- фармакокинетические параметры;
- прочее.

Так, например, для препарата Luxturna® (rAAV2-вектор, содержащий ген белка пигментного эпителия сетчатки глаза человека *hRPE65* для лечения дистрофии сетчатки с биаллельной мутацией в гене *RPE65*) в качестве модельной тест-системы в исследованиях эффективности и безопасности использовали собак породы бриар (французская овчарка) с аналогичной мутацией.

RPE65 — это ген, связанный с пигментным эпителием сетчатки (RPE). Слой клеток RPE в глазах людей, собак и других млекопитающих поддерживает сетчатку, обеспечивая питание и удаляя отходы жизнедеятельности, одновременно снабжая фоторецепторы витамином А. Человек с дефектным геном *RPE65* вырабатывает мутантную форму белка *RPE65*, что приводит к ранней потере зрения, дегенерации

сетчатки и почти полной слепоте к 10 годам. Генетическое заболевание носит имя впервые его описавшего в 1869 г. немецкого офтальмолога Теодора Лебера — врожденный амавроз Лебера 2-го типа — это тяжелое аутосомно-рецессивное наследственное заболевание сетчатки, которое приводит к сильному ухудшению зрения и слепоте. Оно встречается у 1 человека из 33 тыс. во всем мире.

Мутация, лежащая в основе дефицита RPE65 у собак, произошла у породы бриар и первоначально изучалась в Швеции (Narfström и соавт., 1989). Первоиспытателем инновационного метода лечения и подтверждением перспектив генной терапии стала собака по кличке Ланселот (рис. 7), которой субретинально ввели аденоассоциированный вектор, кодирующий ген нормального белка RPE65. Через 3 мес после однократной инъекции у собаки подтвердили восстановление зрения. В настоящее время патология у собак хорошо исследована и описана, поддерживается специальная колония этой породы с мутантной аллелью в гене RPE65 (Annear M.J. и соавт., 2021).



Рис. 7. Собака по кличке Ланселот.
Займствовано из открытого источника²¹

При исследовании эффективности, а также различных аспектов безопасности для ГТЛП широко используются генетически модифицированные животные. Так, руководитель направления экспериментального моделирования и доклинической разработки лекарственных средств АО «БИОКАД» Марина Альбертовна Оганова в своем докладе «**Опыт разработки моделей для оценки специфической активности генотерапевтических лекарственных препаратов**» поделилась опытом и особенностями использования моделей животных с редактированным геномом, воспроизводящих клинические признаки спинальной мышечной атрофии (СМА) и гемофилии В. Обе модели широко используются для исследований эффективности ГТЛП. Так, модель SMNΔ7 воспроизводит невропатологию и симптомы, сходные с теми, что наблюдаются у пациентов, страдающих СМА. Модель SMNΔ7 характеризуется гибелью животных на 13–22-й день после рождения. При этом с целью регистрации специфической активности введение препарата необходимо начинать в 1-й или 2-й день после рождения. В этом возрасте введение является достаточно сложной манипуляцией, требующей особых навыков персонала. Основными критериями эффективности препаратов являются в первую очередь выживаемость животных, а также масса тела. Как отметила Марина Альбертовна, в рамках исследования эффективности ГТЛП на моделях заболеваний необходимо подтверждать экспрессию целевого гена в тканях-мишенях.

²¹ Электронный ресурс: <https://news.cornell.edu/stories/2001/04/gene-therapy-restores-vision-dogs-blinded-inherited-disease-bringing-new-hope>.

Не всегда требуется использование генетически модифицированных животных или животных с врожденной патологией. Примером такой модели для исследований фармакологической активности офтальмологических ГТЛП является модель возрастной макулярной дегенерации (ВМД, макулодистрофия, дегенерация «желтого пятна») у кроликов. ВМД — это хроническое прогрессирующее заболевание заднего отдела глазного яблока, характеризующееся дистрофическими процессами в центральной зоне сетчатки и сосудистой оболочке глаза. Это ведущая причина необратимой слепоты среди пожилых людей. Неоваскулярный (экссудативный или влажный) тип встречается приблизительно у 10% пациентов с ВМД. Неоваскулярная ВМД (нВМД) характеризуется хориоидальной неоваскуляризацией, сочетающейся с экссудацией, интравитреальными и субретинальными кровоизлияниями, отслойкой пигментного эпителия сетчатки, твердым экссудатом или субретинальным фиброзным рубцом. Согласно статистике, к 2040 г. число пациентов, страдающих этим заболеванием, во всем мире составит 288 млн человек (Mitchell P. и соавт., 2018). Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является основным медиатором ангиогенеза и предрасполагающим фактором развития данной патологии. Появление молекул анти-VEGF радикально изменило лечение нВМД. Интравитреальное введение молекул анти-VEGF способствует профилактике потери зрения и является текущим стандартом лечения пациентов с нВМД. Однако широко используемые в клинике анти-VEGF-препараты, включая бевацизумаб, ранибизумаб, афлиберцепт, конберцепт и бролуцизумаб, имеют относительно короткий период полувыведения, что требует повторных инъекций и может вызвать внутриглазное воспаление, отслойку сетчатки и кровоизлияние. Генная терапия решает эту проблему с помощью прямой доставки вирусного вектора, кодирующего гены антиангиогенных белков. Эти методы способны обеспечить долговременный эффект терапии. Генотерапевтические препараты на основе AAV являются наиболее популярной векторной системой для генной терапии, применяемой в офтальмологии, из-за отсутствия возможности интеграции в геном, низкой иммуногенности и потенциальной долгосрочной экспрессии генов. Наиболее широко изученными в глазной генной терапии являются AAV2, AAV5 и AAV8. У кроликов нВМД индуцируется интравитреальным введением DL-альфа-аминоадипиновой кислоты (DL-AAA). DL-AAA — токсин глиальных клеток сетчатки, который обеспечивает стабильную и персистирующую хроническую неоваскулярную патологию сетчатки и усиленную проницаемость сосудов, сходную с нВМД человека (Kumar S. и соавт., 2022).

При выборе подходящего вида животных необходимо учитывать и другие аспекты: трансдукцию, инфекционную способность вектора реплицироваться в тканях, тканевое распределение и экспрессию клеточных рецепторов вектора (селективность, изоляция), активность регуляторных элементов (промоторов, энхансеров и др.), гомологичность и биологический ответ на продукт трансгена, допустимый объем для введения животным, особенности фармакокинетики (Астапова О.В. и соавт., 2023). Например, каждый серотип AAV имеет определенный тропизм к тканям или органам, что, очевидно, нужно учитывать при выборе тест-системы. В табл. 6 представлена характеристика тропности AAV к различным тканям человека и разных видов лабораторных животных (Singh M. и соавт., 2023).

Рассмотренные на конференции вопросы доклинических исследований биоаналогов моноклональных антител, иммунобиологических препаратов и геноте-

Таблица 6

Характеристика тропности различных серотипов аденоассоциированного вируса к тканям и органам человека и лабораторных животных (Singh M. и соавт., 2023)

AAV серотип	Тропность к тканям					
	Человека	Мыши	Крысы	Собаки	Карликовой свиньи	Нечеловекообразных приматов
AAV1	Мышцы, сердце, головной мозг	Сердце, печень, мышцы, почки, легкие, глаза, уши, головной мозг, матка, яичники	Головной мозг, нейроны, сердце, печень	Мышцы	Сердце, легкие, уши	Головной мозг, нейроны, печень, уши, легкие
AAV2	Глаза, головной мозг, легкие, печень, мышцы	Хрящ, глаза, уши, головной мозг, нейроны, мышцы, поджелудочная железа, печень, почки, селезенка, сердце, яички, спинной мозг	Печень, селезенка, сердце, глаза, головной мозг, нейроны	Печень, глаза, головной мозг, мышцы	Легкие, глаза, спинной мозг	Нейроны, легкие, глаза, печень, головной мозг
AAV3	Печень	Сердце, печень, задняя конечность, мышцы	Нейроны, центральная нервная система	Печень	—	Печень
AAV4	Глаза	Сердце, легкие, почки, поджелудочная железа, головной мозг	Центральная нервная система, нейроны	—	Легкие	Головной мозг
AAV5	Печень, головной мозг, глаза	Сердце, печень, мышцы, головной мозг, нейроны, почки, легкие, глаза	Головной мозг	Печень, головной мозг	Головной мозг	Головной мозг, глаза, печень
AAV6	Печень	Сердце, печень, мышцы, почки, легкие, головной мозг, глаза	Головной мозг, нейроны, сердце	Легкие, печень, мышцы	Сердце	Нейроны, головной мозг, мышцы, селезенка, печень
AAV7	Печень, мышцы	Сердце, печень, почки, яички, мышцы, нейроны, головной мозг	Сердце	Печень	Головной мозг, спинной мозг	Головной мозг, спинной мозг

Окончание таблицы 6

AAV серотип	Тропность к тканям					
	Человека	Мыши	Крысы	Собаки	Карликовой свиньи	Нечеловекообразных приматов
AAV8	Печень, глаза, мышцы	Уши, нейроны, печень, глаза, головной мозг, сердце, печень, диафрагма, мышцы бедра	Головной мозг, сердце	Печень, уши, мышцы, нейроны, глаза, сердце	Глаза, печень	Головной мозг, спинной мозг
AAV9	Глаза, мышцы, спинной мозг, головной мозг	Печень, нейроны, головной мозг, спинной мозг, легкие, почки, мышцы, сердце, глаза, яички	Глаза, спинной мозг, нейроны	Печень, мышцы, сердце, головной мозг	Головной мозг, спинной мозг, сердце	Нейроны, головной мозг, мышцы, сердце, печень, легкие, трахея, селезенка
AAV10	Головной мозг (AAVrh. 10), печень	Печень, сердце, мышцы, легкие, почки, матка	Нейроны, головной мозг	Головной мозг	—	Подвздошная кишка, печень, почки, надпочечники
AAV11	—	Нейроны, мышцы, селезенка, легкие, сердце, желудок, почки	—	—	—	Подвздошная кишка, печень, мышцы, головной мозг, спинной мозг
AAV12	—	Нос, слюнные железы, мышцы	—	—	—	—
AAV-BR1	—	Головной мозг, сердце, легкие, эндотелиальные клетки сетчатки	—	—	—	—
AAV/Oligo001	—	Головной мозг	—	—	—	—

Примечание: «—» — тропность отсутствует.

рапевтических лекарственных средств чрезвычайно важны на сегодняшний день. Фармацевтическая безопасность страны и доступность лекарственных средств для населения — это серьезная задача, которая решается на протяжении длительного периода. Возможность обмена мнениями по этим вопросам между научным сообществом, фармацевтическими компаниями и экспертами, несомненно, приведет к повышению эффективности и ускорению вывода на рынок современных и эффективных лекарственных средств.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Acland G.M. et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness // *Nature genetics*. 2001. Vol. 28. N 1. P. 92–95.
2. Alhakamy N.A., Curiel D.T., Berkland C.J. The era of gene therapy: From preclinical development to clinical application // *Drug discovery today*. 2021. Vol. 26. N. 7. P. 1602–1619.
3. Alt N. et al. Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles // *Biologicals*. Elsevier BV. 2016. Vol. 44. N. 5. P. 291–305.
4. Anguela X.M., High K.A. Entering the modern era of gene therapy // *Annual review of medicine*. 2019. Vol. 70. P. 273–288.
5. Annear M.J. et al. A comprehensive study of the retinal phenotype of Rpe65-deficient dogs // *Cells*. 2021. Vol. 10. N 1. P. 115.
6. Arabi F., Mansouri V., Ahmadbeigi N. Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022. Vol. 153. P. 113324.
7. Bittlinger M. et al. Risk assessment in gene therapy and somatic genome-editing: An expert interview study // *Gene and Genome Editing*. 2022. Vol. 3. P. 100011.
8. Carvalho M., Sepodes B., Martins A.P. Regulatory and scientific advancements in gene therapy: state-of-the-art of clinical applications and of the supporting European regulatory framework // *Frontiers in medicine*. 2017. Vol. 4. P. 182.
9. Chapman K. et al. Waiving in vivo studies for monoclonal antibody biosimilar development: national and global challenges // *MABs*. Taylor & Francis. 2016. Vol. 8. N. 3. P. 427–435.
10. Chiu M.L. et al. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics // *Antibodies*. MDPI AG. 2019. Vol. 8. N. 4. P. 55.
11. Cho I.H. et al. Evaluation of the structural, physicochemical, and biological characteristics of SB4, a biosimilar of etanercept // *mAbs*. Informa UK Limited. 2016. Vol. 8. N. 6. P. 1136–1155.
12. Choudhary S., Kanevsky I., Tomlinson L. Animal models for studying COVID-19, prevention, and therapy: Pathology and disease phenotypes // *Veterinary Pathology*. 2022. Vol. 59. N. 4. P. 516–527.
13. Fakhiri J., Landegger L.D., Grimm D. Breaking the sound barrier: Towards next-generation AAV vectors for gene therapy of hearing disorders // *Hearing Research*. 2022. Vol. 413. P. 108092.
14. Forster R. Study designs for the nonclinical safety testing of new vaccine products // *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2012. Vol. 66. N. 1. P. 1–7.
15. Friedmann T., Roblin R. Gene Therapy for Human Genetic Disease? Proposals for genetic manipulation in humans raise difficult scientific and ethical problems // *Science*. 1972. Vol. 175. N. 4025. P. 949–955.

16. Ghattas M. et al. Vaccine Technologies and Platforms for Infectious Diseases: Current Progress, Challenges, and Opportunities // *Vaccines*. MDPI AG. 2021. Vol. 9. N. 12. P. 1490.
17. Guilfoyle K. et al. Protective efficacy of a polyvalent influenza A DNA vaccine against both homologous (H1N1pdm09) and heterologous (H5N1) challenge in the ferret model // *Vaccine*. 2021. Vol. 39. N. 34. P. 4903–4913.
18. Isaacs J. et al. The biosimilar approval process: how different is it? // *Considerations in Medicine*. BMJ. 2017. Vol. 1. N. 1. P. 3–6.
19. Kaplon H., Crescioli S., Chenoweth A., Visweswaraiah J. & Reichert J.M. Antibodies to watch in 2023 // *MAbs*. Taylor & Francis. 2023. Vol. 15. N. 1. P. 2153410.
20. Kiseleva I. et al. Non-mouse-adapted H1N1pdm09 virus as a model for influenza research // *Viruses*. 2020. Vol. 12. N. 6. P. 590.
21. Kozlowski S., Swann P. Current and future issues in the manufacturing and development of monoclonal antibodies // *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier BV. 2006. Vol. 58. N. 5–6. P. 707–722.
22. Kumar S. et al. Characterization and validation of a chronic retinal neovascularization rabbit model by evaluating the efficacy of anti-angiogenic and anti-inflammatory drugs // *International Journal of Ophthalmology*. 2022. Vol. 15. N. 1. C. 15.
23. Liu L. Antibody Glycosylation and Its Impact on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier BV. 2015. Vol. 104. N. 6. P. 1866–1884.
24. Lyu X., Zhao Q., Hui J. et al. The global landscape of approved antibody therapies // *Antibody Therapeutics*. 2022. Vol. 5. P. 233–257.
25. Mattis C. et al. Increasing the reuse of protein non-naïve nonhuman primates in pharmaceutical drug discovery and development: an overview and industry position on the challenges and benefits // *International Journal of Toxicology*. 2022. Vol. 41. N. 4. P. 291–296.
26. Merkuleva I.A. et al. Are Hamsters a Suitable Model for Evaluating the Immunogenicity of RBD-Based Anti-COVID-19 Subunit Vaccines? // *Viruses*. 2022. Vol. 14. N. 5. P. 1060.
27. Mitchell P. et al. Age-related macular degeneration // *The Lancet*. Elsevier BV. 2018. Vol. 392. N. 10153. P. 1147–1159.
28. Narfstrom K., Wrigstad A., Nilsson S.E. The Briard dog: a new animal model of congenital stationary night blindness // *British Journal of Ophthalmology*. BMJ. 1989. Vol. 73. N. 9. P. 750–756.
29. Ng P.S.K. et al. Ferrets exclusively synthesize Neu5Ac and express naturally humanized influenza A virus receptors // *Nature Communications*. Springer Science and Business Media LLC. 2014. Vol. 5. N. 1.
30. Park J. et al. An inactivated multivalent influenza A virus vaccine is broadly protective in mice and ferrets // *Science Translational Medicine*. American Association for the Advancement of Science (AAAS). 2022. Vol. 14. N. 653.
31. Putnam W.S. et al. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and immunogenicity comparability assessment strategies for monoclonal antibodies // *Trends in Biotechnology*. Elsevier BV. 2010. Vol. 28. N. 10. P. 509–516.
32. Rudenko L. et al. Rationale for vaccination with trivalent or quadrivalent live attenuated influenza vaccines: Protective vaccine efficacy in the ferret model // *PLoS One*. 2018. Vol. 13. N. 12. P. e0208028.

33. Shahryari A. et al. Engineering gene therapy: advances and barriers // *Advanced Therapeutics*. 2021. Vol. 4. N. 9. P. 2100040.
34. Singh M. et al. Selection of appropriate non-clinical animal models to ensure translatability of novel AAV-gene therapies to the clinic // *Gene Therapy*. 2023. P. 1–8.
35. Vulto A.G., Jaquez O.A. The process defines the product: what really matters in bio-similar design and production? // *Rheumatology*. Oxford University Press (OUP). 2017. Vol. 56 N. 4. P. iv14–iv29.
36. Wang D., Tai P.W.L., Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery // *Nature reviews Drug discovery*. 2019. Vol. 18. N. 5. P. 358–378.
37. Zhang E. et al. Quality by design — based assessment for analytical similarity of adalimumab biosimilar HLX03 to Humira® // *The AAPS Journal*. 2020. Vol. 22. N. 3. P. 69.
38. Авдеева Ж.И., Солдатов А.А., Алпатова Н.А., Медуницын Н.В., Бондарев В.П., Мионов А.Н., Меркулов В.А., Сакаева И.В. Лекарственные препараты моноклональных антител нового поколения (проблемы и перспективы) // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015. № 1 (53). С. 21–35.
39. Астапова О.В., Берчатова А.А. Генотерапевтические препараты: аспекты доклинического изучения безопасности // *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023. Т. 11. № 1. С. 73–96.
40. Воронин С.Е. и др. Хорьки, как лабораторные животные // *Международный вестник ветеринарии*. 2016. № 2. С. 103–116.
41. Гильдеева Г.Н., Белостоцкий А.В. Концепция Quality-by-Design как ключевой элемент в обеспечении качества лекарственных препаратов // *Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике*. 2017. № 3. С. 54–58.
42. Горенков Д.В. и др. Современные нормативные требования к проведению доклинических исследований профилактических вакцин // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023. Т. 23. № 1. С. 7–25.
43. Горяев А.А. и др. ДНК-и РНК-вакцины: современное состояние, требования к качеству и особенности проведения доклинических исследований // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019. Т. 19. № 2. С. 72–80.
44. Корепанов А.С., Гинак А.И. Терапевтические моноклональные антитела // *Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета)*. 2016. № 36 (62). С. 85–92.
45. Крышень К.Л., Кательникова А.Е., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Особенности экспериментальной работы с хорьками. Лабораторные животные для научных исследований. 2019. № 2.
46. Латышев О.Е. и др. Оценка иммуногенной активности клонированного штамма WA ротавируса А человека // *Вопросы вирусологии*. 2019. Т. 64. № 4. С. 156–164.
47. Онищенко Г.Г. и др. Сравнительная характеристика вакцин против COVID-19, используемых при проведении массовой иммунизации // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021. Т. 21. № 3. С. 158–166.
48. Рачинская О.А., Мельникова Е.В., Меркулов В.А. Актуальные направления и риски применения препаратов на основе технологий редактирования генома // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023. Т. 23. № 3. С. 247–261.

49. Розов С.М., Пермякова Н.В., Дейнеко Е.В. Основные стратегии гликоинженерии растительных систем экспрессии для получения гуманизированных рекомбинантных фармацевтических белков. 2018.
50. Сергеева М.В., Пулькина А.А., Штро А.А. и др. Опыт применения хлопковых крыс для моделирования респираторно-синцитиальной вирусной инфекции и иммунопатологии // Лабораторные животные для научных исследований. 2022. № 4.
51. Солдатов А.А. и др. Проблемные аспекты разработки и регистрации генотерапевтических препаратов // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2022. Т. 22. № 1. С. 6–22.
52. Уваров Д.А. Экономический эффект от государственных закупок отечественных биоаналогов на рынке моноклональных антител в России // Государственное управление. Электронный вестник. 2021. № 84. С. 129–146.
53. Шарапов С.Ж., Тимощук А.Н., Аульченко Ю.С. Генетический контроль N-гликозилирования белков плазмы крови человека // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023. Т. 27. № 3. С. 224–239.
54. European Medicines Agency. Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. 2018.

Принципы ARRIVE: от планирования исследования до публикации результатов

<https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-2-8-s4>

М.А. Ковалева¹, О.А. Аверина², П.В. Буренков³, М.М. Галагудза⁴, О.С. Елизарова³,
Д.Ю. Ивкин⁵, Е.А. Литвинова⁶, А.А. Матичина¹, Е.А. Новиков^{7,8}, В.С. Попов⁹, М.В. Рutowская¹⁰,
М.Л. Хрущева³, И.Е. Шохин¹¹, Д.В. Шубин¹

¹ АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,

³ ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России,

⁴ ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России,

⁵ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский Государственный химико-фармацевтический университет»
Минздрава РФ,

⁶ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины»,

⁷ ФГБУН «Институт систематики и экологии животных СО РАН»,

⁸ ФБУН «Новосибирский НИИ гигиены» Роспотребнадзора,

⁹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»,

¹⁰ ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова,

¹¹ ООО ЦФА

Рекомендации ARRIVE (Animal Research — Reporting of In Vivo Experiments) не противоречат принципам надлежащей лабораторной практики (GLP, Good Laboratory Practice) и требованиям, предъявляемым к планированию и проведению исследований с целью дальнейшей регистрации лекарственных средств, а по части вопросов дополняют их.

Сотрудники Центра трансфера медицинских технологий ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России — главный аналитик отдела по реализации научных программ в сфере лекарственных препаратов Павел Валерьевич Буренков и заместитель начальника отдела по реализации научных программ в сфере лекарственных препаратов Ольга Сергеевна Елизарова в своем докладе «Отчетная документация по доклиническим исследованиям с точки зрения трансфера медицинских технологий» рассказали участникам конференции об истории создания центра и основных направлениях его деятельности. Центр трансфера медицинских технологий (ЦТМТ) создан в 2022 г. на базе ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в целях исполнения Федерального про-

екта «Медицинская наука для человека» (далее — ФП). За 2022 г. и первое полугодие 2023 г. ЦТМТ проведена оценка достаточности объемов планируемых доклинических исследований (ДКИ) и уже реализованных программ ДКИ в общей сложности более чем по 80 разрабатываемым лекарственным препаратам. По результатам анализа собственной деятельности в рамках оценки материалов проведенных ДКИ разработчиками лекарственных препаратов в рамках ФП, ЦТМТ выделяет несколько категорий, по которым у разработчиков выявлены проблемы при планировании и проведении экспериментальной работы.

1. Планирование и проведение ДКИ с последующим административным использованием полученных результатов в рамках национального нормативного правового поля без учета наднациональных требований.

Наднациональная нормативная правовая система с юридической точки зрения является приоритетной перед национальными нормативными документами, поэтому при составлении программ регистрационных ДКИ лекарственных препаратов необходимо учитывать требования решений ЕЭК.

2. Соответствие установленным нормативным правовым требованиям при планировании и проведении ДКИ.
 - Отсутствие обоснования выбора релевантных биологических видов при выборе тест-систем для исследований *in vivo*.
 - Проведение ДКИ безопасности (общая токсичность) оригинальных лекарственных препаратов с использованием одного биологического вида при одном экспериментальном пути введения.
 - Отсутствие научного обоснования отказа от гомологичных моделей при планировании ДКИ клеточных продуктов.
 - Отсутствие научной оценки биосовместимости для комбинированных клеточных продуктов и клеточных продуктов, имеющих дополнительные компоненты и структуры в составе.
 - Отсутствие отдельных исследований специфической токсичности разрабатываемых лекарственных препаратов, в том числе клеточных продуктов, без соответствующего научного обоснования.
3. Оформление документации.
 - Отсутствие отдельных сведений и документов в рамках проведенного исследования.
 - Первичная документация и прочие документы по исследованию с нарушениями принципов целостности данных ALCOA⁺.
 - Отсутствие структурированности и последовательности данных в представленных заключительных отчетах об исследованиях и приложениях к ним.

В связи с тем что к процессам планирования и проведения ДКИ, а также к оформлению отчетной документации в нормативном правовом поле ЕАЭС сформулированы конкретные требования, со стороны ЦТМТ даны адресные детальные рекомендации в целях минимизации регистрационных рисков разработчиков.

Таким образом, планирование, организация и проведение ДКИ с соблюдением установленных нормативных правовых требований являются залогом достижения объективных результатов и обеспечивают возможность надлежащего перехода

к проведению клинических исследований. Принимая во внимание значение ДКИ в процессе разработки лекарственного препарата, а также располагая достаточными ресурсами, ЦТМТ в настоящее время имеет возможность обеспечивать поддержку проектов ДКИ любой сложности и на всех этапах их проведения.

Принципы ARRIVE на этапе планирования доклинических исследований

Качество итогового отчета определяется уже на этапе планирования ДКИ, поэтому целесообразно использовать ARRIVE уже на этапе административного согласования объема ДКИ, еще до подготовки плана (протокола) исследования. Об этом рассказал ведущий менеджер по контролю качества АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» Дмитрий Валерьевич Шубин в своем докладе [«Реализация принципов ARRIVE на этапе формирования плана исследования»](#). Д.В. Шубин рассмотрел возможность интеграции принципов ARRIVE на примере 10 пунктов минимальных требований (ARRIVE Essential 10: 1 — дизайн исследования; 2 — размер выборки; 3 — критерии включения и исключения; 4 — рандомизация; 5 — ослепление; 6 — критерии оценки; 7 — статистические методы; 8 — экспериментальные животные; 9 — экспериментальные процедуры; 10 — результаты) в стандартные операционные процедуры (СОП) организации или иные внутренние документы (инструкции, стандартные методики и т.д.). Лектор сообщил, что пункты 1–7 полностью поддаются планированию, а пункты 8–10 носят декларативный характер. Внедрение принципов ARRIVE на этапе планирования исследования должно быть обосновано и начинаться с оценки имеющихся внутренних документов, поскольку с большой степенью вероятности отдельные части уже описаны. Во внимание необходимо принимать и имеющиеся процессы в организации. Д.В. Шубин отметил, что планирование исследования по сути начинается с поступления заявки от Заказчика (Спонсора) в испытательный центр. Именно на этом этапе обсуждается и утверждается дизайн исследования с обоснованием выбора лабораторных животных и их количества, формируется техническое задание. В дальнейшем план (протокол) исследования готовится на основании утвержденного со стороны Заказчика (Спонсора) технического задания и данная процедура может быть описана в СОП «План исследования». Именно этот внутренний документ описывает процедуру написания и оформления плана ДКИ и является наиболее подходящим для включения перечня минимальных требований ARRIVE. При этом в данную СОП можно включать общие описательные части и обоснования необходимости включения информации в план (протокол) исследования, а детали описывать в отдельных СОП. Отдельное внимание в докладе было уделено вопросу определения объема выборки и ее обоснования (рис. 1).

При тестировании гипотезы можно использовать специальные программные продукты — калькуляторы статистической мощности. Поскольку разные калькуляторы могут выдавать отличающиеся значения, следует использовать не менее двух и в дальнейшем выбирать оптимальное значение.

О возможностях внедрения принципов ARRIVE в работу испытательных центров рассказал в своем докладе [«ARRIVE 2.0 в России: добежим, добредем или допол-](#)



Рис. 1. Возможная схема определения размера выборки (НД — нормативный документ)

зем?» директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России Михаил Михайлович Галагудза. Лектор высказал мнение о том, что ряд пунктов минимального перечня ARRIVE уже внедрены в работу отечественных организаций, при этом остаются и критические вопросы, которые до сих пор решены не в полной мере (табл. 1), среди них определение размера группы, статистическая обработка данных и ослепление.

Руководитель научно-методической группы АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» Мария Александровна Ковалева в своем докладе «Ослепление: [взаимы у клинических исследований?](#)» предоставила результаты исследования, в котором были определены возможные барьеры внедрения процедуры ослепления (Karp N.A., 2022):

- отсутствие предыдущего опыта использования процедуры;
- увеличение частоты возникновения ошибок;
- проблема авторства и распределения ответственности;
- личные убеждения исследователя;
- недостаток или полное отсутствие знаний о том, как проводить процедуры;
- практические ограничения (невозможность использования процедуры ослепления из-за разного вмешательства в экспериментальные группы, например, моделирование патологии хирургическим методом и введение химического вещества в одном исследовании);
- недостаток ресурсов;
- особенности технологических процессов;
- обеспечение принципов 3Rs и благополучия лабораторных животных в исследовании.

Таблица 1

Степень внедрения минимального перечня ARRIVE в отечественных испытательных центрах

Положение	Соблюдение
Дизайн исследования	++
Размер групп	–
Критерии включения/исключения	++
Рандомизация	++
Ослепление	–
Итоговые показатели	+
Статистическая обработка	–
Характеристики животных	+
Экспериментальные процедуры	++
Представление результатов	+

Примечание. (++) — активно внедряется, (+) — вызывает трудности, (–) — не внедрено.

Ослепление в ДКИ проводится на разных этапах: рандомизация, проведение исследования (введение тестируемых объектов и уход за животными), регистрация результатов и статистическая обработка данных. Принятие решения об использовании полного (ослепление используют на всех этапах) или частичного ослепления должно быть взвешенным, поскольку ошибки, совершенные на данном этапе, будут обнаружены только после завершения исследования. На этапе планирования каждого эксперимента требуется определить, какие из вышеописанных этапов должны быть ослеплены. При невозможности использования данной процедуры для отдельных этапов в плане (протоколе) исследования, а также в итоговом отчете должно быть представлено исчерпывающее обоснование. Возможны случаи, когда возникает непреднамеренное раскрытие ослепления — разные фенотипы одного вида лабораторных животных в исследовании, явные физико-химические свойства тестируемого объекта (цвет, запах) и т.д. Стоит отметить, что эти обстоятельства не являются аргументом в пользу полного отказа от использования ослепления в ДКИ.

Наряду с ослеплением существенный вклад в повышение надежности исследования вносит процедура рандомизации. Рандомизация — это метод случайного распределения объектов в группы с целью исключить предвзятость и связанное с ней вероятное смещение оценки — систематическую ошибку. Термин «рандомизация» относится не к выборке, а к способу ее генерирования. Использование подходящих методов рандомизации при распределении по группам гарантирует, что каждая экспериментальная единица (например, лабораторное животное) имеет равную вероятность получения конкретного вмешательства (du Sert N.P. и соавт., 2020). На сегодняшний день накоплено достаточное количество убедительных данных о том, что исключение процедуры рандомизации в исследованиях *in vivo* может приво-

доть к статистически значимому преувеличению эффектов (Hirst J.A. и соавт., 2014; Vesterinen H.M. и соавт., 2010; Bebarta V. и соавт., 2003). Особенно важно использовать рандомизацию в тех экспериментах, когда невозможно использовать полное или частичное ослепление. Представление данных о методе рандомизации позволяет ученым или специалистам регулятора оценить надежность представленных результатов и выявить потенциальные ограничения (du Sert N.P. и соавт., 2020). При проведении исследования могут использоваться следующие методы рандомизации:

- простая, метод основан на равновероятном распределении объектов в группы. При этом возможно возникновение дисбаланса по ряду показателей (масса, возраст и т.д.);
- блочная, метод обеспечивает одинаковый размер всех блоков в исследовании. При этом также возможно возникновение дисбаланса по ряду показателей (масса, возраст и т.д.);
- стратификация, метод применяют для исключения негативных последствий простой рандомизации. Стратификация обеспечивает распределение объектов по группам вмешательства с учетом факторов (пол, масса, возраст и т.д.), существенно влияющих на исход эксперимента, и гарантирует равномерное распределение указанных факторов в группах.

Алена Алексеевна Матичина — научный сотрудник отдела специфической токсикологии и фармакодинамики АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», в своем докладе «Дизайн диабетической эректильной дисфункции. Особенности и "подводные камни"» продемонстрировала применение комбинации методов рандомизации для повышения надежности полученных данных. На экспериментальной модели диабетической эректильной дисфункции показано оправданное последовательное использование блочной рандомизации для выделения группы интактных животных (этап 1, нулевой день исследования) с последующей стратификацией животных, которым был введен стрептозотин для формирования экспериментальной патологии (этап 2, 63-й день исследования). Отмечено, что стратификация проводилась по значениям концентрации глюкозы и гликозилированного гемоглобина в крови. Значения этих показателей являлись критериями включения животных в группы для дальнейшей оценки фармакологической активности тестируемых веществ.

Для оптимизации процедуры рандомизации могут быть использованы онлайн-генераторы случайных чисел, [random.org](https://www.random.org) или [randomizer.org](https://www.randomizer.org), а также сгенерированные компьютером случайные числа (например, с использованием Microsoft Excel, функция Random).

Включение процедуры рандомизации на этапе планирования ДКИ позволяет повысить надежность результатов исследования и избежать дополнительных вопросов от рецензентов при их публикации. Так, редакционная политика журнала Nature обязывает авторов рукописи в области науки о жизни совместно с текстом статьи подавать в редакцию контрольный список самопроверки. Один из пунктов списка посвящен рандомизации, в нем необходимо описать конкретный метод рандомизации, который был использован в эксперименте. Исследование 2017 г. показало, что только в 11,2% проанализированных публикациях описывается метод рандомизации, при этом доля статей, в которых упоминалась рандомизация, составляет 64,2%. Авторы анализа акцентируют внимание ученых на том, что использование

описания рандомизации как «объекты были распределены в группы случайным образом», не является достаточным (Bespalov A. и соавт., 2019).

Выбор лабораторных животных для исследования

В отношении описания экспериментальных животных ARRIVE предлагает представлять информацию о виде, линии (сублинии), поле, возрасте, массе тела, при этом рекомендации о необходимости обоснования выбора вида лабораторного животного для конкретного исследования отсутствуют. Хотя данная информация чрезвычайно важна для экспериментов, проводимых с целью последующей регистрации лекарственного средства. Выбор вида животного может быть основан, например, на оценке метаболизма, необходимости введения готовой лекарственной формы без разрушения целостности или на уже имеющихся данных в отношении оригинального лекарственного средства.

Руководитель отдела лабораторной диагностики АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» Михаил Владимирович Мирошников в своем докладе «Сравнительный обзор активности ферментов системы цитохрома P450 печени человека и лабораторных животных. Прогностическая ценность доклинических моделей *in vivo*» предложил взглянуть на выбор релевантного вида животных с точки зрения 1 фазы биотрансформации в системе цитохрома P450, поскольку именно эта группа ферментов играет ключевую роль в метаболизме лекарственных средств. В табл. 2 приведено

Таблица 2

Сопоставление некоторых изоферментов цитохрома P450 животных в сравнении с их ортологами у человека (Мирошников М.В. и соавт., 2022)

Подсемейство СУР	Вид животного							
	Мыши	Крысы	Морские свинки	Кролики	Кошки	Собаки	Свиньи	Приматы
1A	+	+/-	+/-	+↓	+↑	+/-	+↓	+
2A	-	-	+	+/-	+↓	+↓	+/-	+
2B	-	+	+↑	+	-	-	+/-	+
2C	-	-	+/-	-	+↓	-	+	+↑
2D	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+	+↑
2E	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-
3A	+/-	+/-	+/-↑	+/-	+/-↓	+/-	+	+↑

Примечание. Общая активность ферментов подсемейства: (+) — сопоставима с активностью ортологов у человека; (-) — не сопоставима с активностью ортологов у человека; (+/-) — сопоставима приблизительно на 50% с активностью ортологов у человека; общая активность фермента: (↑) — превосходит активности ортологов у человека; (↓) — уступает активности ортологов у человека.

сопоставление некоторых изоферментов цитохрома P450 животных в сравнении с их ортологами у человека.

Показано, что в отношении активности всех ферментов CYP ни один из видов животных не является полностью схожим с такими же данными у человека. При этом сходство между видами стоит определять не полной совокупностью всей системы цитохрома P450, а отдельных, наиболее важных подсемейств или ферментов, играющих значительную роль в метаболизме конкретного соединения. Оценка абсолютного количества изоформ CYP у разных видов животных, в разных органах поможет выявить и понять видовые различия с точки зрения органной специфичности каталитической активности, а также предсказать метаболический клиренс у человека. Важно помнить, что полученная информация об отсутствии схожести активности ферментов CYP у человека не ограничивает выбор вида лабораторного животного для проведения ДКИ и должна рассматриваться как дополнительный фактор, который стоит учитывать.

Выбор вида лабораторного животного для исследования может определяться и уникальными свойствами тест-системы. В докладе [«*Acomys cahirinus* — модельный объект для изучения регенерации](#)» заведующий лабораторией трансляционной медицины факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова» Владимир Сергеевич Попов рассказал об особенностях *Acomys cahirinus* (иглистая мышь). В первую очередь интерес ученых к этой тест-системе вызван уникальными регенеративными свойствами. Иглистая мышь может восстанавливать до 60% потери своих кожных покровов, в связи с данной биологической особенностью для них неприменима маркировка перфорацией ушной раковины, поскольку за 40 дней происходит полное заживление с восстановлением структуры кожи. Другой особенностью *Acomys cahirinus* является рождение зрелых детенышей (открытые глаза, детеныши покрыты шерстью и т.д.). К недельному возрасту потомство может питаться твердой пищей (Pinheiro G.V. и соавт., 2018). Самки *Acomys cahirinus* единственные грызуны, которые демонстрируют менструальный, а не эстральный цикл, что делает данную тест-систему перспективной для исследований заболеваний, связанных с циклами, например эндометриоза. Отмечено, что изучение иглистой мыши началось относительно недавно и в настоящий момент в биомедицинских исследованиях используют представителей 4 видов (иногда путая их): *A. cahirinus*, *A. kempfi*, *A. precivali*, *A. dimidiatus*.

Еще одним примером вида с уникальными свойствами может являться голый землекоп (*Heterocephalus glaber*). Сегодня эти животные являются эксклюзивными для проведения геронтологических исследований, длительность жизни грызуна составляет около 30 лет. Ольга Александровна Аверина — старший научный сотрудник НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, в докладе [«Исследование физиологии голых землекопов в аспекте полового созревания самок»](#) предоставила результаты исследования полового созревания самок голого землекопа. Весьма сложное зоосоциальное поведение данного вида определяет половое развитие особей обоих полов, а от понимания особенности репродуктивной функции зависит успех воспроизведения данного вида животных в лабораторных условиях. О.А. Аверина отметила дефицит публикаций по изучаемо-

Таблица 3

Эстральный цикл разных грызунов			
Вид	Эстральный цикл, дни	Эструс, ч	Продолжительность беременности, дни
Мышь, C57Bl/6×CBA	4–5	12	21
Голый землекоп	14	24 и менее	71
Морская свинка	15–17	6–11	65–70

му вопросу. Анализ полового созревания самок голого землекопа проводился в сравнении с эстральным циклом мышей и морских свинок. Полученные данные представлены в табл. 3.

С целью изучения процессов адаптации к изменению температурного режима старший научный сотрудник ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН Марина Владимировна Рutowская предложила рассмотреть диких насекомоядных — ежа и выхухоль. В докладе [«Дикие насекомоядные в неволе и их использование в качестве модели для исследования терморегуляции»](#) отмечено, что представители отряда примитивны, а это определяет наличие большого числа преадаптаций. Еж является наземным животным, а выхухоль — полуводным. Возможность изменения температуры тела в большом диапазоне значений представляет особый интерес при изучении молекулярно-клеточных процессов адаптации и позволяет рассматривать ежа в качестве возможной тест-системы. Шкурка русской выхухоли имеет низкую теплопроводность, а значит животное подвержено перегреву, при этом голые лапы и хвост служат терморегуляторами и позволяют освободиться от излишнего тепла. Уникальная способность выхухоли снижать температуру тела до 30 °С и ниже, оставаясь активной (не впадая в ступор), известна для очень ограниченного числа видов. Возможность использования диких насекомоядных в ДКИ ограничена, что связано с проблемами их содержания в неволе (в том числе в лабораторных условиях). Применение диких насекомоядных в ДКИ ограничено в связи с проблемами их содержания в неволе (в том числе в лабораторных условиях).

О том что условия содержания определяют реакцию на экспериментальное воздействие, рассказал заведующий лабораторией ФГБУН «Институт систематики и экологии животных СО РАН» Евгений Анатольевич Новиков в своем докладе [«Реакция на экспериментальные воздействия и остаточная продолжительность жизни диких грызунов в лаборатории»](#). Евгений Анатольевич обозначил, что выживаемость животных в лаборатории может рассматриваться как важный компонент реакции на экспериментальные воздействия, однако при этом зависит от условий обитания вида и особей в природе, от фазы популяционного цикла, репродуктивного статуса особей, а также сравнил достоинства и недостатки экспериментальных моделей, полученных из естественных условий обитания или выращенных в лабораторных условиях (табл. 4).

Эти факты требуется учитывать как при выборе вида животных для исследования, так и при планировании дизайна эксперимента.

Таблица 4

Сравнительная характеристика животных из естественных популяций
и воспроизведенных в лабораторных условиях

Происхождение особей	Достоинства	Недостатки
Отловленные в природе	Полноценное развитие. Отсутствие эффектов неконтролируемого отбора	Неизвестный календарный возраст. Отсутствие информации о предшествующей жизни особи
Рожденные в лаборатории	Известны дата рождения и родительское поколение. Животные росли в контролируемых условиях	Неконтролируемый отбор. Произвольная ассортативность или дисассортативность скрещивания (игнорирование предпочтений животных в выборе партнеров). Игнорирование репродуктивных циклов

Статус здоровья лабораторного животного также может лежать в основе выбора тест-системы для исследования, при этом Germ-free-животные (разновидность гнотобионтов, у которых полностью отсутствует микробиота) являются одним из таких примеров. Именно при их использовании получены наиболее важные данные о влиянии микробиома на организм. Благодаря этому возможны поиск новых терапевтических препаратов на основе микроорганизмов и их метаболитов, понимание роли патогенной микробиоты в развитии заболеваний человека и животных, а также механизма транслокации инфекции в организме, персонализированный подход в ветеринарии и медицине.

Заведующая сектором ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» Екатерина Анатольевна Литвинова в докладе «Germ-free-животные: сложности и необходимость получения для российской науки» рассказала, что впервые идея получения «стерильных животных» была высказана Л. Пастером в 1895 г. Спустя 10 лет она была реализована с использованием морских свинок. В 1950–1960 гг. в Советском Союзе были созданы первые методические указания по созданию гнотобионтов, с 1964 г. интерес к описанным тест-системам начал возрастать, увеличивалось число научных публикаций, посвященных изучению разных механизмов патогенеза заболеваний, в которых могла участвовать микробиота кишечника. Екатерина Анатольевна поделилась личным опытом и подходами к созданию Germ-free-животных. Отмечено, что на продажу из специализированных питомников поступают особи, не способные к дальнейшему размножению, поэтому для воспроизведения могут быть использованы два подхода: воздействие на животных антибиотиками или искусственное выкармливание. Для получения Germ-free-животных в секторе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» был использован гибридный метод, при котором беременные самки содержались в стерильных условиях и получали антибиотики широкого

спектра действия. Несмотря на то что метод искусственного вскармливания используется с 50-х годов XX века, его не смогли воспроизвести в полном объеме. Е.А. Литвинова отметила, что в лаборатории продолжительность жизни детенышей составляла всего 10 дней. Работы продолжаются, ведется динамическое наблюдение за поколением F2. Е.А. Литвинова обозначила перечень вопросов, которые необходимо будет решить, чтобы отечественные Germ-free-животные были доступны для каждого испытательного центра.

Дизайн эксперимента

Первый существенный подход к планированию дизайна исследования был сделан Н. Gerhard Vogel. В своей книге *Drug Discovery and Evaluation — Pharmacological Assays*, автор предпринял попытку систематизации возможных дизайнов исследования и накопленных знаний в отношении основных фармакологических экспериментов (метаболические нарушения, патологии дыхательной системы и т.д.). Изначально книга была задумана с целью содействия ученым, ведь понимание дизайна исследования и степени трансляционности полученных данных способствует не только воспроизводимости экспериментов, но и исключает использование большего количества лабораторных животных. Это особенно важно в тех случаях, когда исследование не позволит получить новые сведения о течении патологического процесса или биологической активности тестируемого объекта. Первое издание оказалось востребованным и с течением времени было пересмотрено дважды. Необходимость актуализации была в первую очередь связана с техническим прогрессом, появлением альтернативных методов (расширение возможностей методов *in vitro* и *in silico*) и изменением нормативно-правовой базы, предъявляющей требования к проведению разных типов исследований. Сегодня научному сообществу доступно третье издание *Drug Discovery and Evaluation — Pharmacological Assays* (Vogel H.G., 2008), которое включает описание более 1000 тестов, методик, экспериментальных моделей, представленных в едином удобном формате. Каждый раздел содержит исчерпывающую информацию о проведении теста или моделировании патологии, представлены ожидаемые результаты и критические точки эксперимента, описана возможная модификация, указан расширенный список литературы. Даны общие рекомендации для проведения теста, моделирования экспериментальной патологии, и описана значимость получаемых результатов для планирования исследований с участием человека. Эксперименты рассматриваются с позиций этического обращения с лабораторными животными. Представленный Н. Gerhard Vogel подход имеет много общего с принципами ARRIVE и был поддержан участниками сессии «Экспериментальные модели и технологии манипуляций» (табл. 5). Каждый лектор уделил внимание методологической части представляемого исследования, остановился на «подводных камнях» моделей и поделился ценными практическими рекомендациями.

О перспективах развития биологического эксперимента рассказал начальник Центра экспериментальной фармакологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский госу-

Содержание сессии «Экспериментальные модели и технологии манипуляций»

Информация о лекторе	Тема доклада
<p>Виктория Александровна Пугач, старший научный сотрудник, ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации</p>	<p>«Современные парадигмы в экспериментальной патологии легких»</p>
<p>Денис Николаевич Силачев, заведующий лабораторией клеточных технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации</p>	<p>«Моделирование неонатальной ишемии — гипоксии крыс для поиска метаболомных маркеров повреждения головного мозга»</p>
<p>Александр Алексеевич Матичин, заместитель руководителя отдела специфической токсикологии и фармакодинамики, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»</p>	<p>«Экспериментальные модели нарушения сперматогенеза у крыс и карликовых свиней»</p>
<p>Арина Сергеевна Ивкина, старший научный сотрудник Центра экспериментальной фармакологии, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации</p>	<p>«Создание и апробация модели экстремального сочетанного воздействия»</p>
<p>Варвара Дмитриевна Каранина, научный сотрудник отдела специфической токсикологии и фармакодинамики, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»</p>	<p>«Разработка модели нефролитиаза у крыс и кроликов»</p>
<p>Олег Владимирович Подгорный, руководитель группы, ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН</p>	<p>«Синтетические нейротехнологии в моделировании и терапии патологий мозга»</p>

Информация о лекторе	Тема доклада
<p>Ксения Александровна Яценко, исполняющая обязанности начальника медицинского отдела, Департамент разработки и регистрации лекарственных средств ООО «ИРВИН 2»</p>	<p>«ДКИ как основа разработки и регистрации ЛС: современные тренды и регуляторные требования»</p>
<p>Ярослав Геннадьевич Муразов, заместитель руководителя отдела специфической токсикологии и микробиологии, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»</p>	<p>«К вопросу об особенностях роста меланомы B16 у мышей C57Bl/6 при использовании различных техник получения опухолевого материала и сайтов трансплантации сингенной опухоли»</p>
<p>Анастасия Николаевна Сарынина, младший научный сотрудник, ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации</p>	<p>«Особенности внутритрахеального введения веществ лабораторным животным»</p>
<p>Анастасия Витальевна Чернышова, младший научный сотрудник отдела специфической токсикологии и фармакодинамики, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»</p>	<p>«Рекомендованные и максимально допустимые объемы для ректального и интравагинального введения лекарственных средств разным видам лабораторных животных»</p>
<p>Елена Павловна Гончарова, старший научный сотрудник, ООО «Научно-исследовательский институт нетканых материалов»</p>	<p>«Экспериментальная модель воспалительных заболеваний кишечника с микробиотой человека»</p>
<p>Никита Сергеевич Ильинский, заместитель начальника отдела, ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации</p>	<p>«Проблемные вопросы трансляции данных в экспериментальной нейротоксикологии»</p>

дарственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России Дмитрий Юрьевич Ивкин в докладе «**Дизайн эксперимента для единовременного изучения профилей эффективности и общей токсичности при многократном введении лекарственного препарата**». Показана возможность совмещения разных видов исследований в одном дизайне. Такой подход может стать оптимальным с позиций принципов 3Rs и ресурсной составляющей исследования. Д.Ю. Ивкин отметил, что при проведении подобных исследований следует особое внимание уделять выбору доз тестируемых объектов.

Научные публикации

О внедрении принципов ARRIVE в работу редакционных коллегий отечественных научных журналов на этапе рецензирования рукописей рассказал в своем докладе «**ARRIVE 2.0 в России: добежим, добредем или доползем?**» директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России Михаил Михайлович Галагудза. Показано, что из 20 журналов 3 (15%) являются ARRIVE «позитивными» — журнал «Гены и клетки» (<https://genescells.ru/>), Журнал эволюционной биохимии и физиологии (<https://rusjphysiol.org/>), Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова (<https://rusjphysiol.org/>).

Игорь Евгеньевич Шохин — главный редактор журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», генеральный директор ООО ЦФА в своем докладе «**Биомедицинская статья глазами редактора научного журнала**» представил практические рекомендации авторам о том, как подготовить статью, отвечающую не только отечественным, но и международным требованиям. На примере работы редакционной коллегии журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» показано, на какие этапы подготовки статьи следует обращать особое внимание. При написании рукописи следует руководствоваться структурой IMRAD (introduction — введение, methods — методы, results — результаты и discussion — обсуждение), которая впервые была введена в 1972 г. и за столь долгий период помогла ученым структурировать знания, доносить их до мирового научного сообщества, активно развивать исследовательские направления, а главное, в логической последовательности излагать суть проведенного исследования. Отмечено, что большинство научных платформ, включая Scopus, придерживаются этих единых правил оформления. Любая статья, поступающая в редакцию «Разработка и регистрация лекарственных средств», проходит предрецензионный этап, на котором научный редактор оценивает наличие/отсутствие антинаучной информации и формальные требования оформления рукописи. Уже на данном этапе статья может быть отклонена. Такой подход позволяет снимать нагрузку с рецензентов. Отдельно И.Е. Шохин отметил, что статьи, в которых не представлена информация о конфликте интересов, не передаются для дальнейшего рецензирования. Говоря о введении, следует отметить важность представления актуальной информации с глубиной поиска 5 лет, включая текущий год написания статьи, ведь актуальные ссылки — это в первую очередь эффективный способ коммуникации научного сообщества. Раздел материалы и методы должен быть изложен таким

образом, чтобы позволить воспроизвести исследование в любой лаборатории. Описание результатов не должно сводиться только к формальной констатации полученных данных, дополнительно требуется обсуждение и/или сравнение собственных результатов с данными других ученых. Так, например, статья, отражающая только фармакокинетические данные какого-либо лекарственного средства, не является удачной, следует обсудить результаты исследования в контексте дальнейшего применения препарата, схемы дозирования и т.д. Заключение должно отражать достижение/недостижение цели и задач эксперимента. И.Е. Шохин, обсуждая чек-лист журнала, обратил внимание на раздел, предназначенный только для главного редактора. В нем рецензенту предложено высказать свое мнение о приоритетности публикации материала (высокий, плановый порядок или исходя из состояния портфеля статей), а также оценить вероятное цитирование работы журналами базы Scopus в течение 4 лет. Сотрудники журнала привели удачные и неудачные примеры представления информации в рукописях. Также участники сессии обсудили возможные типы мотивации для рецензентов и потенциальных авторов статей.

Научный редактор, ответственный секретарь редколлегии журнала «Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» Мария Леонидовна Хрущева, представляя журнал, отметила, что ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России также издает журналы «Безопасность и риск фармакотерапии» и «БИОпрепараты», которые представляют интерес для широкого круга специалистов и воспринимаются как руководящие и справочные издания. М.Л. Хрущева поделилась практиками привлечения авторов и рецензентов, создания тематических номеров.

Журнал «Трансляционная медицина» был представлен директором Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России Михаилом Михайловичем Галагудзой. Следует отметить, что идея трансляционной медицины предполагает тесное взаимодействие специалистов разных смежных направлений (биология, физика, химия, физиология, биохимия и т.д.), поэтому основной целью журнала является содействие российским и зарубежным ученым, осуществляющим свой научный поиск в области трансляционных исследований. М.М. Галагудза поделился планами развития журнала, поддержал идею о необходимости создания тематических номеров и поднял вопрос о возможности публикаций в открытом доступе рецензий на рукописи. Важно отметить, что у зарубежных журналов такой подход встречается достаточно часто.

Главный редактор журнала «Лабораторные животные для научных исследований» Валерий Геннадьевич Макаров рассказал, что журнал был создан для восполнения пробелов информации в отношении лабораторных животных. Издание публикует циклы статей, посвященные в целом использованию отдельных видов животных в доклинических исследованиях, вопросам содержания и повышения благополучия, референтным интервалам разных показателей. В.Г. Макаров обратил внимание участников конференции на то, что журнал является электронным, и в нем публикуются не только статьи, но и видеоматериалы, а это чрезвычайно важно особенно для тех манипуляций, которые затруднительно описывать в тексте. Именно эта возможность повышает практическую ценность журнала.

Представители журналов сошлись во мнении, что уже сейчас каждая редакционная коллегия частично использует принципы ARRIVE при рецензировании рукописей, описывающих исследование с участием животных. При этом авторы самостоятельно могут использовать чек-лист ARRIVE, что может способствовать уменьшению числа вопросов к авторам и повышению качества отечественных статей.

Подробная информация о научных журналах представлена на официальных сайтах.

Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств	https://www.vedomostincesmp.ru
Лабораторные животные для научных исследований	https://labanimalsjournal.ru
Международный вестник ветеринарии	https://spbguv.ru/academy/science/scientificjournals/journal2/
Разработка и регистрация лекарственных средств	https://www.pharmjournal.ru
Трансляционная медицина	https://transmed.almazovcentre.ru

По итогам проведенных сессий показано, что ARRIVE-ориентированность — это не что иное, как вектор от планирования исследования до публикации его результатов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bebarta V., Luyten D., Heard K. Emergency medicine animal research: does use of randomization and blinding affect the results? // Acad. Emerg. Med. 2003. Vol. 10. N. 6. P. 684–687.
2. Bepalov A., Wicke K., Castagné V. Blinding and Randomization. In: Bepalov A., Michel M., Steckler T. (eds) Good Research Practice in Non-Clinical Pharmacology and Biomedicine // Handbook of Experimental Pharmacology. 2019. Vol. 257. Springer, Cham. DOI: [10.1007/164_2019_279](https://doi.org/10.1007/164_2019_279).
3. Hirst J.A., Howick J., Aronson J.K. et al. The need for randomization in animal trials: an overview of systematic reviews // PLoS ONE. 2014. Vol. 9. N. 6. P. e98856.
4. Pinheiro G., Prata D.F., Araújo I.M. et al. The African spiny mouse (*Acomys* spp.) as an emerging model for development and regeneration // Laboratory Animals. 2018. Vol. 52. N. 6. P. 565–576. DOI: [10.1177/0023677218769921](https://doi.org/10.1177/0023677218769921).
5. Sert N.P., Ahluwalia A., Alam S. et al. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0 // PLoS Biol. 2020. Vol. 18. N. 7. P. e3000411. DOI: [10.1371/journal.pbio.3000411](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411).
6. Vesterinen H.M., Sena E.S., French-Constant C. et al. Improving the translational hit of experimental treatments in multiple sclerosis // Multiple Sclerosis Journal. 2010. Vol. 16. N. 9. P. 1044–1055.

7. Vogel H.G. (Ed.). Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2008.
8. Мирошников М.В., Султанова К.Т., Макарова М.Н. и др. Сравнительный обзор активности ферментов системы цитохрома Р450 человека и лабораторных животных. Прогностическая ценность доклинических моделей *in vivo* // Трансляционная медицина. 2022. Т. 9. № 5. С. 44–77. DOI: [10.18705/2311-4495-2022-9-5-44-77](https://doi.org/10.18705/2311-4495-2022-9-5-44-77).

Альтернативные модели в биомедицинских экспериментах

<https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-2-8-s5>

Я. В. Агацарская, Д. С. Гайдай, Е. Г. Киркина

АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»

Согласно данным, опубликованным Citeline a norstella company в 2021 г. (www.norstella.com), в период с 2011 по 2020 г. основной причиной отказа от дальнейшей разработки кандидатов в лекарственные препараты было отсутствие эффективности от применения у человека на II/III этапе: только 28,9% кандидатов достигают этого критического фазового перехода.

Светлана Владимировна Смирнова, руководитель вивария ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова», в своем докладе «[Опыт применения люминесцентных бактериальных биосенсоров на основе штамма *Escherichia coli* K12 в генотоксикологических исследованиях](#)» акцентировала внимание участников на том, что специалисты фармацевтической отрасли постоянно ищут возможности для увеличения процента успешного прохождения клинических испытаний за счет новых экспериментальных моделей *in vivo* и использования новых альтернативных подходов к разработке лекарств.

Классическим подходом являются модели *in vivo* на животных. Однако у них есть свои особенности, которые необходимо учитывать при трансляции данных с животных на человека. С появлением клеточных технологий стало возможно выделять клетки человека и проводить детализацию механизмов действия без необходимости учета разницы в генотипе клеток животных и человека. На сегодняшний день существует несколько видов клеточных линий.

Развитие биоинженерии и смещение фокуса на разработку новых биотехнологических препаратов повлияли на то, что в последние годы промышленный спрос сосредоточен на разработке клеточных моделей. Они позволяют использовать клеточный материал, полученный от человека, тем самым выявляя и снижая на ранних стадиях риски, связанные с проблемами трансляционной эффективности или безопасности.

В биомедицинских исследованиях, в зависимости от целей экспериментов, могут быть использованы различные клеточные линии (Fundamental Techniques in Cell Culture, 2018).

Первичные клеточные культуры

Первичные клеточные культуры выделяют непосредственно из тканей человека, полученных в результате биопсии (или из абортивного материала) либо с помощью эксплантата (кусочек ткани с живыми клетками, помещенный в питательную среду *in vitro*), либо после диссоциации в суспензию отдельных клеток путем ферментативного расщепления. Такие культуры изначально гетерогенны, но позже в них начинают преобладать фибробласты. Подготовка первичных культур трудоемка, и их можно поддерживать *in vitro* только в течение ограниченного периода времени, так как они при делении «стареют». В течение своей относительно ограниченной продолжительности жизни первичные клетки обычно сохраняют многие дифференцированные характеристики клетки *in vivo*, что позволяет использовать их свойства для изучения более сложных механизмов, требующих высококодифференцированные клетки.

Важное примечание: как только первичные культуры подвергаются пассированию (рассадке), они становятся клеточной линией и больше не являются первичными.

Перевиваемые соматические клеточные линии

В отличие от первичных эти клеточные линии уже адаптированы к условиям *in vitro* и сохраняются на протяжении нескольких десятков пассажей (30–50), поэтому при соблюдении условий культивирования и своевременного пассирования будут длительное время сохранять свои свойства. К ним относятся диплоидные клетки человека. Такие клетки имеют диплоидный набор хромосом, типичный для соматических клеток используемой ткани. Диплоидные клетки человека не претерпевают злокачественного перерождения и этим отличаются от опухолевых линий. Такие клетки классифицируют в зависимости от органа/ткани, из которых они получены:

- эпителиальные и пигментные клетки;
- секреторные клетки;
- клетки крови и иммунной системы;
- мышечные клетки;
- клетки соединительной ткани и ретикулоэндотелиальной ткани;
- клетки нервной ткани и клетки-рецепторы органов чувств.

Иммортализованные клеточные линии

Иммортализованные клеточные линии состоят из клеток одного типа, которые можно серийно размножать в культуре бесконечное число раз. Поскольку перевиваемые соматические клеточные линии стареют примерно после 30 циклов деления, возникающие в результате этого сложности в работе с ними привели к разработке «бессмертных» или иммортализованных линий. Непрерывные иммортализованные клеточные линии обычно обладают этой способностью, потому что они

трансформированы в опухолевые клетки. Линии опухолевых клеток часто получают из реальных клинических опухолей, но трансформацию также можно вызвать с помощью вирусных онкогенов или химической обработки. Трансформированные клеточные линии обладают преимуществом почти безграничного культивирования и легкой доступности, но их недостаток заключается в том, что они очень мало сохранили первоначальные характеристики соматических клеток *in vivo*, из которых произошли, и низкий уровень дифференцировки.

Наиболее известной раковой линией является линия HeLa, представляющая собой карциному шейки матки и названная в честь Генриетты Лакс, у которой они были выделены в 1951 г. Эти клетки делятся по сей день, переносят десятки лет замороженное состояние. На сегодняшний день существует множество онколиний, которые классифицируют в зависимости от:

- а) вида опухоли (карцинома, саркома, аденокарцинома и др.);
- б) органа, в котором была опухоль (почка, легкое и др.);
- в) разновидности субклона, из которого данная линия была выведена.

Например, оригинальная линия SK-N-SH была получена методом биопсии из костного мозга, взятого у 4-летней девочки с нейробластомой. При культивировании первичной опухоли был выделен субклон, названный SH-SY5Y, который в отличие от других субклонов имел адренергический фенотип и также экспрессировал дофаминергические маркеры. Это позволило создать иммортализованную клеточную линию, широко используемую для изучения болезни Паркинсона, нейрогенеза и других характеристик клеток головного мозга.

Помимо этого, в последнее время все чаще появляются публикации, указывающие на необходимость учета расовой и гендерной принадлежности донора клеток при разработке новых лекарственных средств. Предпосылкой к этому послужили достижения в технологиях «омики», которые облегчили молекулярную характеристику широкого спектра раковых заболеваний человека (Guerrero и соавт., 2018), а также в различных проявлениях/отсутствии биомаркеров у представителей разных рас и, как следствие, в разной реакции на классические и таргетные препараты (Ma, Hui, Mok, 2010; Paez и соавт., 2004; Saijo, 2013; Shigematsu и соавт., 2005). Одним из наиболее ярких примеров разной чувствительности к лекарственным препаратам, основанной на расовой/этнической принадлежности, является повышенная чувствительность азиатской популяции с аденокарциномой легкого к эрлотинибу и gefитинибу. Согласно ряду исследований, среди китайских, корейских и японских некурящих женщин с atopическим дерматитом мутации между экзонами 18 и 21 в гене рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) возникают чаще по сравнению с белыми женщинами, тем самым повышая чувствительность к терапии моноклональными антителами.

Кроме того, ряд исследований указывает на явные расово-этнические различия в фармакодинамике и фармакокинетике онкопрепаратов. Так, в клинических испытаниях бевацизумаба (моноклональное антитело для терапии рака желудка) и цетуксимаба (моноклональное антитело для терапии немелкоклеточного рака легкого) была показана эффективность только у белых пациентов (Innocenti и соавт., 2009; Lal и соавт., 2007; Petros и соавт., 2005; Renbarger и соавт., 2008; Schwab и соавт., 2008). Данные исследования однозначно показывают важность выбора

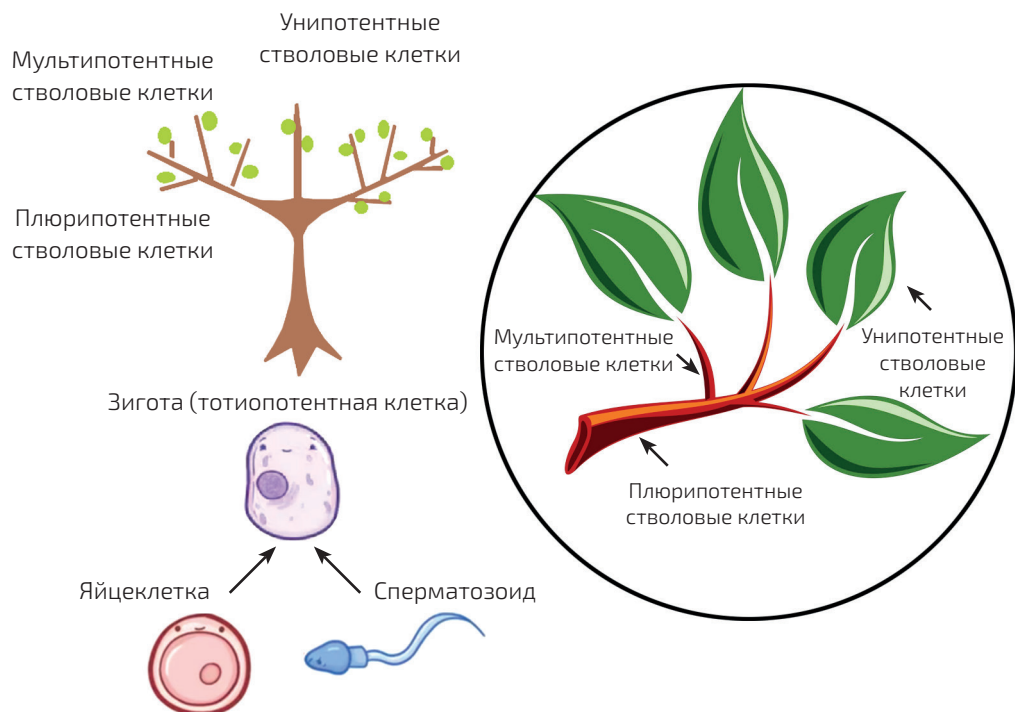


Рис. 1. Схема дифференцировки стволовых клеток

расы/этнической принадлежности донора при планировании исследований, в том числе и доклинических, с целью сокращения количества ложных результатов.

Важное примечание: при выборе иммортализованной клеточной линии человека при разработке дизайна доклинического исследования (ДКИ) важно учитывать расу/этническую принадлежность донора, чтобы не получить ложноположительных/ложноотрицательных результатов или низкой валидности модели.

Стволовые клетки

В последнее время линии стволовых клеток стали популярной клеточной моделью, используемой в исследованиях благодаря их неограниченным характеристикам роста и потентности. Сам термин «стволовая клетка» (СК) был введен в науку 1 июня 1909 г. в Берлине, русский гистолог Александр Максимов назвал так клетки крови, которые способны дать начало нескольким другим типам клеток (рис. 1). В 1981 г. американский биолог Мартин Эванс впервые выделил недифференцированные плюрипотентные стволовые клетки из эмбриобласта мыши, а в 1998 г. Томпсоном и Герхартом была получена первая бессмертная линия эмбриональных стволовых клеток человека.

Стволовые клетки имеют три ключевых признака:

- теломеразную активность — способность с помощью фермента теломеразы удлинять теломеры и не иметь ограничений по делению (в этом смысле СК очень похожи на раковые, которые также могут неограниченно делиться);
- самообновление — способность сохранять неизменный фенотип после деления без дифференцировки;
- потентность (дифференцировочный потенциал) — способность давать потомство в виде определенного количества специализированных типов клеток.

Выделяют следующие типы СК:

- тотипотентные — зигота и бластомеры (способны к образованию всех эмбриональных и неэмбриональных тканей организма);
- плюрипотентные — эмбриональные СК (способны к формированию всех тканей организма, но их вклад в развитие неэмбриональных тканей весьма ограничен);
- мультипотентные, например, гемопоэтические СК (способны к формированию зрелых клеток определенных типов);
- унипотентные, например, сперматогонии (формируют единственный тип клеток сперматозоиды).

Важное примечание: стволовые клетки в рамках ДКИ могут выступать как в роли тест-системы (для изучения воздействия препаратов, содержащих факторы дифференцировки, и в виде материала для получения молодых соматических клеток), так и в составе тестируемых препаратов, создавая определенные риски самопроизвольной дифференцировки и требуя тщательного продуманного дизайна.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) представляют собой особый тип плюрипотентных клеток, который возникает в результате перепрограммирования взрослых соматических клеток. Впервые иПСК были получены в 2006 г. путем одновременного введения четырех экзогенных генов, *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-MYC* (*OSKM*), в фибробласты мыши (De Los Angeles и соавт., 2015; Takahashi, Yamanaka, 2006, 2016).

В 2012 г. С. Яманака вместе с сэром Дж. Гердоном получили Нобелевскую премию за открытие того факта, что зрелые клетки могут быть перепрограммированы в плюрипотентные. Научными предпосылками разработанного метода послужили два экспериментальных наблюдения. Соматические клетки могут быть перепрограммированы:

- в тотипотентные путем переноса их ядра в денуклеатизированную неоплодотворенную яйцеклетку (Wilmut и соавт., 1997);
- в плюрипотентные путем гибридизации (слияния) с эмбриональными стволовыми клетками (Cowan и соавт., 2005; Tada и соавт., 2001).

Важное примечание: появление подходов с использованием иПСК позволило обойти самую главную проблему стволовых клеток — этические принципы получения клеток различной степени потентности от эмбрионов — и расширило возможности работы с различными клетками человеческого организма.

Место клеточных культур в доклинических исследованиях

С момента начала клеточного культивирования (примерно 50–60-х годов XX века) интерес к клеточным моделям возрастал. Однако долгое время клеточные модели использовались только для изучения отдельных свойств клеток и воздействия потенциальных кандидатов в лекарственные препараты на конкретную мишень на поверхности и/или внутри клетки. Методы, используемые при данных видах исследований *in vitro*, можно условно разделить на прямые и непрямые. Прямые методы оценки — это когда с помощью специализированного оборудования осуществляются подсчет количества живых и мертвых клеток, а также разделение их на типы и популяции. Непрямые методы связаны с оценкой жизнеспособности, активности или адгезии путем оценки с помощью дополнительной окраски клеток или их метаболитов с помощью колориметрических, флуоресцентных и прочих красителей. Общие методы, неспецифичные для какого-то конкретного заболевания, включают оценку не только жизнеспособности и пролиферации клеток, но и клеточной цитотоксичности.

Оценка жизнеспособности клеток и пролиферации

Метаболическая активность является общим показателем здоровья клеток. Для определения клеточной метаболической активности часто используются колориметрические методы анализа. Например, соли тетразолия и резазурин восстанавливаются за счет активности митохондриальной дегидрогеназы жизнеспособными клетками (van Meerloo и соавт., 2011) (рис. 2). Когда клетки умирают или прекращают пролиферацию, происходит заметное изменение в восстановлении резазурина и солей тетразолия. Соответствующее изменение скорости оборота можно проанализировать с помощью колориметрического и/или флуоресцентного детектирования. Некоторыми из наиболее распространенных солей тетразолия, используемых в клеточных метаболических исследованиях, являются МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид), МТС (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолий), ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий)-5-карбоксамин-

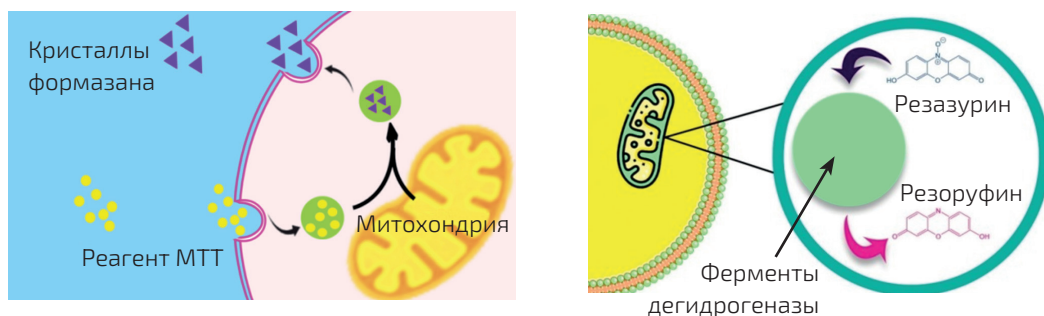


Рис. 2. Схема метаболического изменения соли тетразолия (МТТ) и резазурина в митохондриях



Рис. 3. Принцип флуорометрического метода определения жизнеспособности клеток

лид), WST-1 и WST-8 (2-(2-метокси-4-нитрофенил)-3-(4-нитрофенил)-5-(2,4-дисульфопенил)-2Н-тетразолий, мононатриевая соль).

Различные колориметрические методы анализа имеют свои преимущества и недостатки. В целом колориметрические анализы просты в использовании, позволяют получать данные с высокой пропускной способностью и обеспечивают экономичный подход к определению терапевтической эффективности. Однако колориметрические анализы часто не обеспечивают возможности мультиплексирования или получения измерений в реальном времени. Кроме того, при работе с меньшими образцами клеток (менее 1000) может быть не достигнута достаточная чувствительность (van Meerloo и соавт., 2011).

Колориметрические методы дают значения абсорбции, которые являются косвенным измерением жизнеспособности клеток. Значения выражают в процентах от 100% жизнеспособных клеток (поглощение необработанного образца — поглощение клеточной среды) (van Meerloo и соавт., 2011). Результаты колориметрического анализа могут давать нулевую жизнеспособность, это необязательно указывает на то, что все клетки мертвы, но может указывать на отсутствие обнаруживаемых изменений в абсорбции между самой клеточной средой и образцом.

Флуорометрические методы определения жизнеспособности клеток основаны на неспецифическом расщеплении нефлуоресцентного соединения, например, такого как диацетат флуоресцеина, который флуоресцирует после его расщепления клеточными эстеразами (рис. 3). Затем измеряют возникающий флуоресцентный сигнал, чтобы определить количество или соотношение жизнеспособных клеток.

Оценка цитотоксичности

Методы окрашивания часто используются в анализах цитотоксичности для быстрой визуализации присутствия живых и мертвых клеток с помощью флуоресцентной микроскопии (Ekert и соавт., 2020). Пропидия йодид представляет собой флуоресцентный, непроницаемый для мембран краситель, который связывается с ДНК мертвых клеток путем интеркалирования между основаниями. Поскольку пропидия йодид имеет молекулярную массу всего 668 Да, он может связываться с мертвыми клетками с минимальным нарушением клеточной мембраны. Живые клетки с неповрежденными клеточными мембранами исключают краситель и практически не проявляют флуоресценции. Преимущества окрашивания йодидом пропидия включают возможность мультиплексирования образцов клеток, быстрый анализ и простоту использования.

Другой широко используемый анализ цитотоксичности — анализ высвобождения фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ), который позволяет проводить быстрое и чувствительное определение цитотоксичности в различных типах клеток (van Meerloo и соавт., 2011). Анализ ЛДГ напоминает колориметрические анализы жизнеспособности клеток в свете сходства механизма и обнаружения живых клеток. Когда клетка теряет целостность мембраны, она высвобождает фермент ЛДГ, который затем используется в качестве катализатора для запуска двухстадийной реакции. Первым этапом является окислительно-восстановительная реакция между NAD^+ и лактатом. За этим следует восстановление соли тетразолия до формазана (рис. 4).

Приведенные методы применимы для любых видов клеток и могут быть использованы на ранних этапах ДКИ при оценке токсических свойств лекарственных препаратов.

Согласно классической схеме проведения ДКИ, для скрининга специфической активности и определения первичных фармакодинамических свойств используют специфические маркеры и антитела к ним, основываясь на этиологии заболевания и структуре тканей, являющихся мишенями для действия нового препарата. Имея

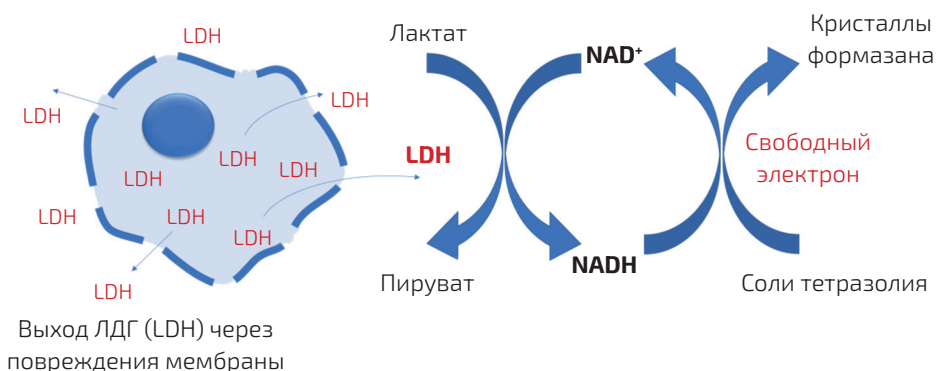


Рис. 4. Схема анализа высвобождения фермента лактатдегидрогеназы

данные о первичных механизмах и цитотоксических эффектах (если такие предполагаются), переходят к исследованиям *in vivo* (рис. 5).

Такой процесс разработки лекарств включает длительные и дорогостоящие процедуры поиска потенциальных молекул-лидеров и их оптимизации на клеточных моделях со слабыми трансляционными особенностями в отношении патогенеза заболевания у человека. Растущий спрос на разработку и оптимизацию клеточных моделей «физиологии» и «патологии» человека, которые могут быть реализованы на ранней стадии ДКИ, объясняется желанием учесть риски, при которых затраты на разработку значительно ниже, чем на II/III фазе клинических исследований (Ekert и соавт., 2020).

Эти соображения послужили предпосылкой к разработке методов с использованием 3D-культур и так называемых сложных моделей *in vitro* (CIVMs).

Трехмерные клеточные структуры

Двухмерные клеточные культуры остаются плоскими, не отражающими всей совокупности межклеточных взаимодействий в организме. Трехмерные структуры характеризуются естественным ростом клеток в трехмерной среде, при котором сохраняются межклеточные взаимодействия, контакты с внеклеточным матриксом и микросредой.

Базовая трехмерная культура — это тканевые сфероиды: сгустки из живых клеток (1000–20 000 штук) диаметром 200–300 мкм. Культивирование проводят либо в луночных планшетах с агаром, либо методом висячей капли, либо применяют специальные планшеты. Сфероиды можно «строить» на специальном каркасе (скаффолде), имитирующем внеклеточный матрикс, куда засеваются клетки. Сфероиды часто используют в доклинических исследованиях как модели бессосудистых опухолевых узлов, микрометастазов или участков солидных опухолей (Lee и соавт., 2007).

Трехмерные (3D) модели *in vitro* в процессе разработки лекарств могут помочь выбрать наиболее перспективные лекарственные препараты на доклинической стадии, сокращая, а иногда даже заменяя исследования на животных (Herrmann, Jaune, 2019). Для этой цели было разработано несколько типов 3D-культур *in vitro*, включая усовершенствованные модели, такие как органы на чипах и микрофлюид-

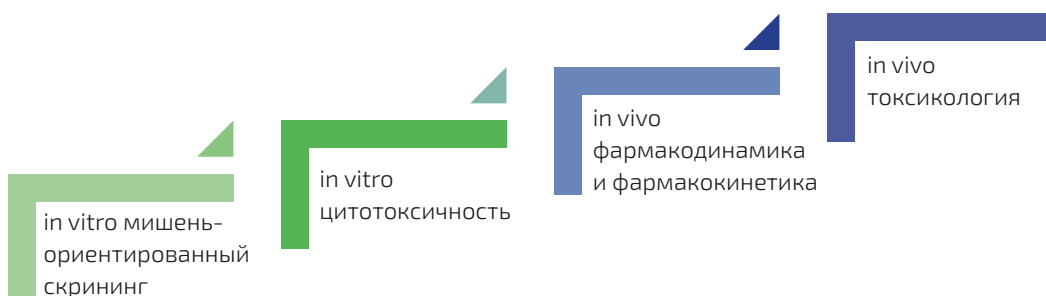


Рис. 5. Схема проведения ДКИ для скрининга специфической активности и определения первичных фармакодинамических свойств лекарственных средств

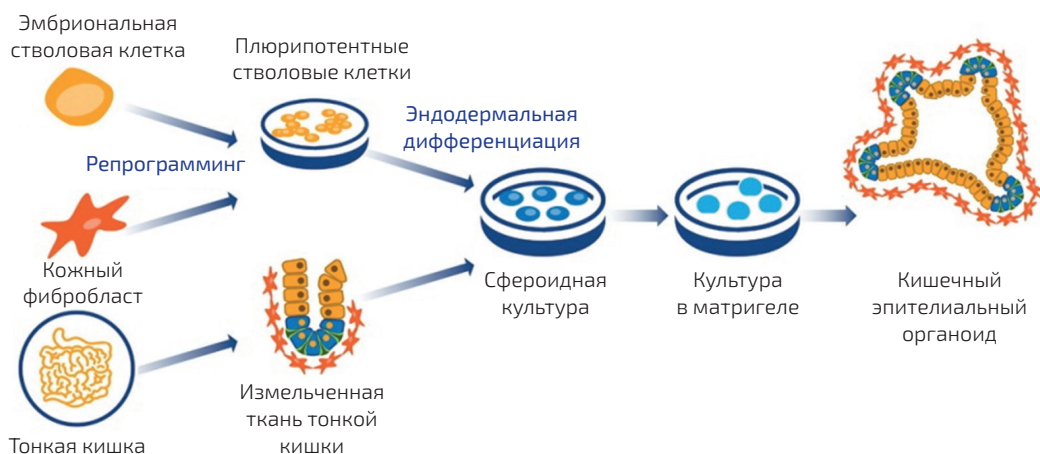


Рис. 6. Схема получения кишечного эпителиального органоида

ные модели (Sontheimer-Phelps и соавт., 2019), органоиды (Kim и соавт., 2020) и мини-органы (Lawlor и соавт., 2021). Эти модели также открыли много новых возможностей и направлений в области разработки лекарств. 3D-культуры, полученные из клеток, взятых у пациентов, могут быть применены для персонализированного медицинского подхода. Более того, разработка и трансляционное исследование новых методов лечения дегенеративных или регенеративных заболеваний могут быть ускорены с помощью решений тканевой инженерии, основанной на современных знаниях в области 3D-моделирования *in vitro*.

Применимость 3D-органов для исследования биохимических процессов в кишечнике связана с транспортом и метаболизмом питательных веществ и лекарств *in vitro*. Процессы транспорта и восприятия в кишечнике и их взаимосвязь с метаболизмом имеют отношение к таким патологиям, как синдромы мальабсорбции, воспалительные заболевания, ожирение и диабет 2-го типа. Образуя высокоселективный барьер, эпителиальные клетки кишечника поглощают, метаболизируют и высвобождают питательные вещества в кровообращение, тем самым обеспечивая доступность питательных веществ и метаболическое здоровье для всего организма. Разрабатывая различные методологии, можно выделить кишечные органоиды как надежный инструмент в этой области исследований. В настоящее время модели *in vitro* для изучения всасывания питательных веществ в кишечнике, транспорта лекарств и метаболизма энтероцитов, такие как клетки Caco-2 или модели эксплантатов грызунов, имеют ограниченную ценность из-за их ракового и нечеловеческого происхождения соответственно. В частности, видовые различия приводят к плохой корреляции данных, а результаты, полученные в этих моделях, не могут быть надежно экстраполированы на людей, о чем свидетельствует высокая частота отказов в разработке. Напротив, органоиды кишечника человека представляют собой превосходную модель кишечного эпителия и могут помочь внедрить принцип 3Rs в фундаментальную науку, а также в доклинические и регуляторные установки (рис. 6).

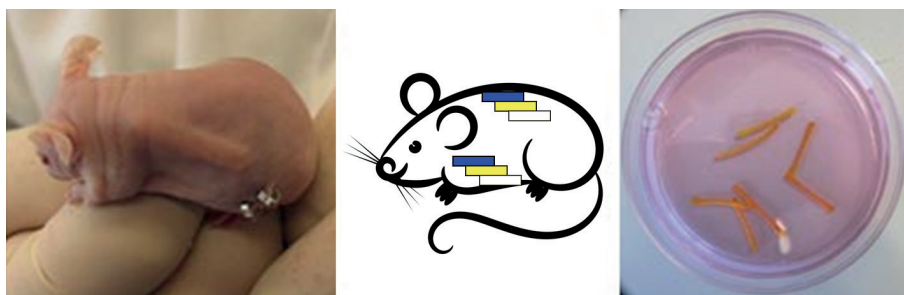


Рис. 7. Модель полых волокон (hollow fibre model)

Об этом в своем докладе «Преимущества и недостатки технологий *in vitro/ex vivo/in vivo*, на примере моделирования заболеваний кишечника» рассказала руководитель отдела молекулярной фармакологии АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» Яна Владимировна Агацарская.

Модель полых волокон представляет собой технологическую инновацию, основанную на предшествующих методах микрокапсулирования и последующего культивирования клеток (Suggitt и соавт., 2006). Модель включает 1–2-дневное культивирование *in vitro* набора линий опухолевых клеток, содержащихся в биосовместимых полых волокнах, и последующую подкожную имплантацию волокон мышам. Мыши получают разрабатываемое противоопухолевое средство в течение нескольких дней, а затем волокна удаляют для облегчения анализа жизнеспособности клеток. Таким образом, используя этот метод, можно оценивать терапевтическую эффективность наряду со способностью лекарственного средства достигать своей цели *in vivo* и можно предоставлять предварительные данные, связанные с безопасностью терапевтического средства, а также исследовать *in vivo* терапевтическую эффективность, связанную с клеточными линиями, полученными из опухоли, которые в противном случае не могли бы расти в тканях животного (рис. 7).

Для реализации инициатив по внедрению альтернативных тест-систем в ЕС создана и работает Референсная лаборатория Европейского союза по альтернативным испытаниям на животных, которая является неотъемлемой частью Объединенного исследовательского центра (Joint Research Centre — JRC). Появляется больше статей-руководств по проведению тестирования некоторых групп лекарственных препаратов с использованием клеточных технологий *in vitro* для получения более качественных данных об эффективности и безопасности лекарственных средств. Общие принципы сводятся к комбинированию моделей *in vivo* и клеточных технологий *in vitro*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Смирнова С.В. Опыт применения люминесцентных бактериальных биосенсоров на основе штамма *Escherichia coli* K12 в генотоксикологических исследо-

- ваниях: презентация к докладу на конференции GLP-PLANET IV, г. Санкт-Петербург, 28–30 июня 2023 г. Конференция GLP-PLANET: офиц. сайт. URL: <https://conf-glp-planet.com/wp-content/uploads/2023/08/smirnova-s.v.pdf>.
2. Cowan C.A., Atienza J., Melton D.A. et al. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells // *Science*. 2005. Vol. 309. N. 5739. P. 1369–1373. DOI: [10.1126/science.1116447](https://doi.org/10.1126/science.1116447).
 3. De Los Angeles A., Ferrari F., Xi R. et al. Hallmarks of pluripotency // *Nature*. 2015. Vol. 525. P. 469–478. DOI: [10.1038/nature15515](https://doi.org/10.1038/nature15515).
 4. Ekert J., Deakayne J., Pribul-Allen P. et al. Recommended Guidelines for Developing, Qualifying, and Implementing Complex In Vitro Models (CIVMs) for Drug Discovery // *SLAS Discovery: Advancing the Science of Drug Discovery*. 2020. Vol. 25. N. 10. P. 1174–1190. DOI: [10.1177/2472555220923332](https://doi.org/10.1177/2472555220923332).
 5. *Fundamental Techniques in Cell Culture. Laboratory Handbook*. 4th Edition. Sigma-Aldrich. 2018. 68 p.
 6. Guerrero S., López-Cortés A, Indacochea A. et al. Analysis of racial/ethnic representation in select basic and applied cancer research studies // *Scientific reports*. 2018. Vol. 8. N. 1. P. 13978. DOI: [10.1038/s41598-018-32264-x](https://doi.org/10.1038/s41598-018-32264-x).
 7. Herrmann K., Jayne K. *Animal experimentation: Working towards a paradigm change* // Brill. 2019. P. 752.
 8. Innocenti F., Kroetz D.L., Schuetz E. et al. Comprehensive pharmacogenetic analysis of irinotecan neutropenia and pharmacokinetics // *Journal of Clinical Oncology*. 2009. Vol. 27. N. 16. P. 2604–2614. DOI: [10.1200/JCO.2008.20.6300](https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.6300).
 9. Kim J., Koo B.K., Knoblich J.A. Human organoids: model systems for human biology and medicine // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020. Vol. 21. N. 10. P. 571–584. DOI: [10.1038/s41580-020-0259-3](https://doi.org/10.1038/s41580-020-0259-3).
 10. Lal S., Wong Z.W., Jada S.R. et al. Novel SLC22A16 polymorphisms and influence on doxorubicin pharmacokinetics in Asian breast cancer patients // *Pharmacogenomics*. 2007. Vol. 8. N. 6. P. 567–575. DOI: [10.2217/14622416.8.6.567](https://doi.org/10.2217/14622416.8.6.567).
 11. Lawlor K.T., Vanslambrouck J.M., Higgins J.W. et al. Cellular extrusion bioprinting improves kidney organoid reproducibility and conformation // *Nature materials*. 2021. Vol. 20. N. 2. P. 260–271. DOI: [10.1038/s41563-020-00853-9](https://doi.org/10.1038/s41563-020-00853-9).
 12. Lee G.Y., Kenny P.A., Lee E.H. et al. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells // *Nature methods*. 2007. Vol. 4. N. 4. P. 359–365. DOI: [10.1038/nmeth1015](https://doi.org/10.1038/nmeth1015).
 13. Ma B.B.Y., Hui E.P., Mok T.S.K. Population-based differences in treatment outcome following anticancer drug therapies // *Lancet oncology*. 2010. Vol. 11. N. 1. P. 75–84. DOI: [10.1016/S1470-2045\(09\)70160-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70160-3).
 14. van Meerloo J., Kaspers G.J.L., Cloos J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: Cree I. (eds). *Cancer Cell Culture. Methods in Molecular Biology*. 2011. Vol. 731. Humana Press. DOI: [10.1007/978-1-61779-080-5_20](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20).
 15. Paez J.G., Janne P.A., Lee J.C. et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy // *Science*. 2004. Vol. 304. N. 5676. P. 1497–1500. DOI: [10.1126/science.1099314](https://doi.org/10.1126/science.1099314).
 16. Petros W.P., Hopkins P.J., Spruill S. et al. (2005). Associations between drug metabolism genotype, chemotherapy pharmacokinetics, and overall survival in patients

- with breast cancer // *Journal of clinical oncology*. 2005. Vol. 23. N. 25. P. 6117–6125. DOI: [10.1200/JCO.2005.06.075](https://doi.org/10.1200/JCO.2005.06.075).
17. Renbarger J.L., McCammack K.C., Rouse C.E. et al. Effect of race on vincristine-associated neurotoxicity in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients // *Pediatric blood & cancer*. 2008. Vol. 50. N. 4. P. 769–771. DOI: [10.1002/pbc.21435](https://doi.org/10.1002/pbc.21435).
18. Saijo N. The role of pharmacoethnicity in the development of cytotoxic and molecular targeted drugs in oncology // *Yonsei medical journal*. 2013. Vol. 54. N. 1. P. 1–14. DOI: [10.3349/ymj.2013.54.1.1](https://doi.org/10.3349/ymj.2013.54.1.1).
19. Schwab M., Zanger U.M., Marx C. et al. Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: a prospective clinical trial by the German 5-FU Toxicity Study Group // *Journal of clinical oncology*. 2008. Vol. 26. N. 13. P. 2131–2138. DOI: [10.1200/JCO.2006.10.4182](https://doi.org/10.1200/JCO.2006.10.4182).
20. Shigematsu H., Lin L., Takahashi T. et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers // *Journal of the National Cancer Institute*. 2005. Vol. 97. N. 5. P. 339–346. DOI: [10.1093/jnci/dji055](https://doi.org/10.1093/jnci/dji055).
21. Sontheimer-Phelps A., Hassell B.A., Ingber D.E. Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips // *Nature Reviews Cancer*. 2019. Vol. 19. N. 2. P. 65–81. DOI: [10.1038/s41568-018-0104-6](https://doi.org/10.1038/s41568-018-0104-6).
22. Suggitt M., Cooper P. A., Shnyder S.D. et al. The hollow fibre model-facilitating anti-cancer pre-clinical pharmacodynamics and improving animal welfare // *International journal of oncology*. 2006. Vol. 29. N. 6. P. 1493–1499. DOI: [10.3892/ijo.29.6.1493](https://doi.org/10.3892/ijo.29.6.1493).
23. Tada M., Takahama Y., Abe K. et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by *in vitro* hybridization with ES cells // *Current Biology*. 2001. Vol. 11. N. 19. P. 1553–1558. DOI: [10.1016/S0960-9822\(01\)00459-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00459-6).
24. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. Vol. 126. N. 4. P. 663–676. DOI: [10.1016/j.cell.2006.07.024](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024).
25. Takahashi K., Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency // *Nature reviews Molecular cell biology*. 2016. Vol. 17. N. 3. P. 183–193. DOI: [10.1038/nrm.2016.8](https://doi.org/10.1038/nrm.2016.8).
26. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells // *Nature*. 1997. Vol. 385. N. 6619. P. 810–813. DOI: [10.1038/385810a0](https://doi.org/10.1038/385810a0).

Трансгенные животные. Технология разработки моделей и особенности использования в биомедицинских экспериментах

<https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-2-8-s6>

М.А. Акимова¹, А.А. Устюгов², А.В. Дейкин³

¹ АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,

² Центр доклинических испытаний ИФАВ РАН,

³ Белгородский государственный национальный исследовательский университет (НИУ «БелГУ»)

На конференции GLP-PLANET IV в рамках секции «Трансгенные животные. Технология разработки моделей и особенности использования в биомедицинских экспериментах» были заслушаны доклады специалистов отрасли, данные представлены в табл. 1.

Для описания животных, созданных с помощью генной инженерии, используется несколько терминов: генетически модифицированные, генетически измененные, трансгенные и полученные с помощью биотехнологий.

В Федеральном законе от 5 июля 1996 г. № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности»¹ содержится определение генетически модифицированных и трансгенных организмов:

- генно-инженерно-модифицированный организм — организм или несколько организмов, любое неклеточное, одноклеточное или многоклеточное образование, способные к воспроизводству или передаче наследственного генетического материала, отличные от природных организмов, полученные с применением методов генной инженерии и содержащие генно-инженерный материал, в том числе гены, их фрагменты или комбинации генов.
- трансгенные организмы — животные, растения, микроорганизмы, вирусы, генетическая программа которых изменена с использованием методов генной инженерии.

В то же время ст. 7. «Система безопасности в области генно-инженерной деятельности» указанного Федерального закона определяет уровни риска при осу-

¹ Федеральный закон от 5 июля 1996 г. № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности».

Содержание сессии «Трансгенные животные. Технология разработки моделей и особенности использования в биомедицинских экспериментах»

ФИО	Наименование доклада и ссылка
<p>Дейкин Алексей Васильевич, директор объединенного центра генетических технологий, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»</p>	<p>Геномное редактирование для создания животных моделей заболеваний человека</p>
<p>Леонова Елена Ивановна, директор Центра трансгеноза и редактирования генома, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»</p>	<p>Модели наследственных патологий сетчатки и подходы генной терапии</p>
<p>Покровский Михаил Владимирович, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии; директор НИИ Фармакологии живых систем, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»</p>	<p>Анализ двигательной функции мышей с генетическим дефицитом белка дисферлина</p>
<p>Мухамедьяров Марат Александрович, заведующий кафедрой нормальной физиологии, ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России</p>	<p>Изучение механизмов патогенеза и разработка подхода к лечению бокового амиотрофического склероза с применением линии трансгенных FUS-мышей</p>
<p>Билан Дмитрий Сергеевич, руководитель группы, старший научный сотрудник, ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН</p>	<p>Генетически кодируемые инструменты для исследования биологических процессов</p>
<p>Васильев Дмитрий Сергеевич, ведущий научный сотрудник, НИИ «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова»</p>	<p>Исследование нейродегенерации в кортикальных отделах мозга трансгенных мышей линии 5XFAD и возможность ее фармакологической коррекции</p>
<p>Корокин Михаил Викторович, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии, заведующий лабораторией НИИ фармакологии живых систем, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»</p>	<p>Характеристика состояния костной ткани у генетически модифицированных мышей с нарушениями энзиматической регуляции обмена стероидных гормонов</p>

Окончание таблицы 1

ФИО	Наименование доклада и ссылка
<p>Дубровская Надежда Михайловна, старший научный сотрудник, НИИ «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова»</p>	<p>Нарушение обонятельной и когнитивных функций у мышей линии 5XFAD коррелирует со снижением активности амилоиддеградирующего фермента неприлизина</p>
<p>Сопова Юлия Викторовна, ведущий научный сотрудник Центра трансгеноза и редактирования генома, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»</p>	<p>Мышиные модели болезни Альцгеймера: история и современность</p>

ществлении генно-инженерной деятельности, осуществляемой с использованием методов генной инженерии в целях создания генно-инженерно-модифицированных организмов в соответствии с риском при работе с микроорганизмами разного уровня патогенности. В связи с чем возникает ряд вопросов об отнесении к трансгенным/генетически модифицированным организмам ряда животных моделей: нокауты, полученные методом генного редактирования; модели с однонуклеотидными заменами или полученные методами химического или транспозонного мутагенеза.

Более того, в рамках действующего законодательства в «серой зоне» находится питомниководство лабораторных животных в части разведения и выращивания генетически модифицированных линий, поскольку такая деятельность прямо запрещена ст. 50 Федерального закона от 10 января 2002 г. № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды»²: «Запрещаются выращивание и разведение растений и животных, генетическая программа которых изменена с использованием методов генной инженерии и которые содержат генно-инженерный материал, внесение которого не может являться результатом природных (естественных) процессов, за исключением выращивания и разведения таких растений и животных при проведении экспертиз и научно-исследовательских работ».

Особую остроту несовершенство определений приобретает в связи с использованием трансгенных животных уже не только как моделей для исследований, но и в качестве «биофабрик» по производству гуманизированных антител или рекомбинантных белков уже не в научных, а производственных целях.

На ранних стадиях генной инженерии основной используемой технологией был трансгенез, буквально означающий перенос генетического материала от одного организма к другому. Однако с достижениями в этой области появились новые технологии, которые не обязательно требовали трансгеноза: недавние приложе-

² Федеральный закон от 10.01. 2002 № 7-ФЗ (ред. от 25.06.12) «Об охране окружающей среды».

ния позволяют создавать генетически модифицированных животных путем удаления генов, привнесения новых или манипулирования уже существующими генами (Shakweer W.M. E, Krivoruchko A.Y., Dessouki S.M. и соавт., 2023).

За последние 40 лет модели трансгенных животных сыграли жизненно важную роль для понимания регуляции генов и их функций в биологических системах и при заболеваниях человека. Возможно, одним из самых ранних и наиболее впечатляющих примеров в биологических исследованиях был случай, когда регуляторная область мышинового гена металлотионеина-I была слита со структурным геном, кодирующим гормон роста человека (GH), и введена мышам. Полученные в результате трансгенные мыши демонстрировали измененные характеристики роста и служили ценным ресурсом для анализа наследования и экспрессии генов, а также последствий избыточной продукции GH для различных физиологических процессов (Palmiter R.D., Norstedt G., Gelinas R.E. и соавт., 1983).

Методы получения трансгенных животных

Микроинъекция ДНК

Этот метод был впервые разработан в США (Lin T.P., 1966). При этом используется прямая микрохирургическая процедура для введения фрагмента чужеродной ДНК (трансгена) либо в цитоплазму, либо в ядро отдельной клетки. Многие копии фрагмента чужеродной ДНК вводят непосредственно в один или оба пронуклеуса только что оплодотворенной яйцеклетки. Если трансген интегрируется в геном на этой пронуклеарной стадии, то, конечно, каждая клетка получившегося животного (животного-основателя трансгенной линии) будет иметь этот трансген. Как правило, трансген необязательно всегда встраивается на этой стадии, это может произойти после одного или нескольких клеточных делений.

Для микроинъекции требуются стеклянная игла, микроинъектор и устройство позиционирования (микроманипулятор) для управления движением микропипетки. В основном для инъекций используют мужские пронуклеусы эмбрионов из-за их больших размеров. Как правило, в один эмбрион можно ввести 200–500 копий трансгена (Chrenek P., Makarevich A.V., Pivko J. и соавт., 2010).

Последние 15 лет технология микроинъекции переживает второе рождение, поскольку использование системы CRISPR/Cas9 геномного редактирования резко повысило ее эффективность, и сейчас уже можно говорить об инъекции в пронуклеус или в цитоплазму системы для редактирования генома не только привносящей разрыв в ДНК, но и обеспечивающей сайтспецифичное встраивание рекомбинантных конструкций (Riordan S.M., Heruth D.P., Zhang, L.Q. и соавт., 2015).

Перенос генов, опосредованный эмбриональными стволовыми клетками

В этом методе выделяют первые тотипотентные стволовые клетки, полученные из ранних преимплантационных эмбрионов. Затем вставка желаемого гена в эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) осуществляется с помощью процесса транс-

фекции — невирусного переноса нуклеиновых кислот в клетки эукариот (Gordon I., 1997).

Эти стволовые клетки, содержащие желаемый ген, встроенный путем гомологичной рекомбинации, используются для переноса в полость бластоцисты реципиента с последующей трансплантацией суррогатной матери, что приводит к получению химерных животных.

Эффективность случайной гомологичной рекомбинации не высока, и в последние 15 лет этот метод используют в сочетании с геным редактированием, что значительно повышает выход клеток с желаемыми изменениями. Таким образом, встроенный ген достигает соматических тканей и тканей зародышевой линии, откуда они затем передаются последующим поколениям.

Существенным ограничением метода является рождение химерных животных, где ткань затронута трансгеном фрагментарно — обычно это визуализируется как пятна «черного» трансгена (модифицированные стволовые клетки от мышей с черным окрасом) на шкуре белой мыши (донор бластоцисты зачастую имеет белый окрас). При низком уровне химеризма трансген в организме мыши есть, но потомкам он не передается.

Возможность выделения и поддержания ЭСК *in vitro* повышает эффективность воспроизводства трансгенных животных. ЭСК плюрипотентны по своей природе, поэтому они могут дифференцироваться в различные типы клеток/тканей и подвергаться генетической модификации для получения животных желаемых генотипов. ЭСК и первичные зародышевые клетки обеспечивают быстрое производство трансгенных животных посредством целенаправленных модификаций генов.

В 2007 г. «За открытие принципов введения специфических генных модификаций у мышей с использованием эмбриональных стволовых клеток» была присвоена Нобелевская премия по физиологии и медицине. В настоящее время этот метод наиболее успешно используется у мышей, поскольку мышинные ЭСК являются плюрипотентными, и при интеграции в бластоцисты они могут эффективно делиться и дифференцироваться в эмбрионе мыши. Таким образом, встроенный ген достигает соматических тканей и тканей зародышевой линии, откуда они затем передаются последующим поколениям.

Перенос генов, опосредованный ретровирусами

Ретровирус представляет собой одноцепочечный РНК-вирус с ферментом обратной транскриптазы, который при трансфекции образует ДНК из РНК. Он способен интегрироваться в ДНК хозяина и копироваться, когда клетка начинает делиться. После интеграции происходит производство химер, потому что не все клетки могут иметь трансген. Чистый гомозиготный трансген может быть получен через 10–20 поколений путем инбридинга, сохранен и использован для последующей имплантации. С помощью этого метода были успешно получены трансгенные мыши (Onishi M., Kinoshita S., Morikawa Y. и соавт., 1996).

Стволовые клетки мужской зародышевой линии, способные к самообновлению, а также к генетическим модификациям, трансфицируются ретровирусом. Кроме

того, эти клеточные линии используются для изучения биологии их сложных процессов самообновления и дифференцировки, а также для получения широкого спектра трансгенных видов животных. Данный метод подходит для получения трансгенных птиц и других видов животных. Наиболее часто используемыми ретровирусными векторами являются вирус мышинного лейкоза (вызывает лимфоидный лейкоз у хомяков, крыс и мышей), вирус саркомы Рауса (раковое образование у человека) и вирус лейкоза птиц (птицы).

Основным ограничением этого метода является то, что ретровирус не может нести большой размер нужного фрагмента ДНК для переноса в клетку.

Использование транспозонов

Транспозоны представляют собой участки естественной последовательности ДНК [около 1–3 тыс. пар нуклеотидов (т.п.н.)], которые самореплицируются и случайным образом интегрируются в несколько участков одного и того же генома. Интеграция возможна, поскольку сам транспозон кодирует фермент интегразу. У многих видов, особенно немлекопитающих, чужеродная ДНК, инъектированная в эмбрион, почти никогда не интегрируется в геном; примеры включают курицу, медаку, дрозофилу и шелкопряда. Чужеродную ДНК можно ввести в транспозон *in vitro*, а рекомбинантный транспозон можно микроинъектировать в одноклеточные эмбрионы вместе с ферментом транспозон-интегразой. Тем самым все трансгенные насекомые генерируются с использованием специфических транспозонных векторов, и их эффективность также доказана при получении трансгенных рыб, кур и млекопитающих. Потенциал опосредованного транспозонами переноса генов недавно был в значительной степени повышен, поскольку он с высокой эффективностью переносит чужеродную ДНК (Sumiyama K., Kawakami K., Yagita K.A., 2010).

Метод ядерного переноса

Этот метод появился в середине 1980-х годов. После 30 лет успешных экспериментов на лягушках его теперь практикуют у разных видов животных. Трансгенная овца Долли была получена с использованием метода переноса ядер соматических клеток (Wilmut I., Schnieke, A. E., McWhir J. и соавт., 1997).

Плюрипотентность можно проверить, перенеся ядро из культивируемой клетки в энуклеированную яйцеклетку и определив, поддерживает ли восстановленная яйцеклетка развитие и образование жизнеспособного потомства.

Метод переноса ядер, или перенос ядер соматических клеток (somatic cell nuclear transfer — SCNT), является более безопасным и эффективным способом создания трансгенных животных с точки зрения сохранения большого количества эмбрионов. Во время SCNT ядро берется из соматической клетки, такой как клетка кожи, и затем ядро, содержащее трансген, переносится в денуклеированную яйцеклетку. Когда яйцеклетка превращается в бластоцисту, ее имплантируют приемной матери (рис. 1). В этом методе перенос ядра соматической клетки в цитоплазму денуклеированного яйца должен быть перепрограммирован цитоплазматическими

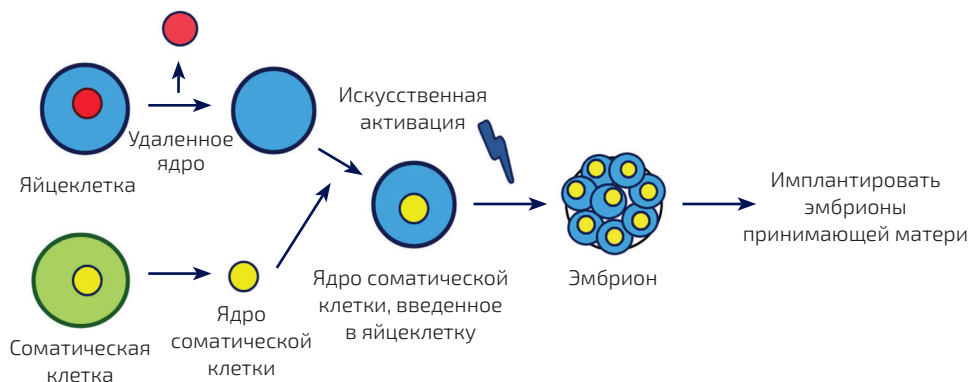


Рис. 1. Процесс переноса ядра соматической клетки включает удаление ядра из яйцеклетки с последующим переносом и слиянием ядра донорской соматической клетки с энуклеированной яйцеклеткой. Затем манипулируемая яйцеклетка искусственно активируется и делится, образуя эмбрион, который будет имплантирован матери-хозяину для дальнейшего развития

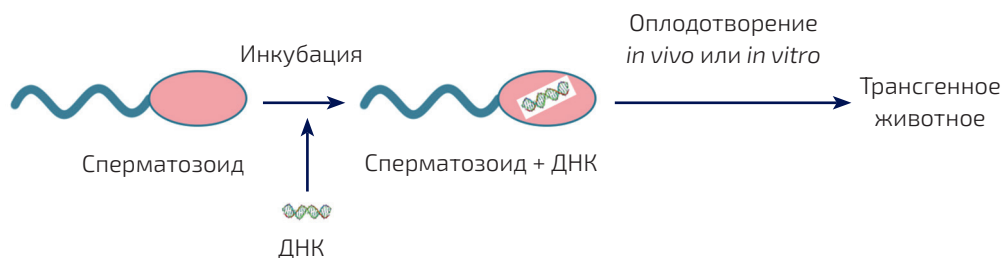


Рис. 2. Метод переноса генов через сперму

факторами яйца с образованием. Это гарантирует, что потомство будет на 100% трансгенным, поскольку только что имплантированное ядро уже содержит трансген в своем геноме.

Перенос генов через сперму

Для производства трансгенных животных доступен новый метод, называемый «спермоопосредованный перенос генов» (Sperm-Mediated Gene Transfer — SMGT), который основан на присущей сперматозоидам способности связывать и интернализировать экзогенные молекулы ДНК и переносить их в ооцит при оплодотворении в качестве альтернативы микроинъекции. Есть три важных шага для успешного переноса генов с помощью сперматозоидов для создания трансгенных животных. Первым шагом является связывание ДНК на поверхности сперматозоида, за которым следует интернализация чужеродной ДНК в ядро и, наконец, интеграция экзогенной ДНК (рис. 2).

Хотя механизм каждого отдельного шага до конца не изучен, значительный прогресс, достигнутый за последние несколько лет, позволил лучше понять этот процесс. Первая трансгенная мышь была создана в начале 1990-х путем инкубации сперматозоидов с экзогенной ДНК с последующим экстракорпоральным оплодотворением. Этот успех привел к новому интересу к трансгенной технологии из-за ее простоты; различные методы были успешно использованы для создания трансгенных животных, в том числе мышей, свиней, рыб, кур и т.д. К преимуществам данного метода можно отнести большую эффективность, дешевизну, простоту применения, отсутствие манипуляций с эмбрионами, необходимость в дорогостоящем оборудовании.

Искусственный хромосомно-опосредованный перенос генов

Гены, используемые для экспрессии в прокариотах, обычно представляют собой кДНК, ген меньшего размера; кДНК плохо экспрессируются в клетках млекопитающих. Следовательно, для трансгенеза используются геномные ДНК большего размера. Для экспрессии трансгена в клетках млекопитающих важные регуляторные последовательности гена должны присутствовать выше или ниже гена. Однако при переносе трансгена в клетку эти регуляторные последовательности редко сохраняются в составе вставки. Полные трансгенные комплексы становятся слишком большими (более 100 т.п.н.) для обычного вектора.

Искусственные хромосомы человека (human artificial chromosome — HАС), или дополнительные минихромосомы, искусственно созданные с помощью либо нисходящего (инженерная хромосома), либо восходящего подхода (искусственная хромосома *de novo*), представляют собой новое поколение векторов доставки генов. Они имеют несколько преимуществ по сравнению с другими векторами доставки генов, включая способность нести большие генные вставки и стабильное поддержание эписом в одной копии. Векторные системы на основе HАС могут обеспечить физиологическую регуляцию введенного гена как нативной хромосомы. HАС также может нести геномные локусы с регуляторными элементами, что позволяет экспрессировать трансгены в генетическом окружении, сходном с природной хромосомой. Искусственные хромосомы человека реплицируются и сегрегируют независимо от генома хозяина как естественные хромосомы. HАС могут точно имитировать нормальный паттерн экспрессии генов, так как они могут содержать полные геномные локусы, включая регуляторные элементы выше и ниже по течению. Преимущество этой процедуры заключается в том, что чужеродные генетические материалы могут быть перенесены в эмбриональные стволовые клетки мыши с использованием искусственной хромосомы человека в качестве вектора. Он может переносить большие сегменты геномной ДНК, превышающие размер максимальной емкости обычных векторов клонирования, таких как искусственная хромосома дрожжей, хотя эффективность переноса нуждается в повышении.

Метод трансплантации клеток яичка

Данный метод работает путем трансфекции сперматогоний *in situ* путем переноса трансгенов в семенные каналы с последующей трансплантацией в яички



Рис. 3. Схема трансплантации зародышевых клеток

хозяина. Клетки, происходящие из семенников, трансплантированные в семенники бесплодных самцов, заселяют семенники хозяина, генерируют сперму и способствуют воспроизведению трансгенного потомства. В 2001 г. с помощью этой техники трансплантации стало возможным получать трансгенных животных (Takashima S., Shinohara T., 2018). Используя этот метод, мы генетически манипулируем донорскими сперматогониальными стволовыми клетками перед трансплантацией в семенники животного-реципиента. Генетически модифицированные сперматогониальные стволовые клетки будут колонизировать и инициировать донорский сперматогенез у трансгенных животных (рис. 3).

Различные виды трансгенных животных

Существует множество заболеваний человека, для которых отсутствуют модели животных, что сильно затрудняет разработку терапевтических средств. Путем трансгенеза было получено несколько мышей с генетическими повреждениями, идентичными тем, которые существуют при некоторых наследственных заболеваниях человека. Такие мыши позволяют детально изучить молекулярные и биохимические последствия дефицита генов, а также являются тест-системами для предварительного скрининга потенциальных модифицирующих болезнь препаратов. Работать с крупными домашними животными намного сложнее, чем с мышами. Во-первых, крупные домашние животные не производят большого количества яйцеклеток. Во-вторых, реимплантация манипулированных эмбрионов более сложна, например, яванские макаки

не дадут более двух потомков. В-третьих, яйцеклетки многих животных имеют непрозрачную цитоплазму, поэтому невозможно увидеть их пронуклеусы или ядра, не прибегая к центрифугированию для отделения цитоплазматического содержимого.

Для экспериментальных целей производство трансгенных мышей является подходящим выбором. Суперовулированная мышь может стать донором до 40 здоровых яйцеклеток, при этом реимплантация относительно проста, и мыши могут выносить до 20 потомков.

Трансгенных мышей можно разделить на две группы на основе функциональной активации и дезактивации гена.

Нокаутные мыши (Knockout mice)

Животные модели, которые были генетически модифицированы для удаления или инактивации целевого гена. Термин «нокаут» относится к нокауту функциональности гена-мишени. Эти мышинные модели позволяют определить, как потеря гена влияет на физиологию, поведение и развитие болезни, а также узнать насколько изменится экспрессия других генов. Наблюдение за характеристиками нокаутного фенотипа также может помочь исследователям понять экспрессию генов человека и генетические заболевания.

Условно-нокаутные мыши (Knock-in mice)

Животные модели, которые имеют вставку в определенный локус для получения генетически модифицированных мышей для индивидуальных исследовательских целей. Гены-реципиента, гены человека, родственные гены одного и того же организма или точечные мутации могут быть введены в кодирующую белок область гена для получения нокаутированных мышей.

Разница между условно-нокаутным и нокаутным подходом заключается в том, что условно-нокаутные модели мышей используются для управления экспрессией экзогенного трансгена или генной мутации, тогда как нокаутные стремятся нарушить экспрессию определенного гена или локуса.

Оценка благополучия генетически-модифицированных животных

Генетические изменения могут непредсказуемо поставить под угрозу благополучие животных. У генетически модифицированных животных, используемых в исследованиях, неблагоприятные фенотипы могут проявляться, даже если они не подвергаются экспериментальному воздействию. Однако определение степени тяжести фенотипа довольно сложно из-за их большого разнообразия (Zintzsch A., Noe E., Reibmann M. и соавт., 2017).

Несмотря на то, что у большинства трансгенных животных достаточно сложно определить качественные или количественные фенотипические изменения, широкий фенотипический скрининг 303 линий мышей, проведенный консорциумом European Mouse Disease Clinic (EUMODIC), показал, что около 12% гомозиготных мутантов имеют практически нежизнеспособный фенотип (Hrabě de Angelis M., Nicholson G., Selloum M. и соавт., 2015). Без надлежащего ухода данные модели животных подвергаются повышенному риску испытать боль, страдание или дистресс, связанные исключительно с их генетическими изменениями.

При получении новой линии генетически модифицированных животных обязательным является систематическая оценка их благополучия на протяжении всей жизни. Частота мониторинга и временные точки должны быть адаптированы к тяжести ожидаемого фенотипа, чтобы обеспечить надлежащий уход.

При выявлении неожиданного фенотипа линия должна быть переоценена на основании оценки благополучия животных (Zintzsch A., Noe E., Grimm H., 2020).

Для установленных линий в большинстве случаев можно описать фенотипические признаки, и, кроме непредсказуемых событий, таких как спонтанные мутации и возможные воздействия на фенотип, классифицировать вклад генетического вмешательства по фенотипическим проявляемым признакам. Этот подход позволяет оценивать степень тяжести фенотипа.

При проведении оценки категории тяжести фенотипа генетически модифицированных животных важно различать: разведение и поддержание известной линии или создание новой.

В то время как при разведении и поддержании известной линии доступны существующие знания о потенциальной степени тяжести фенотипа, то при создании новой линии необходимо проводить дальнейшую дифференциацию между разработкой новых линий без предварительных сведений о фенотипе и селекцией линий с ожидаемым фенотипом, основанную на имеющейся информации о функции гена или ветеринарном состоянии существующей линии с аналогичными генными модификациями.

Для большинства новых линий оценка выраженности фенотипа сопровождается высокой степенью неопределенности. Функции и патофизиологические взаимодействия для многих генов до сих пор не известны (Meehan T.F., Conte N., West D.B. и соавт., 2017), что влечет за собой невозможность описания ожидаемого фенотипа.

Если функция гена уже известна, или генетическое изменение новой линии предполагает сходство с уже существующими линиями, эту информацию можно использовать для выдвижения гипотезы о степени тяжести фенотипа. Далее на основе систематической оценки благополучия неизвестных или неожиданных фенотипов может быть установлена фактическая степень тяжести фенотипа и принято решения о дальнейшем разведении или не разведении животных.

Кроме того, необходимо указывать неопределенности и возможные последствия фенотипа, чтобы адекватно реагировать на них с точки зрения благополучия животных.

Оценка фактора неопределенности

В отношении генетически модифицированных животных выделяют следующие аспекты неопределенности вреда для здоровья животных:

- вид вреда;
- тяжесть вреда;
- вероятность вреда.

Неопределенность может быть низкой, средней или высокой в зависимости от имеющихся знаний. Стоит отметить, что неопределенность может быть увеличена по причине недостатка знаний и может быть уменьшена при получении допол-

Таблица 2

Фактор неопределенности	Определение	Установление фактора неопределенности,	
		Возможность выявления	Проспективная оценка
Низкий	Имеется обширная литература (например, научные статьи или базы данных об этих генетически измененных животных) или опыт применения метода или фенотипа, который дает четкое представление о том, что ожидается	Возможна	Рекомендуется, но не требуется
Средний	Доступна некоторая литература или опыт использования метода или фенотипа, которые предоставляют индикаторы для оценки тяжести, но все еще до конца не изучены	Маловероятна	Настоятельно рекомендуется проводить
Высокий	Отсутствует литература или опыт применения метода или фенотипа	Невозможна	Обязательна

*Примечание. * Оценка должна основываться на параметрах наблюдения и не должна включать вмешательства, которые могут вызвать дополнительную боль, страдание или дистресс. Если для характеристики тяжести фенотипа требуются инвазивные методы, это должно быть включено в рассмотрение проекта.*

нительных сведений, а также при обмене опытом. Управление фактором неопределенности описано в табл. 2.

3Rs как инструмент управления фактором неопределенности

Как указывалось ранее, присвоение фактора неопределенности способствует прозрачности исследования и иллюстрирует необходимость специального мониторинга, а также определения конечных точек на основе фенотипа или конкретной процедуры.

возможность выявления и воздействия на него

Факторы оценки благосостояния	Схема оценки*	Ответственные
Животных оценивают в определенные моменты времени от начала заболевания до конца жизни. Фенотип развивается в соответствии с предыдущим опытом или данными литературы	Адаптируйте схему оценки общего благополучия в соответствии с ожидаемыми клиническими признаками	Ученый и/или наблюдатель, при необходимости ветеринарный врач
Животных оценивают в моменты времени в соответствии с ожидаемым началом заболевания до конца жизни. Следует определить дополнительные временные точки для распознавания неожиданных эффектов (должны быть охвачены все этапы жизненного цикла)	Адаптируйте схему оценки общего благополучия в соответствии с ожидаемыми клиническими признаками. Включите общие критерии благополучия, например, измерение массы тела для скорейшего выявления неожиданных событий и патолого-анатомическое исследование. Рассмотрите возможность установления конечных гуманных точек	Ученый и/или наблюдатель, обязательное привлечение ветеринарного врача
Должны быть охвачены все этапы жизненного цикла	Используйте общую схему оценки благосостояния. Включите патолого-анатомическое исследование. Рассмотрите возможность установления конечных гуманных точек	Два опытных сотрудника, привлечение ветеринарного врача для постоянного наблюдения и окончательной оценки фенотипа

Инструмент оценки генетически измененных животных 3Rs направляет оценку и облегчает обзор выбранных методов в отношении определения и наилучшего снижения фактора неопределенности или решения этой проблемы. Для оценки неопределенностей, можно использовать шаблон (табл. 3).

Принцип 3Rs был разработан, чтобы предоставить всесторонний обзор всех аспектов, связанных с благополучием, при использовании генетически модифицированных животных в исследованиях. Компоненты, приведенные в таблице 3, могут отличаться в зависимости от фенотипа животных, создания новых линий или поддержания установленных, а также от целей исследования.

Таблица 3

Компоненты для оценки неопределенностей

Компонент	Опишите процедуру или фактор причинения вреда	Фактор неопределенности в отношении вреда	Модулирующие факторы вреда, влияющие на серьезность	Классификация степени тяжести
Какой метод генетической инженерии используется		<input type="checkbox"/> Низкий		<input type="checkbox"/> Без вреда для здоровья
		<input type="checkbox"/> Средний		<input type="checkbox"/> Легкая
		<input type="checkbox"/> Высокий		<input type="checkbox"/> Умеренная
Какой метод используется для получения стерильных самцов		<input type="checkbox"/> Низкий		<input type="checkbox"/> Тяжелая
		<input type="checkbox"/> Средний		<input type="checkbox"/> Без вреда для здоровья
		<input type="checkbox"/> Высокий		<input type="checkbox"/> Легкая
Какой способ используется для получения бластоцист		<input type="checkbox"/> Низкий		<input type="checkbox"/> Умеренная
		<input type="checkbox"/> Средний		<input type="checkbox"/> Тяжелая
		<input type="checkbox"/> Высокий		<input type="checkbox"/> Без вреда для здоровья
Каким методом планируется перенос эмбрионов		<input type="checkbox"/> Низкий		<input type="checkbox"/> Легкая
		<input type="checkbox"/> Средний		<input type="checkbox"/> Умеренная
		<input type="checkbox"/> Высокий		<input type="checkbox"/> Тяжелая
Какой фенотип ожидается		<input type="checkbox"/> Низкий		<input type="checkbox"/> Без вреда для здоровья
		<input type="checkbox"/> Средний		<input type="checkbox"/> Легкая
		<input type="checkbox"/> Высокий		<input type="checkbox"/> Умеренная
Какие условия ведения хозяйства влияют на фенотипические характеристики		<input type="checkbox"/> Низкий		<input type="checkbox"/> Тяжелая
		<input type="checkbox"/> Средний		<input type="checkbox"/> Без вреда для здоровья
		<input type="checkbox"/> Высокий		<input type="checkbox"/> Легкая
Какую схему разведения планируется использовать. Как будут поступать с излишками животных		<input type="checkbox"/> Низкий		<input type="checkbox"/> Умеренная
		<input type="checkbox"/> Средний		<input type="checkbox"/> Тяжелая
		<input type="checkbox"/> Высокий		<input type="checkbox"/> Без вреда для здоровья
Какой метод взятия образцов тканей будет использоваться		<input type="checkbox"/> Низкий		<input type="checkbox"/> Легкая
		<input type="checkbox"/> Средний		<input type="checkbox"/> Умеренная
		<input type="checkbox"/> Высокий		<input type="checkbox"/> Тяжелая

Предполагаемая степень тяжести исследования: Легкая Умеренная Тяжелая

Оценка благосостояния на основании данных табл. 2.	<input type="checkbox"/> Да <input type="checkbox"/> Нет
Планируется ретроспективная оценка	Если да, то опишите свой план <input type="checkbox"/> Да <input type="checkbox"/> Нет

Для присвоения коэффициента неопределенности используйте табл. 2.

3Rs предоставляет возможность прозрачно описывать и оценивать факторы вреда, а также служит напоминанием об обстоятельствах, которые можно легко контролировать. Дальнейшие меры управления (например, структурированная оценка благосостояния, ретроспективная оценка) должны быть представлены на основе фактора неопределенности.

С помощью 3Rs должна быть возможность проверить, реализуется ли в соответствии с принципом пропорциональности фактор неопределенности таким образом, чтобы можно было мгновенно свести к минимуму потенциально возникающий риск ухудшения благополучия животных.

Несоответствия в классификации степени тяжести фенотипа

Классификация степени тяжести фенотипа еще не унифицирована в Европе. Например, результаты опроса, в котором приняли участие 358 человек, выявили огромные различия в классификации нарушений у слепых мышей. Опрос проводился во время лекций на международных научных конференциях и встречах в четырех разных европейских странах. По результатам опроса касательно степени тяжести были получены следующие результаты:

- без вреда для здоровья — 16%;
- легкая — 50%;
- умеренная — 21%;
- тяжелая — 13%.

Данные результаты показывают, что в настоящее время не достигнуто единой классификации серьезности, даже в вопросе присвоения тяжести процедур (Zintzsch A., 2013).

Документация и обмен данными для улучшения благосостояния генетически модифицированных животных имеет решающее значение для снижения фактора неопределенности взаимосвязи генотип—фенотип.

Источники информации имеющихся штаммов животных предоставляются в онлайн базах, таких как:

- Международный ресурс штаммов мышей (IMSR) [The Jackson Laboratory International Mouse Strain Resource (IMSR) (accessed on 12 March 2020); Available online: www.findmice.org];
- информатика генома мыши (MGI) [The Jackson Laboratory Mouse Genome Informatics (accessed on 12 March 2020); Available online: <http://www.informatics.jax.org/>];
- Международный консорциум по фенотипированию мышей (IMPC) [International Mouse Phenotyping Consortium (accessed on 12 March 2020); Available online: www.mousephenotype.org];
- Европейский архив мышиных мутантов (EMMA) [European Mouse Mutant Archive (accessed on 12 March 2020); Available online: www.infrafrontier.eu];
- JAX Labs: <https://www.jax.org>;
- Ricken Labs (Japan): <https://knowledge.brc.riken.jp>.

Для практической оценки степени тяжести фенотипа и дополнительной информации необходимо регистрировать наблюдения, сделанные во время генерации, разведения и содержания трансгенных животных. Ответы на вопросы следует классифицировать как факторы вреда или модулирующие факторы, табл. 4–11.

Генная инженерия

Потенциальные побочные эффекты различных методов генной инженерии следует учитывать при определении факторов для проспективной оценки тяжести.

Точность методов, используемых для изменения генов, была значительно улучшена за последние годы. В частности, редактирование генома и последующее получение трансгенных животных ускорилось с развитием технологии CRISPR/Cas9 (Shen B., Zhang W., Zhang J. и соавт., 2014). В целом, выбранный метод должен быть научно обоснован в соответствии с научными целями, предполагаемыми генетическими изменениями и требуемым количеством животных. Поскольку проспективные оценки основаны на гипотезах, предполагаемая серьезность и возможность улучшения должны быть подтверждены фактической оценкой благополучия животных (см. табл. 4).

Стерильные самцы

Бесплодные самцы необходимы для индуцирования ложной беременности у самок мышей в качестве предварительного условия для успешного переноса эмбрионов. В случае хирургического вмешательства воздействие процедуры и связанная с ней послеоперационная боль являются факторами вреда. В связи с чем стратегии усовершенствования имеют здесь важное значение. Процедура хирургической вазэктомии обычно классифицируется как средней тяжести (Seruggia D., Fernández A., Cantero M. и соавт., 2015). Параметры для проведения проспективной и ретроспективной оценки проекта метода получения стерильных самцов представлены в табл. 5.

Производство бластоцист (протоколы суперовуляции и самки-доноры)

В процессе создания новой линии мышей или повторного выведения в виварии суперовуляция самок-доноров и последующий перенос эмбрионов приемным матерям являются неизбежными и часто применяемыми методами. Однако при планировании и проведении данных процедур необходимо учитывать видимость вреда. Индукция суперовуляции гормональными препаратами PMSG и HCG с последующим забором яйцеклеток для экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) сперматозоидами, является распространенным способом получения эмбрионов.

В случае если ЭКО не происходит по причинам, зависящим от трансгенной линии, другим вариантом являются естественное спаривание самок и самцов и последующий сбор предимплантированных эмбрионов. Параметры для проведения проспективной и ретроспективной оценки метода получения бластоцист представлены в табл. 6.

Перенос эмбрионов и реципиенты-матери

Перенос эмбрионов в матку самок-реципиентов, которые служат приемными матерями, является стандартной процедурой для повторного выведения или воспроизводства новой линии в виварии. Перенос эмбрионов может проводиться безоперационным или хирургическим путем.

Таблица 4

Параметры для проведения проспективной
и ретроспективной оценки проекта метода генной инженерии

Проспективная оценка проекта	Ретроспективная оценка проекта
<p>Опишите процедуру причинения вреда или фактор вреда. <i>Какой метод генной инженерии используется?</i></p>	<p>Перечислите модулирующие факторы вреда в соответствии с фактическими наблюдениями, которые не были учтены при проспективной оценке проекта.</p>
<p>Укажите модулирующие факторы вреда, влияющие на тяжесть фенотипа.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Метод случайной геномной инженерии с высокой вероятностью побочных эффектов?</i> • <i>Есть ли шанс использовать более специфическую методику с менее выраженными ожидаемыми побочными эффектами?</i> • <i>Насколько эффективен этот метод по сравнению с другими методами?</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Присутствуют ли побочные эффекты?</i> • <i>Рождаются ли животные с желаемым генотипом?</i> • <i>Сколько поколений скрещивания необходимо для получения желаемого генотипа, включая обратное скрещивание с определенным генетическим фоном?</i>

Таблица 5

Параметры для проведения проспективной
и ретроспективной оценки проекта метода получения стерильных самцов

Проспективная оценка проекта	Ретроспективная оценка проекта
<p>Опишите процедуру причинения вреда или фактор вреда. <i>Какой метод используется для получения стерильных самцов?</i></p>	<p>Перечислите модулирующие факторы вреда в соответствии с фактическими наблюдениями, которые не были учтены при оценке проспективного проекта.</p>
<p>Укажите модулирующие факторы вреда, влияющие на тяжесть фенотипа.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Используется ли адекватная анестезия в случае хирургической вазэктомии для облегчения боли в послеоперационный период?</i> • <i>Насколько опытны хирурги?</i> • <i>Как содержатся стерильные самцы между циклами спаривания?</i> • <i>Требуется ли одиночное содержание?</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Хорошо ли животные восстанавливались после наркоза?</i> • <i>Есть ли какие-либо признаки ухудшения самочувствия или задержки заживления ран?</i>

Таблица 6

Параметры для проведения проспективной
и ретроспективной оценки метода получения бластоцист

Проспективная оценка проекта	Ретроспективная оценка проекта
<p>Опишите процедуру причинения вреда или фактор вреда. <i>Какой метод используется для получения бластоцисты?</i></p> <hr/> <p>Укажите модулирующие факторы вреда, влияющие на тяжесть фенотипа.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Какие ресурсы и методика используются для получения бластоцист?</i> • <i>Нужны самки-доноры для получения бластоцист или доступен ли криоконсервированный материал?</i> • <i>Какой протокол суперовуляции используется?</i> • <i>Какое влияние оказывает суперовуляция на самочувствие самок?</i> • <i>Проводится ЭКО или естественное спаривание и как это отражается на самочувствии самок?</i> 	<p>Перечислите модулирующие факторы вреда в соответствии с фактическими наблюдениями, которые не были учтены при оценке проспективного проекта.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Оказалась ли эффективной суперовуляция у соответствующего штамма?</i> • <i>Был ли выход бластоцист достаточным?</i>

Таблица 7

Параметры для проведения проспективной
и ретроспективной оценки проекта трансплантации эмбрионов

Проспективная оценка проекта	Ретроспективная оценка проекта
<p>Опишите процедуру причинения вреда или фактор вреда. <i>Какой метод планируется для трансплантации эмбрионов?</i></p> <hr/> <p>Укажите модулирующие факторы вреда, влияющие на тяжесть фенотипа.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Включает ли перенос эмбриона хирургические вмешательства или осуществляется безоперационным путем?</i> • <i>Проводится односторонняя или двусторонняя трансплантация эмбрионов?</i> • <i>Планируется ли обезболивание для облегчения боли в послеоперационный период?</i> • <i>Какой штамм используется в качестве матерей-реципиентов и каковы ожидаемые показатели при переносе эмбрионов?</i> • <i>Насколько опытны хирурги?</i> 	<p>Перечислите модулирующие факторы вреда в соответствии с фактическими наблюдениями, которые не были учтены при оценке проспективного проекта.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Хорошо ли животные восстанавливались после наркоза?</i> • <i>Есть ли какие-либо признаки ухудшения самочувствия или задержки заживления ран?</i> • <i>Насколько эффективным был перенос эмбрионов (учитывайте соотношение резорбции эмбрионов и рожденных животных)?</i>

Таблица 8

Параметры для проведения оценки потенциального вреда генетически измененной линии

Перспективная оценка проекта	Ретроспективная оценка проекта
<p>Опишите процедуру причинения вреда или фактор вреда. <i>Какой фенотип ожидается?</i></p> <hr/> <p>Укажите модулирующие факторы вреда, влияющие на тяжесть фенотипа.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Могут ли быть предприняты эффективные меры по снижению выраженности вредных фенотипов?</i> • <i>Как будет осуществляться мониторинг животных с прогрессирующими фенотипами?</i> • <i>Накапливается ли тяжесть вреда животному в течение всей жизни?</i> 	<p>Перечислите модулирующие факторы вреда в соответствии с фактическими наблюдениями, которые не были учтены при оценке перспективного проекта.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Можно ли использовать животных с прогрессирующими фенотипами до момента их проявления?</i> • <i>Какой процент животных демонстрирует вредный фенотип?</i> • <i>Присутствует ли фенотип в разных генотипах?</i> • <i>Какую степень тяжести вы бы присвоили каждому фенотипу, связанному с генотипом?</i>

В большинстве случаев используется хирургический метод, и поскольку данный метод всегда связан с болью и дистрессом для животного, адекватная анестезия и обезболивание являются основополагающими требованиями. Параметры для проведения перспективной и ретроспективной оценки проекта трансплантации эмбрионов представлены в табл. 7.

Характеристики фенотипа

При оценке потенциального вреда генетически измененной линии фенотипические характеристики являются основным компонентом оценки вреда.

Важно уделять пристальное внимание всем фенотипическим характеристикам независимо от того, влияют они на органические функции или модель поведения животных.

При проведении систематической оценки необходимо учитывать фактическое благополучие животных и степень тяжести процедур, особенно новых линий.

В случае воспроизводства устоявшихся линий, несмотря на то что их фенотипы подробно описаны, и оценка вреда основана на данных, полученных в результате предыдущей селекции, необходим дальнейший анализ в отношении потенциального ухудшения самочувствия животных.

При наличии прогрессирующих фенотипов заболевания продолжительность и интенсивность возникающей боли, страдания или дистресса представляют особый интерес и должны приниматься во внимание для присвоения определенной степени тяжести (Zintzsch A., Noe E., Reißmann M. и соавт., 2017). Параметры для проведения перспективной и ретроспективной оценки потенциального вреда генетически измененной линии представлены в табл. 8.

Параметры для проведения проспективной
и ретроспективной оценки санитарных условий содержания животных

Проспективная оценка проекта	Ретроспективная оценка проекта
<p>Опишите процедуру причинения вреда или фактор вреда. <i>Как санитарные условия и условия содержания влияют на фенотипические характеристики?</i></p> <hr/> <p>Укажите модулирующие факторы вреда, влияющие на тяжесть фенотипа.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Существуют ли санитарные барьеры или условия содержания, которые сводят к минимуму страдания животных?</i> 	<p>Перечислите модулирующие факторы вреда в соответствии с фактическими наблюдениями, которые не были учтены при оценке проспективного проекта.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Появились ли неожиданные проявления фенотипа, которые возникли вследствие санитарного состояния помещений и условий содержания животных?</i>

Гигиенические условия и условия содержания в хозяйстве

Санитарные условия и условия содержания животных имеют большое значение в отношении проявления фенотипов. Рассмотрение санитарного состояния помещений содержания животных и в случае их перемещения, сравнение исходных условий с местом назначения помогает провести проспективную оценку тяжести ожидаемого фенотипа.

Условия содержания, включающие стандарты содержания и ухода, такие как система содержания, подстилочный материал, элементы для обогащения среды, а также знания и навыки сотрудников по уходу за животными, способствуют их благополучию.

Таким образом, меры по улучшению условий содержания животных являются важным фактором для улучшения вредных фенотипов и должны быть тщательно изучены.

В случае неопределенного фенотипа идентификация возможных опасностей в пределах организации является единственной подходящей мерой для оценки факторов вреда, которые могут способствовать возникновению вредного фенотипа.

Анализ санитарного состояния помещений включает отчет о 18-месячном мониторинге состояния здоровья в соответствии с рекомендациями FELASA (Mähler M., Berard M., Feinstein R.M. и соавт., 2014). Параметры для проведения проспективной и ретроспективной оценки санитарных условий содержания животных представлены в табл. 9.

Схема разведения и излишки животных

Поскольку появление фенотипа связано с генотипом, схемы разведения должны служить инструментами для сокращения или даже полного исключения жи-

Таблица 10

Параметры для проведения проспективной
и ретроспективной оценки проекта схемы разведения животных

Проспективная оценка проекта	Ретроспективная оценка проекта
<p>Опишите процедуру причинения вреда или фактор вреда. <i>Какую схему разведения планируется использовать?</i></p>	<p>Перечислите модулирующие факторы вреда в соответствии с фактическими наблюдениями, которые не были учтены при оценке проспективного проекта.</p>
<p>Укажите модулирующие факторы вреда, влияющие на тяжесть фенотипа.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Направлена ли схема разведения на получение животных с менее тяжелыми фенотипами?</i> • <i>Необходима ли схема разведения, которая позволяет получать животных с нежелательными генотипами?</i> • <i>Как будут использоваться излишки животных?</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Можно ли оптимизировать схему разведения?</i>

вотных с вредными/побочными фенотипами. Стратегии разведения должны соответствовать плану исследования и количеству животных, указанных в нем. Например, гетерозиготное разведение может уменьшить появление нежелательных фенотипов, присутствующих у гомозиготных животных, а при гетерозиготном размножении с животными дикого типа можно даже полностью избежать побочных фенотипов.

Такие стратегии воспроизводства применимы только в том случае, если известен генотип. В других случаях, например, при синдромах, когда идентификация генотипа является частью исследования, и влияние генетических модификаций на фенотип неясно, целенаправленные изменения методов разведения могут не помочь свести к минимуму количество животных с побочным фенотипом.

Однако из-за особенностей разведения невозможно рассчитать точное количество животных, необходимое согласно плану исследования. В дополнение к имеющейся литературе по генетике и планированию разведения несколько экспертных рабочих групп разработали рекомендации, которые предоставляют достаточные возможности для сокращения численности животных. Параметры для проведения проспективной и ретроспективной оценки проекта схемы разведения животных представлены в табл. 10.

Генотипирование и забор образцов тканей

Работа с генетически измененными животными требует надежной идентификации генотипа. Существуют различные методы идентификации животных, которые могут быть постоянными или непостоянными, инвазивными или неинвазивными и в то же время генерировать или не генерировать забор тканей для генотипирования (Dahlborn K., Bugnon P., Nevalainen T. и соавт., 2013).

Параметры для проведения проспективной
и ретроспективной оценки метода генотипирования.

Проспективная оценка проекта	Ретроспективная оценка проекта
<p>Опишите процедуру причинения вреда или фактор вреда. <i>Какой метод генотипирования будет использоваться и каково фактическое или долговременное воздействие на животное?</i></p> <hr/> <p>Укажите модулирующие факторы вреда, влияющие на тяжесть фенотипа.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Если используется инвазивный метод, сочетает ли этот метод идентификацию и забор образцов тканей? 	<p>Перечислите модулирующие факторы вреда в соответствии с фактическими наблюдениями, которые не были учтены при оценке проспективного проекта.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Дал ли метод генотипирования получить надежные результаты? • Требовались ли повторные образцы тканей?

Касательно аспектов благополучия животных всегда рекомендуется выбирать наименее инвазивный метод взятия образцов тканей, который позволяет успешно идентифицировать животное. Стоит отметить, что существуют ограничивающие факторы, касающиеся применимости некоторых методов в зависимости от возраста животных. Например, удаление дистальной фаланги может идентифицировать новорожденных животных с одновременным отбором образцов тканей на той возрастной стадии, когда другие методы еще неприменимы (Dahlborn K., Bugnon P., Nevalainen T. и соавт., 2013).

В любом случае следует избегать повторения отбора проб и проводить его только неинвазивными методами.

Надежность результатов тестирования также играет важную роль. При использовании неинвазивных методов, таких как сбор шерсти для выделения ДНК из волосяных фолликулов, следует учитывать риск перекрестного загрязнения.

Рекомендации FELASA по совершенствованию методов генотипирования генетически модифицированных грызунов помогут в выборе подходящего метода с учетом условий для благополучия животных (Bonaparte D., Cinelli P., Douni E. и соавт., 2013). Параметры для проведения проспективной и ретроспективной оценки метода генотипирования представлены в табл. 11.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shakweer W.M.E, Krivoruchko A.Y., Dessouki S.M. et al. A review of transgenic animal techniques and their applications // Journal, genetic engineering & biotechnology. 2023. Vol. 21 (55). P. 1–14. DOI: [10.1186/s43141-023-00502-z](https://doi.org/10.1186/s43141-023-00502-z).
2. Palmiter R.D., Norstedt G., Gelinis R.E. et al. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice // Science (New York, N. Y.). 1983. Vol. 222 (4625). P. 809–814. DOI: [10.1126/science.6356363](https://doi.org/10.1126/science.6356363).

3. Lin T.P. Microinjection of mouse eggs // *Science* (New York, N. Y.). 1966. Vol. 151 (3708). P. 333–337. DOI: [10.1126/science.151.3708.333](https://doi.org/10.1126/science.151.3708.333).
4. Chrenek P., Makarevich A.V., Pivko J. et al. Transgenic farm animal production and application // *Slovak Journal of Animal Science*. 2010. Vol. 43. P. 45–49.
5. Riordan S.M., Heruth D.P., Zhang, L. Q. et al. Application of CRISPR/Cas9 for biomedical discoveries // *Cell & bioscience*. 2015. Vol. 5 (1). P. 1–11. DOI: [10.1186/s13578-015-0027-9](https://doi.org/10.1186/s13578-015-0027-9).
6. Gordon I. Controlled reproduction in cattle and buffaloes. 1997.
7. Onishi M., Kinoshita S., Morikawa Y. et al. Applications of retrovirus-mediated expression cloning // *Exp. Hematol*. 1996. Vol. 24. P. 324–329.
8. Sumiyama K., Kawakami K., Yagita K.A. Simple and highly efficient transgenesis method in mice with the Tol2 transposon system and cytoplasmic microinjection // *Genomics*. 2010. Vol. 95 (5). P. 306–311. DOI: [10.1016/j.ygeno.2010.02.006](https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.02.006).
9. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells // *Nature*. 1997. Vol. 385. P. 810–813. DOI: [10.1038/385810a0](https://doi.org/10.1038/385810a0).
10. Takashima S., Shinohara T. Culture and transplantation of spermatogonial stem cells // *Stem Cell Research*. 2018. Vol. 29. P. 46–55. DOI: [10.1016/j.scr.2018.03.006](https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.03.006).
11. Chaible L.M., Corat M.A., Abdelhay E. et al. Genetically modified animals for use in research and biotechnology // *Genet Mol Res*. 2010. Vol. 9 (3). P. 1469–1482. DOI: [10.4238/vol9-3gmr867](https://doi.org/10.4238/vol9-3gmr867).
12. Hrabě de Angelis M., Nicholson G., Selloum M., et al. Analysis of mammalian gene function through broad-based phenotypic screens across a consortium of mouse clinics // *Nature genetics*. 2015. Vol. 47 (9). P. 969–978. DOI: [10.1038/ng.3360](https://doi.org/10.1038/ng.3360).
13. Zintzsch A., Noe E., Grimm H. Navigating uncertainties: How to assess welfare and harm in genetically altered animals responsibly — A practical guideline // *Animals*. 2020. Vol. 10 (5). P. 857. DOI: [10.3390/ani10050857](https://doi.org/10.3390/ani10050857).
14. Meehan T.F., Conte N., West D.B. et al. Disease model discovery from 3328 gene knockouts by The International Mouse Phenotyping Consortium // *Nature genetics*. 2017. Vol. 49 (8). P. 1231–1238. DOI: [10.1038/ng.3901](https://doi.org/10.1038/ng.3901).
15. Zintzsch A. Herausforderungen bei der Belastungsbeurteilung genetisch veränderter Tiere: Wie können Phänotypisierungsdaten und der Blick in die EU helfen? // *Leipziger Blaue Hefte*. 2013. Vol. 436.
16. Shen B., Zhang W., Zhang J. et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. // *Nature methods*. 2014. Vol. 11. P. 399–402. DOI: [10.1038/nmeth.2857](https://doi.org/10.1038/nmeth.2857).
17. Seruggia D., Fernández A., Cantero M. et al. Functional validation of mouse tyrosinase non-coding regulatory DNA elements by CRISPR-Cas9-mediated mutagenesis // *Nucleic acids research*. 2015. Vol. 43. P. 4855–4867. DOI: [10.1093/nar/gkv375](https://doi.org/10.1093/nar/gkv375).
18. Zintzsch A., Noe E., Reißmann M. et al. Guidelines on severity assessment and classification of genetically altered mouse and rat lines // *Laboratory animals*. 2017. Vol. 51. P. 573–582. DOI: [10.1177/0023677217718863](https://doi.org/10.1177/0023677217718863).
19. Mähler M., Berard M., Feinstein R.M. et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units // *Laboratory animals*. 2014. Vol. 48. P. 178–192. DOI: [10.1177/0023677213516312](https://doi.org/10.1177/0023677213516312).

20. Dahlborn K., Bugnon P., Nevalainen T. et al. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification // Laboratory animals. 2013. Vol. 47. P. 2–11. DOI: [10.1177/002367712473290](https://doi.org/10.1177/002367712473290).
21. Bonaparte D., Cinelli P., Douni E. et al. FELASA guidelines for the refinement of methods for genotyping genetically-modified rodents: A report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group // Laboratory animals. 2013. Vol. 47. P. 134–145. DOI: [10.1177/0023677212473918](https://doi.org/10.1177/0023677212473918).

Роль референтных интервалов в доклинических исследованиях

<https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-2-8-s7>

М.В. Мирошников¹, Е.В. Вербицкая³, И.А. Зелинская², А.Д. Круглова¹, Е.В. Мазукина¹,
А.И. Савватейкина¹, О.Н. Хохлова⁴

¹ АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,

² ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России,

³ ФБГОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. И.П. Павлова» Минздрава России,

⁴ ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Введение

Референтный интервал (эталонные значения, контрольный диапазон, РИ) — статистический показатель, который на протяжении длительного времени используется в медицинской и научной практике как универсальный инструмент для детектирования перехода из одного физиологического состояния, чаще всего называемого «норма», в другое — «патология», или наоборот. Определяется как диапазон, соответствующий центральным 95% значений эталонной совокупности, включая два граничных предела: верхний и нижний референтные пределы. Данные интервалы в совокупности отражают четко определенный статус физиологических, поведенческих и других состояний исследуемого объекта в конкретной популяции. В широком смысле эталонные значения — это границы для принятия решения: есть ли процесс дестабилизации организма или же все в порядке (Henny J., 2009).

В ходе проведения сессии поднимались вопросы особенностей определения контрольных интервалов в доклинических исследованиях, которые обусловлены видовыми, географическими и внутрилабораторными особенностями, преаналитическими, аналитическими и постаналитическими факторами, а также статистическими методами обсчета. Важно отметить, что интерпретация и описание результатов для любого доклинического исследования по оценке безопасности должны использовать стандартный подход, одним из критериев которого является сравнение со здоровыми животными — контрольной группой или диапазоном, характеризующим вариабельность нормы — референтный интервал.

В настоящее время существует несколько мнений относительно РИ в доклинических исследованиях. Некоторые исследователи предпочитают устанавливать данные интервалы для всех интересующих показателей — лабораторных, анатомо-физиологических и иных, периодически пересматривая и модифицируя их. Другие предпочитают описывать полученные значения, используя процентное изменение от базового уровня или контрольной группы. Оба метода имеют как преимущества, так и недостатки (Amaratunga D., 1997; Friedrichs K.R. и соавт., 2012).

Чаще всего контрольные интервалы устанавливаются отдельными локальными научными центрами либо являются результатом многоцентровых исследований. Как в первом, так и во втором случае оба варианта имеют свои особенности, которые в основном связаны с возможностью применения данных значений в большем или меньшем количестве научных центров, а также с минимизацией ошибок. В противовес эталонным интервалам значения, полученные только от контрольной группы, не имеют диапазона и применимы только для одного исследования. Также необходимо отметить, что для любого нового теста или значительных изменений в его методологии — смене популяции или изменении реагентов — необходим пересмотр уже установленных диапазонов (Ozarda Y. и соавт., 2018).

Следующим моментом является выбор животных. Для отбора в исследование эталонного интервала в доклинических исследованиях требуются подробные критерии включения/исключения. К тому же немаловажным фактором является обширный поиск литературы и обзор других референтных интервалов для сопоставления. Может потребоваться разделение на подгруппы. Чаще всего разделение играет положительную роль в установлении РИ. Данный шаг позволяет снизить процент неожиданных ошибок и вариабельности. В отличие от эталонных диапазонов значения контрольной группы не требуют такого подробного подхода к их применению (Huang W. и соавт., 2020).

Также стоит отметить, что РИ в доклинических исследованиях в отличие от обычных контрольных значений выполняют несколько функций: мониторинг здоровья, оценка безопасности исследуемых соединений и видовое сравнение норм различных показателей животных. Показатели контрольной группы обычно используют для детекции наличия или отсутствия изменений в момент проведения эксперимента, а также степени этого изменения (Henny J., 2009).

Референтные диапазоны могут меняться в течение жизни, в самом простом варианте у любого живого организма можно выделить три периода, для которых можно создать свои РИ: развитие организма или ювенильный период, период половой зрелости и период старения, характеризующийся медленным снижением метаболической и физической активности (Montoya Navarrete A.L. и соавт., 2021). Значения, полученные от контрольной группы, могут использоваться только в данный момент времени.

Таким образом, референтные интервалы, в отличие от обычных значений контрольных групп лабораторных животных, обладают несколькими свойствами. Первое — это длительность применения. Значения группы контроля можно использовать только один раз, РИ обычно устанавливаются на срок 3–5 лет, в случае отсутствия изменений в методологии их можно пролонгировать. Еще одно свойство, вытекающее из предыдущего, — это динамика изменения показателя. Референтные

интервалы позволяют оценить изменения интересующих показателей с течением времени, а также указать тенденцию к увеличению или снижению значения, даже если оно находится внутри диапазона. Следующее свойство — широта охвата. Эталонные интервалы характеризуют 95% здоровых особей в популяции, контрольные значения — ограниченную выборку из 3–15 здоровых животных, включенных в контрольную группу. Наконец, значения контрольных групп эффективны единожды и показывают только степень изменения исследуемого показателя относительно нормы в момент эксперимента.

Конечно стоит оговориться, что референтные интервалы и контрольные значения не всегда уместно противопоставлять друг другу. Порой эти два рассматриваемых показателя взаимодополняют информацию о состоянии здоровья лабораторных животных.

Референтные интервалы в доклинических исследованиях и факторы, на них влияющие

Правила и руководства для установления референтных интервалов

В основном исследователи опираются на документы, используемые для проведения клинических и доклинических исследований, ветеринарные и научные статьи, посвященные этой теме. Так, с 80-х годов XX века Международная федерация клинической химии (IFCC) активно разрабатывает рекомендации для уточнения истинного значения термина «референтные интервалы», для выбора подходящей эталонной популяции и статистического анализа данных. В данной организации существует комитет по контрольным интервалам и пределам принятия решений (C-RIDL), занимающийся пересмотром текущих концепций установления контрольных интервалов и пределов принятия решений, а также предоставлением РИ и пределов принятия решений, соответствующих требованиям международных директив, таких как Европейская директива IVD 98/79, и соответствующих стандартов ISO (Dimauro C. и соавт., 2008).

Другой важной международной организацией по стандартизации для лабораторий является Институт клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI). При разработке стандартов CLSI использует процесс выработки консенсуса среди многочисленных заинтересованных сторон. CLSI занимается разработкой моделей системы управления качеством, которые согласуются с лабораторными стандартами ISO. Руководство EP28-A3C (C28-A3) определяет, устанавливает и проверяет контрольные интервалы в клинической лаборатории. Этот документ содержит рекомендации по определению референтных значений и РИ для количественных клинических лабораторных тестов (Friedrichs K.R. и соавт., 2012).

Существуют также и другие организации по стандартизации, а также примеры лабораторных стандартов, но опубликованные Институтом клинических и лабораторных стандартов (CLSI) и IFCC документы и рекомендации являются наиболее широко используемыми источниками справочной информации в этой области.

Если говорить о нашей стране, то можно выделить несколько нормативных документов: ГОСТ Р 53022.3–2008, который устанавливает единые правила оценки клинической информативности лабораторных исследований, выполняемых в клинико-диагностических лабораториях медицинских организаций в целях оценки состояния здоровья, клинической диагностики и слежения за эффективностью лечения пациентов. ГОСТ Р ИСО 15189–2015 — стандарт, который устанавливает специальные требования к качеству и компетентности медицинских лабораторий.

Типы референтных интервалов

В широком смысле референтные интервалы — это статистический инструмент, вариативность применения которого ничем не ограничена. В доклинических исследованиях можно выделить несколько наиболее частых вариантов эталонных диапазонов, к ним относятся анатомические, физиологические, лабораторные (биохимические, гематологические, коагулометрические и др.), поведенческие и возрастные.

Анатомические РИ характеризуют особенности размера, массы, формы и расположения интересующих органов, а также частей тела. Другими словами, данные диапазоны описывают морфометрические (зоометрические) свойства лабораторных животных (Рощина Е.А., 2022). В ходе проведения сессии об этом докладывала врач-патоморфолог АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» Анастасия Игоревна Савватейкина в своем выступлении «[Массовые коэффициенты органов лабораторных животных. Для чего мы взвешиваем органы?](#)» (рис. 1–3).

К физиологическим контрольным интервалам относятся такие жизненно важные показатели, как частота сердечных сокращений (ЧСС), величина артериального

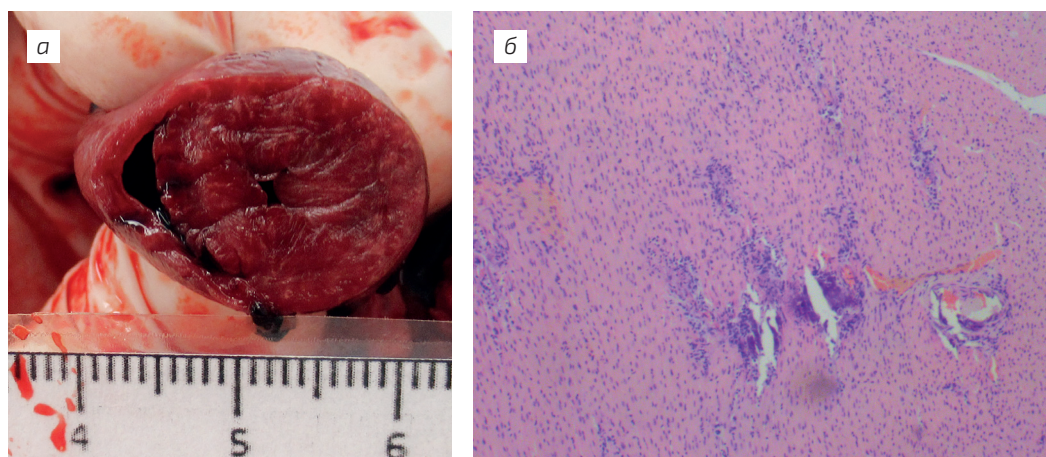


Рис. 1. Изменения ткани сердечной мышцы хорька, встречающиеся в доклинических исследованиях: а — эвисцерированное сердце самки хорька на разрезе: утолщение стенки, в миокарде множественные мелкие беловатые пятнистые очаги различных форм; б — гистологический срез сердца самки хорька: множественные очаги кардиомиопатии и минерализации

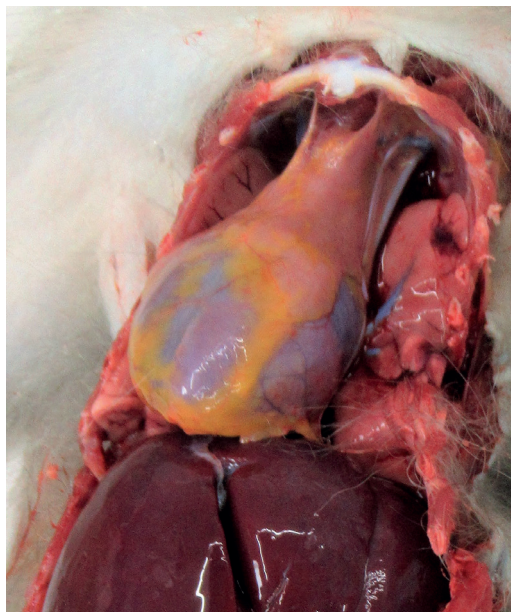


Рис. 2. Возрастная атрофия тимуса на примере самцов яванской макаки

давления, данные электрокардиограммы, частота и глубина дыхания. Также к данному типу относят показатели пульсовой оксиметрии и спирометрии, а также результаты, характеризующие экскреторные функции (количество актов дефекации и мочеиспускания) (Oestereicher M.A., 2023). В ходе сессии данный вид РИ рассматривался заместителем руководителя отдела экспериментальной фармакологии и токсикологии АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» Елизаветой Владимировной Мазукиной в докладе «Референтные интервалы электрокардиограммы у хищных лабораторных животных» (табл. 1, 2).

Лабораторные референтные интервалы являются наиболее часто используемыми диапазонами в доклинических исследованиях. Чаще всего под лабораторными РИ подразумевают биохимические, устанавливающие диапазоны

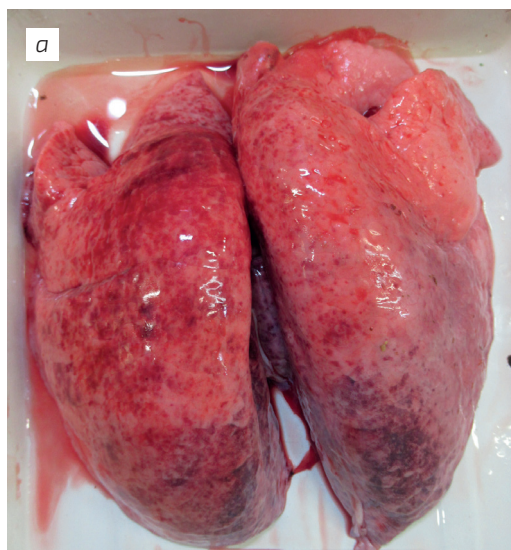


Рис. 3. Изменения легких карликовой свиньи, встречающиеся в доклинических исследованиях (эвисцерированные легкие самки карликовой свиньи): а — увеличение, воздушность, с множественными диффузными точечными и пятнистыми кровоизлияниями; б — патологические изменения отсутствуют

Таблица 1

Референтные интервалы показателей ЭКГ у хорьков

Показатель	Референтный интервал		
	Без разделения по полу		
	Без наркоза, n=65	Золетил, n=89	Ксилазин, n=141
P, мВ	0,04–0,240	0,04–0,303	0,01–0,155
Q, мВ	–0,05–0,000	0,00–0,000	–0,01–0,000
R, мВ	0,91–2,652	1,12–2,668	0,95–3,206
S, мВ	–0,24–0,000	–0,23–0,000	–0,36–0,000
T, мВ	0,06–0,584	0,03–0,500	0,12–0,810

	Самцы			Самки		
	Без наркоза, n=81	Золетил, n=45	Ксилазин, n=69	Без наркоза, n=33	Золетил, n=44	Ксилазин, n=72
RR, мс	195–351	188–276	306–694	154–343	179–250	263–743
RR (min), мс	179–311	174–267	249–475	145–316	124–238	238–540
RR (max), мс	220–403	192–288	319–1052	162–401	183–305	293–1169
Δ RR (min) и RR (max), мс	3–162	5–52	20–652	5–155	3–134	24–720
ЧСС в минуту	171–308	218–319	86–196	175–391	240–335	81–228
P, мс	24–48	24–43	24–49	19–46	21–48	26–45
PQ, мс	54–85	41–65	54–80	33–75	39–68	49–76
QRS, мс	40–55	43–55	40–72	40–55	34–69	43–66
QT, мс	88–144	101–146	129–173	79–149	88–136	124–164
QTc (B)	185–268	214–292	192–259	183–268	197–295	185–251
QTc (F)	144–213	169–230	175–221	145–216	152–224	165–207
QTc (FM)	207–250	222–260	209–255	207–252	212–256	203–246
QTc (VdW)	155–202	171–210	182–215	152–205	158–203	174–203

Таблица 2
Референтные интервалы
показателей ЭКГ у собак

Показатель	Референтный интервал
ЧСС в минуту	31–55
RR, мс	1091–1935
RR (min), мс	393–683
RR (max), мс	1920–3678
P, мс	51–78
PQ, мс	95–170
QRS, мс	53–75
QT, мс	220–276
P, мВ	0,07–0,22
Q, мВ	–0,20–0,00
R, мВ	0,73–1,95
S, мВ	–0,54...–0,08
T, мВ	0,16–0,67
QTc (B)	173–236
QTc (F)	185–244
QTc (FM)	114–227

активности ферментов, концентрации витаминов, гормонов, а также других маркеров, которые вырабатываются в организме и регулируют его развитие и функционирование. Гематологические референтные интервалы — тип диапазонов, описывающий виды клеток крови, их количество и форму. Коагулологические РИ — показатели, характеризующие систему гемостаза. Также к данному типу можно отнести диапазоны показателей общего анализа мочи, спермограммы, влажалищного мазка, бронхоальвеолярного лаважа, кислотно-основного состояния и газов крови. Иными словами, это интервалы, показывающие качественные или количественные значения интересующих показателей в биологическом образце (Мирошников М.В. и соавт., 2022). Данный вид референтных интервалов был рассмотрен в докладе старшего лаборанта-исследователя отдела лабораторной диагностики АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» Анны Дмитриевны Кругловой «Сопоставление диапазонов и норм основных биологических показателей лабораторных животных и человека» (рис. 4).

Поведенческие РИ — показатели, чаще всего характеризующие количество двигательных актов определенного вида, регистрируемых в тестах, направленных на изучение поведенческих или когнитивных свойств лабораторных животных. Стоит отметить, что создание такого типа интервалов является достаточно сложным, и чаще всего исследователи ограничиваются контрольной группой. Это связано с несколькими факторами. Во-первых, необходимо отдельное помещение со звукоизоляцией. Во-вторых, перед проведением непосредственно исследования необходимо осуществлять подготовительный этап. Иными словами, лабораторные животные должны подвергаться хэндлингу, то есть приручению к рукам исследователя, непосредственно работающего с этими животными. Животное должно быть адаптировано в помещении, где будет проходить тестирование (за 30–40 мин до проведения теста). Эти действия необходимы для снижения лишней эмоциональности лабораторных животных, которая может негативным образом повлиять на регистрируемые показатели (Whitham J.C. и соавт., 2023).

Еще одним типом РИ являются возрастные диапазоны. Этот тип значений можно рассмотреть как совокупность всех предыдущих диапазонов, но характерных

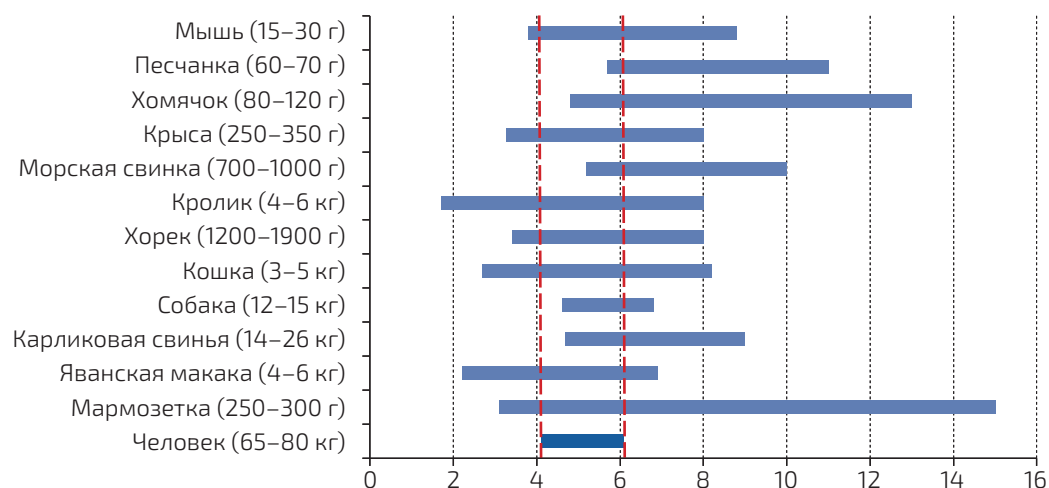


Рис. 4. Сравнение референтных интервалов показателя глюкозы (в ммоль/л) лабораторных животных и человека в сыворотке крови

для конкретного временного промежутка или возраста лабораторного животного. Развитие любого живого организма сопровождается изменением его анатомо-физиологических, биохимических и иных показателей. Так, например, для молодых животных, в сравнении с половозрелыми, характерно значительное увеличение активности щелочной фосфатазы, особенно изменчив данный показатель в первые месяцы — первый год жизни. Именно поэтому при установлении РИ важным фактором является указание возраста животного. Соответственно, и применимы эти РИ только на животных аналогичного возраста. Как было сказано ранее, у молодого животного значения одного и того же показателя изменяются очень быстро, поэтому правильным решением для установления РИ у таких животных будет создание интересующих диапазонов с интервалом 2–4 нед до момента половой зрелости. Возрастные РИ являются полезным инструментом оценки состояния здоровья юных, половозрелых и старых лабораторных животных (Yeom S.C. и соавт., 2012).

Важный и интересный подход к интерпретации референтных интервалов — создание исторических контрольных данных (ИКД), о которых в ходе сессии рассказала старший научный сотрудник, руководитель токсикологических исследований филиала ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН Оксана Николаевна Хохлова в своем докладе **«Важность исторических контрольных данных в интерпретации токсикологической значимости эффектов тестируемого объекта в исследовании безопасности на животных»**. Обычно ИКД используют при интерпретации токсикологической значимости эффектов различных тестируемых объектов в исследованиях безопасности на животных, но также их можно применять и в контексте РИ. К тому же необходимость использования ИКД прописана в Приложении к Рекомендации коллегии Евразийской экономической комиссии от 21 мая 2020 г., № 10 «В отношении грызунов и негрызунов не-

обходимо располагать ретроспективными данными для изучения морфологических, биохимических, физиологических показателей». В контексте анализа РИ можно обозначить определенные критерии ИКД. Так, эти данные должны соответствовать используемой тест-системе и быть получены из одной и той же лаборатории. Иными словами, ИКД создаются для внутреннего использования в каждом научном центре. Они охватывают определенный промежуток времени, чаще всего 5 лет, тем самым позволяя проследить изменения РИ лабораторных животных с течением времени. Выявлять в случае необходимости изменения показателей и, возможно, давать ответы, почему эти изменения возникли, и что являлось предиктором к этому. Также необходимо отметить, что ИКД других научных центров могут применяться только дополнительно в целях ознакомления или сравнения со своими ИКД. В первую очередь это связано с преаналитическими, аналитическими и постаналитическими манипуляциями. Необходимо учесть вид, линию лабораторных животных, поставщика, место проведения всех манипуляций, условия содержания животных, включая тип и марку корма, примерный возраст и массу тела животных, способ эвтаназии (если необходимо провести), человеческий фактор и квалификацию специалистов (Соја Т. и соавт., 2022).

На самом деле нет никаких жестких ограничений по поводу создания РИ. Их также можно использовать и в исследованиях *in vivo*, *ex vivo* или более узких направлениях. Как уже говорилось ранее, это универсальная система, работающая с любым объемом данных, главное, чтобы они соответствовали научным целям и никоим образом не противоречили здравому смыслу, правилу трех R (замена — replacement, сокращение — reduction и усовершенствование — refinement) и нормам морали.

Внешние и внутренние факторы, влияющие на установление референтных интервалов

В рамках сессии были определены факторы, косвенно влияющие на результат установления РИ, — это преаналитические, аналитические и постаналитические манипуляции.

Преаналитические факторы включают в себя весь перечень манипуляций и состояний лабораторных животных, который соответствует промежутку времени до проведения анализа, теста или исследования. Сюда относятся условия содержания животных: влажность, освещение, подстил, питание, габариты клетки, индивидуальное или групповое размещение, источник получения животных, индивидуальное состояние организма и т.д. Все перечисленные показатели могут в той или иной степени повлиять на дальнейшее установление РИ. Так, питание и депривация по воде могут изменить морфометрические и лабораторные показатели, индивидуальное размещение и освещение отразятся на агрессивности животных, неподходящий подстил в свою очередь может стать причиной аллергических и воспалительных процессов. К другим преаналитическим факторам относится перечень манипуляций, непосредственно предшествующих проведению анализа, — метод и место забора биологического образца, время забора (утро/день/вечер/ночь), объем, а также расходные материалы (шприцы, пробирки, катетеры и прочее), используемые при осуществлении манипуляции. Немаловажным моментом преана-

литического этапа является время доставки биологического материала в лабораторию.

К аналитическим факторам, влияющим на установление диапазонов, относятся различные анализаторы и методы детекции. При установлении анатомо-физиологических диапазонов большую роль играют валидированные и поверенные приборы, осуществляющие регистрацию значений: весы, линейки, электрокардиографы, оксиметры, спирометры, термометры, сфигмоманометры, часы и др. Для биохимических и подобных диапазонов это будут различные лабораторные приборы — биохимические, коагулометрические и гематологические анализаторы, микроскопы, а также используемые реагенты и наборы. Особенности поведенческих диапазонов будут зависеть от выбранного теста («открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт») и вариантов регистрации значений, о которых было сказано ранее (использование специализированного оборудования для детекции движений лабораторных животных или простое наблюдение исследователем за его действиями). Стоит отметить, что даже в идеально схожих исследованиях с идентично подобранными условиями проведения эксперимента, в случае выбора разных реагентов, разных моделей приборов результаты будут отличаться друг от друга. Именно поэтому для осуществления постаналитического этапа важнейшим фактором успешного установления достоверных РИ является создание одинаковых или однородных условий проведения эксперимента.

Постаналитический этап включает оценку полученных значений, способы статистической обработки и установления референтных интервалов. Особенностью данного этапа является выбор верного и правильного метода (Henny J., 2009; Friedrichs K.R. и соавт., 2012). Стоит отметить, что вопрос подходящего статистического расчета является не менее важным, чем преаналитический и аналитический этапы, это отметила в ходе своего доклада научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России Ирина Александровна Зелинская [«Принципы анализа и обобщения результатов экспериментальных исследований. Подводные камни»](#).

Методы определения референтных интервалов

Если говорить о необходимом количестве эталонных образцов для создания референтных интервалов, можно выделить несколько моментов. Как было сказано ранее, существует прямой метод, при котором сбор и формирование значений происходят от специально отобранных животных. Непрямой метод подразумевает использование массивов данных, накопленных за определенный промежуток времени. В случае наличия животных в необходимом количестве в научном центре и отсутствия противоречий правилам трех R размер выборки в большинстве научных статей составляет 40–120 значений. Данного количества достаточно для статистических методов обсчета и установления надежных результатов. При отсутствии рекомендуемого количества животных или накопленной базы данных по интересующему показателю, ввиду различных обстоятельств, желательно в финальный обсчет брать не менее 10 животных. Оптимально в данной ситуации будет 20–40 особей.

Референтные интервалы определяются как центральные 95% от исследуемой популяции, которые находятся между перцентилями 2,5 и 97,5. Определение референтного интервала включает как параметрические, так и непараметрические методы расчета, обнаружение выбросов, разбиение и доверительные интервалы. Результаты, полученные от здоровых животных, в 5% случаев будут выходить за пределы заявленного интервала и будут помечены как «ненормальные». В параметрическом методе расчета предполагается, что наблюдаемые значения или некоторое математическое преобразование этих значений следуют гауссовскому или «нормальному» распределению вероятностей. Эталонные значения многих аналитов не соответствуют распределению Гаусса, поэтому параметрический метод можно применять после преобразования данных. Нужно выбрать наиболее подходящий метод преобразования (например, логарифмический, степенной или какую-либо другую функцию), а затем применять тестирование, чтобы установить, соответствуют ли преобразованные эталонные значения распределению Гаусса (Amaratunga D., 1997; Friedrichs K. R и соавт., 2012; Henny J., 2009).

Одноцентровые и многоцентровые исследования — 2 подхода к установлению референтных интервалов

Как было сказано ранее, референтные интервалы устанавливаются либо отдельными локальными научными центрами, либо в результате многоцентровых исследований. Как в первом, так и во втором случае оба варианта имеют не только преимущества, но и недостатки. В первом варианте создание и установление РИ удовлетворяют потребностям конкретного доклинического центра, в котором они были созданы. Другими словами, данные диапазоны, полученные от определенной популяции животных, в дальнейшем будут применяться для детекции состояния животных из данной популяции. Этот подход оптимально учитывает условия содержания животных: они должны быть максимально схожими, а также преаналитический, аналитический и постаналитический этапы. К очевидным минусам данного подхода можно отнести локальность применения данных РИ. С большой долей вероятности референтные диапазоны любого показателя двух соседних доклинических центров будут иметь свои различия. Конечно эти различия не должны быть кардинально различными, но они все-таки будут присутствовать (Мирошников М.В. и соавт., 2022). Для создания РИ, которые охватывали бы большое количество научных центров и активно использовались в повседневной рутинной практике, существует многоцентровой подход (Friedrichs K.R. и соавт., 2012). Суть данного метода: несколько доклинических центров создают базу данных по интересующему показателю и рассчитывают определенным методом искомый диапазон нормы. При всей своей видимой простоте такой подход требует строжайшего соблюдения одних и тех же условий содержания животных, постановки эксперимента и методов обработки полученных данных. Без этих условий добиться оптимального и рабочего диапазона не представляется возможным. Отбор достаточного количества референтных испытуемых является сложной, трудоемкой и дорогостоящей задачей. Хотя некоторые лаборатории проводят местные исследования для собственного использования,

также осуществляются многоцентровые исследования со значительным числом субъектов для установления РИ. Поскольку общая стандартизация и прослеживаемость имеют решающее значение при получении эталонных значений, каждый этап преаналитического, аналитического и статистического применения следует четко определенному протоколу.

Заведующая отделом биомедицинской статистики ФБГОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Минздрава России Елена Владимировна Вербицкая представила доклад «**Метаанализ как эффективный инструмент планирования доклинических исследований**». В широком понимании это систематический обзор, включающий статистические методы объединения и суммирования результатов нескольких отдельных исследований, который оценивает средний или общий эффект. Метаанализ помогает увеличить мощность и точность исследований, изучить их различия, несогласованности, а также генерировать новые гипотезы. Действительно, исследования с низкой мощностью дают больше как ложноотрицательных, так и ложноположительных результатов, чем исследования с высокой мощностью. Низкая мощность также снижает вероятность того, что статистически значимый результат отражает истинные значения. Метаанализ в контексте РИ предоставляет эмпирические данные для улучшения дизайна, методов и анализа исследований, получения более объективных результатов и повышения ценности отдельных исследований в их совокупности (Verbitskaya E.V., 2015).

Частые проблемы, с которыми сталкиваются исследователи при установлении референтных интервалов

Наиболее частой проблемой работы с референтными интервалами в повседневной доклинической практике являются некорректная интерпретация и отсутствие комплексного анализа полученных данных (Morton L.D. и соавт., 2019). Об этом также было сказано участниками сессии. Почти в каждом исследовании есть свои нюансы и уникальные факторы, отличающие его от других, которые могут отразиться на полученных результатах, это могут быть новые реагенты, приборы, животные определенной популяции, условия моделируемой патологии и т.д. Именно поэтому важен последовательный, мультифакторный, но гибкий подход к анализу полученных данных. Чем больше исследователь знает деталей о проведенном доклиническом исследовании и чем больше у него фиксированных значений в определенный момент времени исследования (клиническое наблюдение, масса тела, данные биохимического и гематологического анализа, результаты микроскопического исследования), тем более отчетливо он может судить о наличии или отсутствии определенного эффекта. Анализируя полученные данные и сравнивая их с референтными интервалами, исследователь пытается ответить на большое количество важных вопросов. К числу наиболее стандартных можно отнести: «насколько велики различия в контексте сравнения с контрольными интервалами?», «прослеживается ли динамика изменений в зависимости от дозы исследуемого вещества, или присутствуют точечные изменения/индивидуальные особенности определенных животных, и их значения не связаны с влиянием исследуемой субстанции?», «можно ли провести определен-

ную параллель между анализом анатомо-физиологических данных, биохимических, гематологических и иных лабораторных значений, поведенческих актов?», «согласуются ли они между собой?», «присутствует ли статистическая разница между полученными результатами и референтными интервалами?», «насколько важно наличие статистической разницы в контексте определенного показателя?». От умения здраво отвечать на эти вопросы зависит один простой вывод — пропускать или нет исследуемое соединение дальше в клинические исследования.

Стоит отметить, что не всегда увеличение или снижение определенного показателя в сравнении с референтными интервалами свидетельствует о токсическом действии изучаемого вещества. Это может быть как индивидуальная особенность определенного животного, так и ошибки, связанные с преаналитическим этапом, или же что-то другое. Конечно, исследователь ни в коем случае не должен игнорировать данный факт, а обязан проанализировать такой случай в совокупности с другими показателями, критически подойти к анализу полученного значения. Поэтому еще одной важной особенностью референтных интервалов являются своевременное сигнализирование о наличии спорного значения и повторный (в случае необходимости) забор биообразца, если это возможно.

Также исследователю необходимо помнить о понятиях минимального и максимального эффектов. В ходе проведения сессии руководителем отдела лабораторной диагностики АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» Михаилом Владимировичем Мирошниковым, модератором сессии, было отмечено, что для каждого исследуемого показателя они имеют свои особенности и отличия. И не всегда 20–30% изменения одного показателя коррелируют с аналогичными изменениями другого. Например, изменения у животных на 20–30% уровня общего билирубина или общей креатинкиназы будут считаться в большей степени клинически незначимыми, чем изменения на 20–30% таких электролитов, как калий, натрий или хлор в сыворотке, — это явно значительные и важные различия.

Практическая и научная значимость референтных интервалов

Референтные интервалы в доклинических исследованиях являются гибким и подвижным инструментом, помогающим заниматься научно-исследовательской работой. Данные интервалы позволяют с разных сторон оценить состояние живого организма в динамике, в результате моделирования патологического процесса или тестирования нового исследуемого вещества. РИ являются незаменимым ориентиром, незамедлительно сигнализирующим о начале или развитии какого-либо процесса в живом организме (Amaratunga D., 1997; Friedrichs K.R. и соавт., 2018; Henny J., 2009).

Как было сказано в докладе Анны Дмитриевны Кругловой, одна из главных и основополагающих задач эталонных диапазонов — мониторинг здоровья животных. Интерпретация одного единственного показателя может привести к неправильным выводам, именно поэтому необходим мультифакторный подход к оценке полученных значений, при этом чем большим количеством информации располагает исследователь, тем правильной будет его вывод касательно здоровья лабораторного животного.

Сравнивая показатели экспериментальных животных только со значениями контрольной группы, можно прийти к ошибочным выводам, так как последние отражают более узкий и менее информативный набор значений в отличие от эталонных диапазонов. РИ обладают более широкой вариативностью и позволяют не только получить информацию о том, входят ли полученные данные в интервалы нормы, но и понять, к какой границе они ближе — верхней или нижней. Это в свою очередь может дать дополнительную информацию об изучаемой субстанции — есть ли тенденция к повышению/понижению определенных показателей и, соответственно, начало токсического действия на органы или системы органов.

Референтные диапазоны помогают ответить на вопрос: изменяются ли показатели с течением времени. Это может быть связано с сезонными колебаниями, эстральными циклами или ретроспективными исследованиями, в которых сравниваются диапазоны, полученные из одного и того же места, на одной и той же популяции, но в разные годы.

Еще одной важнейшей функцией референтных интервалов в доклинических исследованиях является ответ на вопрос: безопасно ли новое исследуемое соединение. Эталонные диапазоны активно используются в доклинических исследованиях, поскольку в большой степени дают представление о влиянии новых изучаемых веществ на живой организм. Совокупность различных РИ — биохимических, коагулологических, анатомо-физиологических позволяет с разных сторон оценить состояние лабораторных животных и охарактеризовать изучаемую субстанцию и ее влияние на организм. Анализируя разные типы референтных интервалов, можно предположить органотоксичность, динамику и силу развития патологического или восстановительного процесса, протекторного действия изучаемого вещества.

Также в докладе Анны Дмитриевны Кругловой была освещена еще одна более фундаментальная задача РИ. При изучении референтных интервалов в доклинических исследованиях различных лабораторных животных возникает возможность оценки динамики измерения определенных диапазонов в зависимости от анатомо-физиологических особенностей, вида или отряда. Эта информация при достаточно накопленном объеме может быть предиктором экстраполяции данных как с животного на животное, так и на человека. Последовательное изучение референтных интервалов на разных видах животных может обозначить, каким образом эталонные диапазоны сужаются или увеличиваются относительно друг друга. Например, было показано, что нормальные диапазоны таких биохимических показателей, как аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза (рис. 5, 6), мочевины, глюкозы, щелочная фосфатаза, сужаются в последовательном ряду (по отрядам): грызуны — зайцеобразные — хищные — свинообразные (подотряд) — приматы.

Более того, замечено, чем крупнее животное, тем ближе его нижний и верхний пределы нормы к нулевым значениям. Это согласуется с утверждением, что фундаментальные константы, интегрально отражающие интенсивность обменных процессов — основной обмен, потребление кислорода, частоту дыхания и пульса, — закономерно уменьшаются с увеличением массы тела млекопитающих (Красовский Г.Н. и соавт., 2009). В отношении таких биохимических показателей, как общий белок и альбумин, также замечена тенденция к снижению диапазона нормы в последовательном ряду: грызуны — зайцеобразные — хищные — свинообразные — приматы,

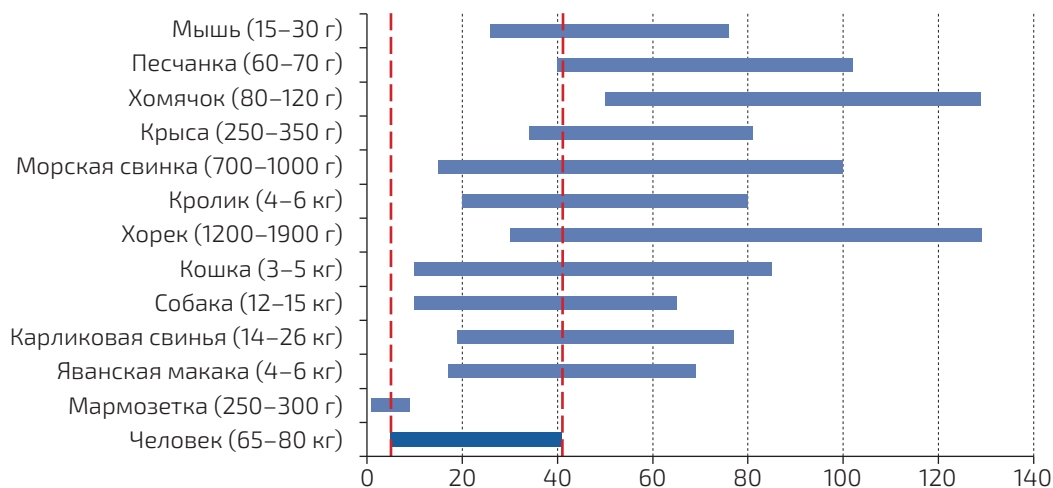


Рис. 5. Сопоставление референтных интервалов аланинаминотрансферазы (в Ед/л) сыворотки крови лабораторных животных и человека

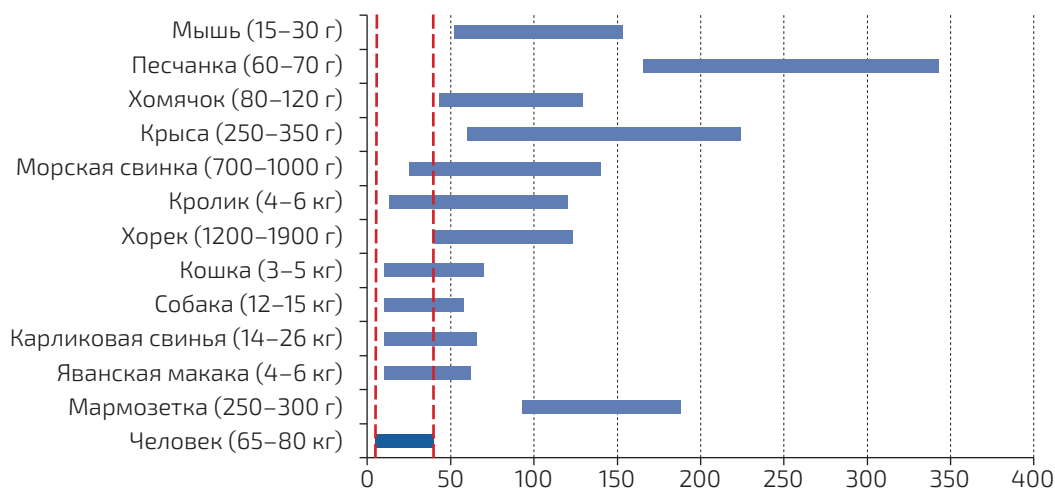


Рис. 6. Сопоставление референтных интервалов аспартатаминотрансферазы (в Ед/л) сыворотки крови лабораторных животных и человека

но в противоположную сторону (рис. 7, 8). Чем крупнее животное, тем его нижний и верхний пределы стремятся к более высоким значениям. Все регистрируемые диапазоны различных биологических параметров помогают проследить изменения состояния лабораторных животных и человека и использовать их для прогнозирования эквивалентного времени развития токсического процесса. Данная инфор-

мазия может показывать, во сколько раз быстрее может развиваться интоксикация у животного по сравнению с человеком, и наоборот.

Проводя сравнения диапазонов контрольных интервалов различных биохимических показателей с референтными интервалами человека, можно также заметить растущее сходство интервалов как по ширине, так и по расположению нижних

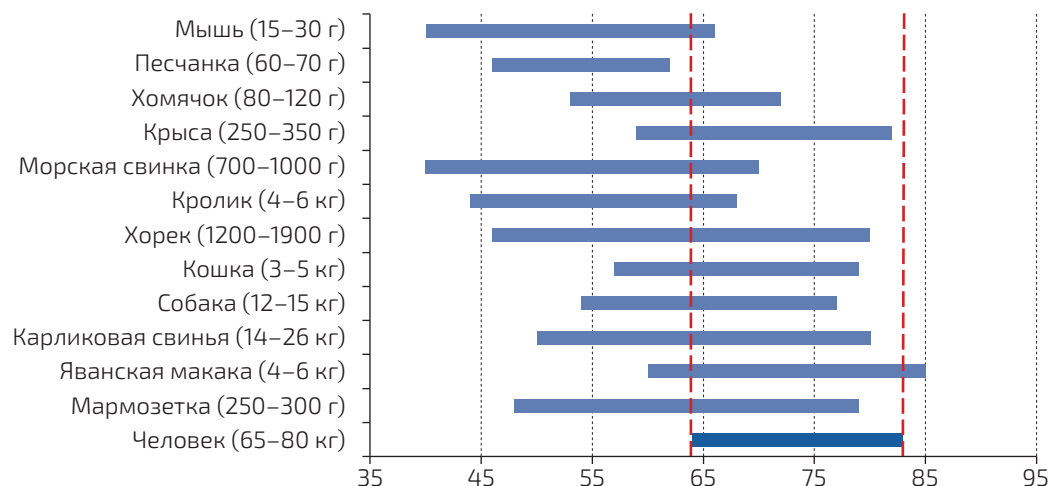


Рис. 7. Сопоставление референтных интервалов общего белка (в г/л) сыворотки крови лабораторных животных и человека

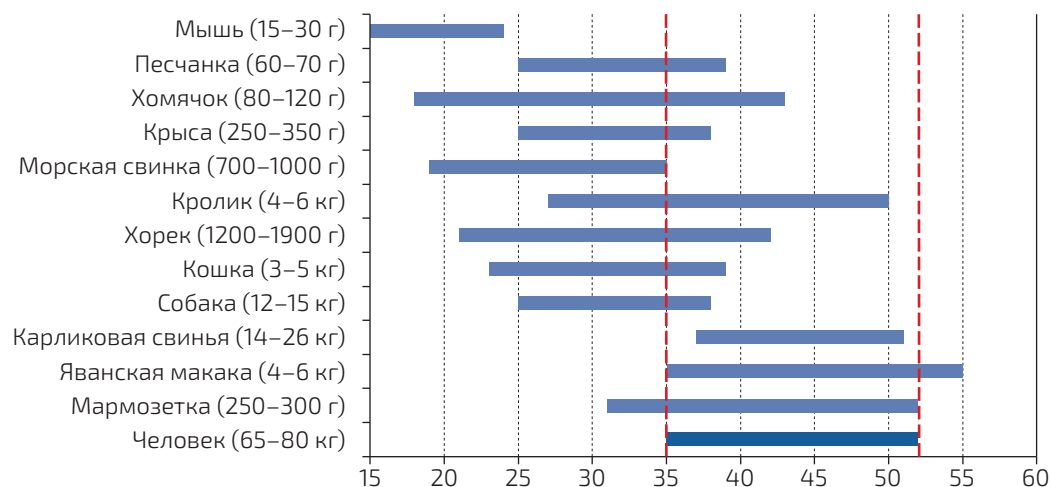


Рис. 8. Сопоставление референтных интервалов общего альбумина (в г/л) сыворотки крови лабораторных животных и человека

Таблица 3

Сопоставления норм биохимических показателей человека и лабораторных животных

Животные	АЛТ	АСТ	ЩФ	ОБ	Альб.	Общ. бил.	Глюк.	Моч.	Креат.	Хол.	ТГ
Мышь, 15–30 г	±	–	±	–	–	±	–	+	–	±	±
Песчанка, 60–70 г	–	–	–	–	–	±	–	–	–	±	+
Хомячок, 80–120 г	–	–	–	±	±	±	–	±	–	±	+
Крыса, 250–350 г	–	–	±	+	–	±	±	+	+	±	+
Морская свинка, 700–1000 г	±	±	±	±	–	±	–	±	+	±	+
Кролик, 4–6 кг	±	±	+	±	±	±	–	+	±	±	+
Хорек, 1200–1900 г	–	–	±	±	±	±	±	±	+	±	+
Кошка, 3–5 кг	±	±	+	±	–	±	±	±	±	±	±
Собака, 12–15 кг	±	+	+	±	±	±	+	+	±	±	±
Карликовая свинья, 14–26 кг	±	+	–	±	+	±	±	±	±	±	+
Яванская макака, 4–6 кг	±	+	–	+	+	±	+	+	+	+	+
Мармозетка, 250–300 г	±	–	–	±	+	±	–	+	+	+	+

Примечание. Диапазон исследуемого показателя между человеком и лабораторным видом животного: (–) — отсутствие схожести диапазона; (±) — приблизительно 50–70% схожесть; (+) — приблизительно 80–100% схожесть.

АЛТ — аланинаминотрансфераза; АСТ — аспартатаминотрансфераза; ЩФ — щелочная фосфатаза; ОБ — общий белок; Альб. — альбумин; Общ. бил. — общий билирубин; Глюк. — глюкоза; Моч. — мочевины; Креат. — креатинин; Хол. — холестерин, ТГ — триглицериды.

и верхних границ в ряду: грызуны — зайцеобразные — хищные — свинообразные — приматы (табл. 3).

Таким образом, референтные интервалы лабораторных животных в доклинических исследованиях дают всестороннее представление о развитии эффектов на определенной тест-системе в ходе исследования нового соединения. Конечно, необходимо учитывать и другие внутренние и внешние факторы, например, особенности биотрансформации, аллометрии лабораторных видов животных, условия содержания, количество потребления пищи и воды, скорость развития организма. Иными словами, референтные интервалы в доклинических исследованиях — это не только рутинный инструмент, применяемый исключительно для мониторинга состояния живого объекта, а также дополнительный критерий, который может использоваться в научных целях, например, при экстраполяции полученных данных с животных на человека.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Amaratunga D. Reference ranges for screening preclinical drug safety data // *Journal of Biopharmaceutical Statistics*. 1997. Vol. 7. N. 3. P. 417–422. DOI: [10.1080/10543409708835197](https://doi.org/10.1080/10543409708835197).
2. Coja T., Charistou A., Kyriakopoulou A. et al. Preparatory work on how to report, use and interpret historical control data in (eco) toxicity studies // *EFSA Supporting Publications*. 2022. Vol. 19. N. 9. P. 7558E. DOI: [10.2903/sp.efsa.2022.EN-7558](https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2022.EN-7558).
3. Dimauro C., Bonelli P., Nicolussi P. et al. Estimating clinical chemistry reference values based on an existing data set of unselected animals // *The Veterinary Journal*. 2008. Vol. 178. N. 2. P. 278–281.
4. Friedrichs K.R., Harr K.E., Freeman K.P. et al. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics // *Veterinary clinical pathology*. 2012. Vol. 41. N. 4. P. 441–453.
5. Henny J. The IFCC recommendations for determining reference intervals: strengths and limitations / Die IFCC-Empfehlungen für die Bestimmung von Referenzbereichen: Stärken und Schwächen // *Journal of Laboratory Medicine*. 2009. Vol. 33. N. 2. P. 45–51.
6. Huang W., Percie du Sert N., Vollert J. et al. General principles of preclinical study design // *Good Research Practice in Non-Clinical Pharmacology and Biomedicine*. 2020. P. 55–69.
7. Montoya Navarrete A.L., Quezada Tristán T., Lozano Santillán S. et al. Effect of age, sex, and body size on the blood biochemistry and physiological constants of dogs from 4 wk. to > 52 wk. of age // *BMC Veterinary Research*. 2021. Vol. 17. N. 1. P. 1–14.
8. Morton L.D. et al. Confounding factors in the interpretation of preclinical studies // *International Journal of Toxicology*. 2019. Vol. 38. N. 3. P. 228–234.
9. Oestereicher M.A. et al. Comprehensive ECG reference intervals in C57BL/6N substrains provide a generalizable guide for cardiac electrophysiology studies in mice // *Mammalian Genome*. 2023. P. 1–20.
10. Ozarda Y., Higgins V., Adeli K. Verification of reference intervals in routine clinical laboratories: practical challenges and recommendations // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2018. Vol. 57. N. 1. P. 30–37. DOI: [10.1515/cclm-2018-0059](https://doi.org/10.1515/cclm-2018-0059).
11. Verbitskaya E.V. Meta-analysis: problems with Russian Publications // *International Journal of Risk & Safety in Medicine*. 2015. Vol. 27. N. 5. P. 589–590.
12. Whitham J.C., Hall K., Lauderdale L.K. et al. Integrating Reference Intervals into Chimpanzee Welfare Research // *Animals*. 2023. Vol. 13. N. 4. P. 639.
13. Yeom S.C. et al. Analysis of reference interval and age-related changes in serum biochemistry and hematology in the specific pathogen free miniature pig // *Laboratory Animal Research*. 2012. Vol. 28. N. 4. P. 245–253. DOI: [10.5625/lar.2012.28.4.245](https://doi.org/10.5625/lar.2012.28.4.245).
14. Красовский Г.Н., Рахманин Ю.А., Егорова Н.А. Экстраполяция токсикологических данных с животных на человека. 2009.
15. Мирошников М.В., Султанова К.Т., Ковалева М.А. и др. Вариабельность биохимических показателей крови и установление референтных интервалов в доклинических исследованиях. Сообщение б: яванские макаки // *Лабораторные животные для научных исследований*. 2022. № 2. С. 14–25. DOI: [10.29296/2618723X-2022-02-02](https://doi.org/10.29296/2618723X-2022-02-02).
16. Рощина Е.А. Референтные интервалы по массовым коэффициентам органов кроликов и их абсолютным значениям // *Лабораторные животные для научных исследований*. 2022. № 1. С. 34–42. DOI: [10.29296/2618723X-2022-01-05](https://doi.org/10.29296/2618723X-2022-01-05).

Фармакологическая безопасность и прижизненная визуализация у лабораторных животных во время эксперимента

<https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-2-8-s8>

Д.Ю. Акимов¹, М.А. Абакумов², А.И. Андреев³, С.С. Арутюнян¹, Н.А. Бондаренко⁴, О.Н. Воронцова⁵, К.К. Ганина⁶, Е.Л. Завьялов⁷, М.С. Истомина^{8,9}, М.С. Каземирчук¹⁰, Е.В. Коновалова¹¹, М.Н. Макарова¹, А.А. Матичин¹, Е.В. Прудникова (Васильева)^{10,12}, И.А. Рыжков¹³, Д.И. Сидиков¹¹, С.Е. Чалов¹⁴

¹ АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,

² ФGAOY BO «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России,

³ ФGAOY BO «Пермский государственный национальный исследовательский университет»,

⁴ ООО «НПК Открытая Наука»,

⁵ ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»,

⁶ ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ»,

⁷ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН»,

⁸ ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России,

⁹ Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина),

¹⁰ Ветеринарная клиника доктора Сотникова,

¹¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»,

¹² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»,

¹³ ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии, НИИОР им. В.А. Неговского»,

¹⁴ Ин Виво Технология

Исследования фармакологической безопасности (ФБ) направлены на изучение потенциальных нежелательных фармакодинамических эффектов действующего вещества лекарственного средства (ЛС) со стороны физиологических функций систем организма в дозах, соответствующих терапевтическому диапазону и выше.

В 2000 г. было утверждено Руководство ICH S7A¹ (Исследования фармакологической безопасности лекарств для медицинского применения), основной целью которого являлась защита участников клинических исследований и пациентов от потенциальных нежелательных действий лекарств. При этом принципы, изложенные в Руководстве ICH S7A, позволяют избежать дополнительного использования лабораторных животных. Документ содержит информацию об общих принципах проведения исследований ФБ. Позднее было утверждено руководство ICH S7B², посвященное изучению потенциальных кардиотоксических эффектов лекарственных препаратов. В 2016 г. был введен в действие ГОСТ Р 56700–2015 Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические фармакологические исследования безопасности³.

Целями исследований фармакологической безопасности являются:

- 1) выявление нежелательных фармакодинамических свойств вещества, которые могут быть релевантны для его безопасности у человека;
- 2) оценка нежелательных фармакодинамических и/или патофизиологических действий вещества, наблюдавшихся в токсикологических и/или клинических исследованиях;
- 3) изучение механизма наблюдаемых и/или подозреваемых нежелательных фармакодинамических действий.

Так называемая основная батарея тестов включает оценку влияния ЛС на функцию жизненно важных систем организма: сердечно-сосудистую, дыхательную и центральную нервную (Енгальчева Г.Н. и соавт., 2017), поскольку именно они обычно считаются витальными системами органов. При этом в Руководстве ICH S7A описываются рекомендации проведения оценки потенциальных нежелательных фармакодинамических действий на функции систем органов, не оцененных в «Основной батарее тестов» или исследованиях токсичности при многократном введении, наличии объективных результатов, указывающих на необходимость выполнения исследования. К таким системам можно отнести: мочевыделительную, пищеварительную, автономную нервную. Также могут быть изучены потенциал развития зависимости, мышечная, иммунная, эндокринная функции и др. Обычно исследования ФБ проводятся в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (GLP, good laboratory practice).

Важно отметить, что документы не содержат описания конкретных методов проведения тех или иных анализов в рамках изучения ФБ. Методические вопросы выполнения отдельных процедур и тестов были обсуждены на конференции GLP-PLANET IV.

¹ Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals S7A. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-s7a-safety-pharmacology-studies-human-pharmaceuticals-scientific-guideline> (дата обращения: 08.2023).

² Non-clinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-s7b-non-clinical-evaluation-potential-delayed-ventricular-repolarization-qt-interval>.

³ ГОСТ Р 56700–2015 Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические фармакологические исследования безопасности. URL: <https://rags.ru/gosts/gost/61107/>.

Исследование влияния на структуры глаза

Актуальность прицельного изучения офтальмотоксичности препаратов, к сожалению, остается очень острой. Так, в 2023 г. была опубликована работа по офтальмотоксичности препарата бролуцизумаб. Препарат, представляющий собой моноклональное антитело, был разработан Швейцарским фармацевтическим гигантом Novartis AG для лечения состояния глаз, известного как влажная возрастная дегенерация желтого пятна. Расстройство является основной причиной потери зрения у людей в возрасте 65 лет и старше. Бролуцизумаб был разработан специально для борьбы с повреждающим разрастанием тканей. Препарат одобрен более чем в 70 странах, но несмотря на то что он был признан безопасным при тестировании перед одобрением, через несколько месяцев после его запуска появились отчеты, в которых отмечались редкие заболевания сетчатки у небольшого количества пациентов, получавших это лекарство, эти побочные эффекты затронули примерно 2,1% пациентов. Ученые из двух исследовательских центров Novartis приступили к расследованию, чтобы раскрыть причину, почему это лекарство оказалось связанным с побочными эффектами, влияющими на сетчатку у некоторых пациентов, в то время как у большинства, получавших это лекарство, проблем не было. Результаты исследования показали, что иммунный ответ, связанный с приемом бролуцизумаба, был предпосылкой для обоих побочных эффектов, поскольку только у пациентов с васкулитом сетчатки или окклюзией сосудов сетчатки наблюдался сильный Т-клеточный ответ на лечение (Karle A.C. и соавт., 2023).

В целом, токсическая оптическая невропатия зависит от дозы и длительности применения ЛС и чаще встречается при назначении противотуберкулезных препаратов (этамбутол и изониазид), некоторых противомикробных средств (линезолид, ципрофлоксацин и хлорамфеникол), противоэпилептических препаратов (вигабатрин), дисульфирама (при хроническом алкоголизме), гидрохинолонов (амебицидные препараты), антимаболитов (таких как метотрексат, цисплатин, карбоплатин, винкристин и циклоспорин), тамоксифена и силденафила. В случае назначения таких ЛС, особенно когда они используются в течение длительных периодов времени или в высоких дозах, пациенты должны быть информированы о возможных побочных эффектах и необходимости немедленно сообщать лечащему врачу о любых проблемах со зрением (Остроумова О.Д. и соавт., 2020). В табл. 1 отражены основные лекарственные средства, способные вызвать повреждение зрительных нервов.

Ветеринарный врач-офтальмолог, ассистент кафедры общей, частной и оперативной хирургии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» Е.В. Прудникова (Васильева) начала свой доклад «**Офтальмологическое обследование для оценки влияния препаратов**» с перечня процедур для диагностики в офтальмологии:

- тест Ширмера (измерение слезопродукции);
- флуоресцеиновый тест (определение целостности эпителия роговицы);
- поведенческая оценка зрительной способности;
- оценка нейроофтальмологических параметров (зрачковый и давл-рефлекс, рефлексы черепно-мозговых нервов);

Таблица 1

Лекарственные средства, способные вызывать токсическое повреждение зрительных нервов, по данным отчетов о безопасности ЛС

ЛС	Частота развития НЛР, по данным drugs.com: оптический неврит/ОН	Другие НЛР/другие формулировки НЛР со стороны органа зрения, другие невропатии
Этамбутол	1–10%/*	Нарушение цветового зрения, боль в глазах (0,1–1%). Необратимая слепота *
Изониазид	*/*	Периферическая невропатия (1–10%)
Линезолид	*/*	Снижение остроты зрения (0,1–1%). Изменения полей зрения (0,01–0,1%)
Ципрофлоксацин	**	Нарушения зрения (хроматопсия, диплопия, фотопсия) (0,1–1%). Нарушения цветовосприятия (0,01–0,1%). Катаракта, боль в глазах *
Хлорамфеникол	*/—	Нет данных
Вигабатрин	Менее 0,01%/ менее 0,01%	Сужение полей зрения вплоть до туннельного зрения (30% пациентов), нистагм (19%), диплопия (16%), затуманенное зрение (16%). Астенопия, боль в глазах, конъюнктивит (0,01–0,1%). Прогрессирующая атрофия сетчатки (менее 0,01%)
Дисульфирам	*/—	Боль в глазах, снижение остроты зрения *
Метронидазол	*/0,01–0,1%	Миопия, диплопия (0,01–0,1%)
Дапсон	—/*	Периферическая невропатия *
Метотрексат	**	Нарушение остроты зрения, в том числе тяжелое, затуманенное зрение (0,01–0,1%). Конъюнктивит, ретинопатия, транзиторная слепота, фотофобия (менее 0,01%)
Цисплатин	*/—	Снижение остроты зрения, затуманенное зрение, приобретенный дальтонизм, кортикальная слепота, отек ДЗН, пигментация сетчатки *

Окончание таблицы 1

ЛС	Частота развития НЛР, по данным drugs.com: оптический неврит/ОН	Другие НЛР/другие формулировки НЛР со стороны органа зрения, другие невропатии
Винкристин	—/со слепотой*	Транзиторная кортикальная слепота, диплопия, птоз, фотофобия *
Циклоспорин	**	Конъюнктивит, снижение остроты зрения, катаракта, боль в глазах (1–10%). Отек ДЗН (менее 0,01%)
Тамоксифен	—/0,01–0,1%	Катаракта, ретинопатия (1–10%). Снижение остроты зрения (0,1–1%). Изменения радужной оболочки (0,01–0,1%)
Силденафил	**	Нарушения зрения (более 10%). Кровоизлияние в сетчатку, нарушение цветового зрения, фотофобия, хроматопсия (1–10%). Конъюнктивит (0,1–1%). Глаукома (0,01–0,1%). NAION, катаракта *
Амиодарон	Менее 0,01%/ менее 0,01%	Амиодароновая кератопатия (отложение микродепозитов в роговице) (более 10%)
Инфликсимаб	Менее 0,01% (ретробульбарный)/—	Конъюнктивит (1–10%). Кератит, периорбитальный отек (0,1–1%). Эндофтальмит (менее 0,01%)
Морфий	**	Амблиопия, миоз, конъюнктивит, затуманенное зрение, нистагм, диплопия (0,1–1%)

Примечания. НЛР — нежелательные лекарственные реакции, ОН — оптический неврит; ДЗН — диск зрительного нерва, NAION — неартериальная передняя ишемическая невропатия; * — частота не изучена, ** — по данным drugs.com, такие НЛР, как ОН, не указаны, однако указаны НЛР со стороны зрения, механизм развития которых связан предположительно с воздействием ЛС на зрительный нерв.

⁴ Drug Information USA. URL: <https://www.drugs.com/> (дата обращения: 08.2023).

- биомикроскопия (определение прозрачности и свойств жидкостей и структур глаза);
- офтальмотонометрия (оценка внутриглазного давления);
- офтальмоскопия (визуализация сосудов сетчатки и хориоидеи, диска зрительного нерва, стекловидного тела);
- фотофиксация изменений переднего и заднего сегмента глаза;
- исследование хроматических зрачковых реакций (примитивная оценка функции фоторецепторов и ганглионарных клеток сетчатки);
- флуоресцентная ангиография (оценка неоваскуляризации, воспаления, нарушения кровотока и их динамики на фоне лечения);
- оптическая когерентная томография («живая гистология»);
- электроретинография (регистрация электрических потенциалов фоторецепторов, биполярных клеток сетчатки и некоторых других клеток при специальных программах).

Спикер отметила, что тест Ширмера (измерение слезопродукции) — достаточно рутинный и часто используемый метод диагностики, который позволяет определить общее количество выделяемой слезной жидкости. Не реже используется флуоресцеиновый тест. Данный вид исследования может быть полезен при подозрении на эпителиотоксичность тестируемого препарата. При гибели эпителиальных клеток роговицы обнажается гидрофильная строма, впитывающая в себя краситель, и исследователь может видеть специфическое окрашивание как на рис. 1.

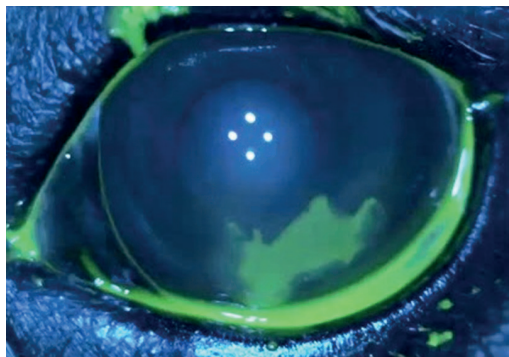


Рис. 1. Вариант окрашивания глаза флуоресцентным красителем

Офтальмотонометрия проводится для установления внутриглазного давления. Спикер выделила наиболее применимые для этих целей приборы, из которых один больше подходит для крупных лабораторных животных, таких как хорьки, свиньи, кошки, собаки, приматы, его важным преимуществом является калибровка под глаз кроликов, поскольку их видовая особенность — очень тонкая роговица. Другой прибор используется в основном для грызунов.

Биомикроскопия применяется для определения локализации патологии (глубина язвы, локализация помутнения роговицы, жидкости, хрусталика, стекловидного тела) и взаиморасположения структур глаза и их частей (радужки, глубины передней камеры глаза, хрусталика).

В ветеринарных клиниках используется обычно непрямая офтальмоскопия, тогда как существует и прямая. Оба метода имеют как недостатки, так и преимущества. При прямой офтальмоскопии площадь обзора меньше, а детализация структур выше, а при непрямой, наоборот. С помощью офтальмоскопии можно наблюдать за изменениями глазного дна. По завершении доклада докладчица призвала к более плотному взаимодействию клинических ветеринарных врачей и специалистов в области лабораторных животных.

Исследования влияния на нервную систему

Нейротоксичность — нередкое явление при применении ЛС многих терапевтических классов. Проявления нейротоксичности варьируют от ототоксичности, висцеральной нейропатии и нейромышечной блокады (поражение периферической нервной системы) до нарушения сознания, неспецифической энцефалопатии, судорог и неконвульсивного эпилептического статуса (поражение центральной нервной системы).

История изучения нейротоксичности ЛС началась в 90-е годы XX века, когда Turner описал побочный эффект бромидов в виде седации, снижения когнитивности и аффективных проявлений.

С тех пор внимание к этой проблеме только усилилось, во-первых, ввиду ее важности, а во-вторых, в связи с колоссальным ростом лекарственного рынка и многочисленности ЛС, у которых был отмечен нейротоксический эффект — антибиотики, глюкокортикостероиды, противовирусные средства, статины, антипсихотики, антиконвульсанты, анестетики.

Общей встречаемости нейротоксичности лекарств, вероятно, быть не может ввиду огромного разрыва между описанием отдельных случаев, например, от генерализованных судорог при передозировке лидокаина до значительной частоты депрессивных расстройств (40%) и суицидальных мыслей (47%) у антиконвульсантов. Мешает общей статистике и разнообразие проявлений нейротоксичности ЛС: изменение вкуса, поражение зрительного нерва, делирий, психотические реакции и достаточно высокий уровень смертности (12–26%) от неврологических осложнений пациентов после трансплантации костного мозга, большая часть которых (64,7%) вызвана кровоизлияниями или ишемией мозга (Постников С. С. и соавт., 2017).

Процедуры основной батареи ЦНС — это, как правило, простые тесты с использованием традиционных методов, которые можно быстро провести в обычном режиме. Они являются первыми методами, применяемыми при оценке безопасности, и часто используются в самом начале процесса исследования в качестве скрининга для исключения веществ с потенциальным риском для ЦНС. В связи с тем, что такие исследования проводятся на ранних стадиях процесса оценки безопасности, они выполняются почти исключительно на грызунах.

Основной целью теста Ирвина, впервые описанного Ирвином (1968) на мышах, но легко адаптированного для крыс, является оценка качественного воздействия испытуемого вещества на поведение и физиологические функции, начиная с первых доз, оказывающих заметное воздействие, и заканчивая дозами, вызывающими явную поведенческую токсичность или даже смерть. Тест Ирвина также позволяет обоснованно оценить продолжительность действия исследуемого вещества на различные наблюдаемые параметры. Поскольку большинство показателей включает субъективную оценку различных аспектов поведения животного, тест должен проводиться строго стандартизировано, хорошо обученными наблюдателями для обеспечения воспроизводимости результатов в разных случаях или в разное время наблюдения в один и тот же день. Вследствие систематических изменений поведения и реакций подопытных животных в течение дня тестирования у особей, которым вводили лекарственные препараты, всегда оценивают состояние относительно группы контрольных животных в неслепых условиях, чтобы определить,

является ли наблюдаемый эффект, действительно, следствием введения исследуемого вещества.

Как правило, тест Ирвина используется как минимум на начальном и конечном этапах разработки лекарств. На исследовательском этапе разработки ЛС он часто является первым тестом, применяемым *in vivo*. На этом этапе цель теста — быстрое определение токсичности испытуемого вещества, диапазона активных доз и основных эффектов, оказываемых на поведение и физиологические функции. Первая оценка безопасности обеспечивается разницей между первыми дозами, дающими наблюдаемые эффекты, и дозами, вызывающими токсичность или летальность. Даже если испытуемое вещество предназначено для непсихотропного применения, тест Ирвина помогает выбрать дозы для последующих испытаний. Более того, этот тест часто позволяет определить вид активности, проявляемой испытуемым веществом в психотропной области.

На более поздних этапах разработки лекарств (до фазы I), когда испытуемое вещество более полно охарактеризовано, тест Ирвина дает четкий общий показатель запаса безопасности испытуемого вещества. Кроме того, хотя тест в основном поведенческий, он может дать глобальные указания на влияние препарата на жизненно важные функции, такие как дыхание или кишечная моторика. С другой стороны, тест дает мало информации об эффектах, которые не видны при непосредственном наблюдении, включая весь спектр сердечно-сосудистых, легочных и желудочно-кишечных параметров.

В тесте Ирвина оцениваются: смерть, конвульсии, тремор, хвост Штрауба, снижение общей активности, повышение общей активности, прыжки, аномальная походка (перекатывание, вставание на цыпочки), двигательная инкоординация, изменение мышечного тонуса, потеря хватания, акинезия, катаlepsия, потеря тяги и равновесия, перебирание передними лапами, извивание, пилоэрекция, стереотипии (обнюхивание, жевание, движения головы), подергивания головы, царапанье, измененное дыхание, агрессия, измененная реакция на прикосновение, птоз, экзофтальм, потеря правого рефлекса и роговичного рефлекса, анальгезия, дефекация/диарея, слюнотечение, слезотечение, ректальная температура (гипотермия/гипертермия) и диаметр зрачка (миоз/мидриаз).

Однако оценка неврологического статуса у крупных лабораторных животных описана и известна в значительно меньшей степени.

Продолжая секцию в разрезе ФБ и потенциальном влиянии тестируемых объектов на нервную систему, выступила ветеринарный врач (ветеринарная клиника неврологии доктора Сотникова) М.С. Каземирчук с докладом «**Особенности неврологического осмотра лабораторных животных**». Лектор отметила, что навыки неврологического осмотра должны быть у каждого ветеринарного врача, а его проведение увеличивает время клинического осмотра в среднем на 2 мин. Среди сдерживающих факторов лектор сделала акцент на том, что нельзя проводить неврологический осмотр под седацией или анестезией, а также у стрессированных животных. Докладчик говорила, что постановка окончательного диагноза невозможна с помощью только неврологического осмотра.

Протокол неврологического осмотра может включать следующее.

1. Наблюдение без фиксации (положение тела в пространстве, сознание, походка). Оценивают:
 - сознание (возбуждение, активное, вялое, ступор, кома);
 - положение тела в пространстве, поза, нарушение постановки конечностей;

- тортиколлис (наклонное положение головы с поворотом ее в противоположную сторону);
 - способность к перемещению (манежные движения, спинальная походка);
 - судороги, постиктальное состояние;
 - аномальные произвольные движения;
 - симметрия/асимметрия головы.
2. Пальпация. Оценивают:
- кости, суставы, мышцы головы, позвоночника, конечностей;
 - оценка тонуса;
 - сравнение с контралатеральной стороной;
 - наличие пролежней;
 - наличие переросших когтей.
3. Постуральные (позотонические) реакции. Производится на нескользкой поверхности. Придерживать животное (риск травмы). У животных жертв — реакция замирания, проприоцептивный дефицит в ответ на стресс. Оценивают:
- положение кисти/стопы на дорсальной поверхности. Норма — незамедлительное возвращение конечности в естественное положение;
 - рефлекс переворачивания. Удерживать животное на боку. Разрешить принять естественную позу.
4. Спинальные (спинно-мозговые) рефлексy. Оценка поражения нижнего или верхнего моторных нейронов.
- Рефлекс оценивают в латеральном положении: отсутствует 0, снижен +1, нормальный +2, усиленный +3, усиленный с клонусом +4.
5. Оценка черепных нервов:
- рефлекс угрозы (может отсутствовать в норме у животных жертв);
 - зрачковые рефлексy;
 - позиция глаз в зависимости от позиции головы. Физиологический нистагм (быстрая фаза в сторону движения);
 - тонус челюсти;
 - пальпебральный рефлекс (касание медиального угла);
 - чувствительность роговицы, слизистой оболочки носа, кожи головы;
 - реакция на громкий звук.
6. Оценка чувствительности и боли:
- поворот головы в сторону болевого стимула;
 - гиперестезия.

Марина Сергеевна обратила внимание на то, что в зависимости от целей эксперимента протокол неврологического осмотра может быть изменен.

Анестезия и аналгезия в рамках фармакологической безопасности

В рамках экспериментов фармакологической безопасности аналгезия и анестезия являются неотъемлемым компонентом многих процедур на лабораторных животных. Влияние анестезии и аналгезии в рамках изучения фармакологической безопасности тестируемых объектов должно учитываться. С одной стороны, дис-

тресс и боль являются компонентами многих экспериментальных процедур и существенно влияют на благополучие животных. Поэтому правильное использование седативных средств, транквилизаторов, анальгетиков и анестетиков является важным этическим требованием многих экспериментов. С другой — использование этих препаратов имеет два типа эффектов.

1. Облегчение стресса и боли животного оказывает важное биохимическое и физиологическое воздействие на образцы и данные, полученные от животных. Например, показано, что боль вызывает повышение уровня адреналина, кортизола, глюкозы в плазме крови, эндорфинов и многих других химических веществ в организме. Боль также увеличивает частоту сердечных сокращений, ударный объем, сердечный выброс и приводит к поверхностному учащенному дыханию и др. Надлежащее использование анальгетиков может существенно предотвратить эти эффекты.
2. Прямое физиологическое воздействие препарата на животное и соответствующие ему образцы и данные. Например, изофлуран лучше сохраняет сердечно-сосудистую функцию, чем галотан. Тем не менее он является мощным супрессором дыхательной системы, и его сосудорасширяющее действие больше, чем у галотана. Таким образом, правильный выбор препаратов для экспериментов может свести к минимуму побочные эффекты во время данных исследований.

Вопросам дифференцирования возможных эффектов наркотизации была посвящена лекция Дмитрия Юрьевича Акимова, главного ветеринарного врача, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ». Лектор выступил с докладом «Влияние препаратов, используемых для анестезии лабораторных животных, на показатели крови и физиологические параметры». Исследование проводилось на мышах и крысах.

У мышей препараты Ксила (5 мг/кг) и Золетил (15 мг/кг) использовались для достижения легкой степени анестезии, Ксила (10 мг/кг) и Золетил (20 мг/кг) — для умеренной, а также Ксила (10 мг/кг) и Золетил (25 мг/кг) — для глубокой. Влияние разных доз препаратов Ксила и Золетил представлены в табл. 2.

Применение комбинации Ксилы и Золетила у мышей в зависимости от дозы может приводить к изменениям показателей крови и ряда физиологических параметров

Таблица 2

Влияние препаратов Ксила и Золетил в разных дозах на мышей

Ксила : Золетил, мг/кг	Аспартамино- трансфераза (пол)	Глюкоза (пол)	Активированное частичное тромбопластиновое время (пол)	ЧДД (пол)	ЧСС (пол)	PQ (пол)
5 : 15	N (♂♀)	↑↑ (♂♀)	N (♂♀)	N (♂♀)	N (♂♀)	N (♂♀)
10 : 20	↑ (♂♀)	↑↑ (♂♀)	N (♂♀)	N (♂♀)	N (♂♀)	N (♂♀)
10 : 25	↑ (♂♀)	↑↑ (♂♀)	↑↑ (♂)	↓ (♂♀)	↓ (♂♀)	↑ (♂♀)

Примечания. Здесь и в табл. 3: N — норма; ♂ — самец; ♀ — самка; ↑ — статистически значимое увеличение; ↑↑ — увеличение в 2 раза; ↓ — снижение; ЧДД — частота дыхательных движений; ЧСС — частота сердечных сокращений; PQ — это период от P-зубца до Q-зубца на электрокардиографии.

Таблица 3

Влияние ксила и золетила в различных дозах на крыс

Ксила: Золетил, мг/кг	Глюкоза (пол)	Активированное частичное тромбопластиновое время (пол)	ЧДД (пол)	ЧСС (пол)	RR	PQ
5:15	↑ (♂♀)	N (♂♀)	N (♂♀)	↓ (♂♀)	↑ (♂♀)	N (♂♀)
6:20	↑ (♂♀)	N (♂♀)	N (♂♀)	↓ (♂♀)	↑ (♂♀)	N (♂♀)
10:25	↑ (♂♀)	↓ (♂♀)	↓ (♂♀)	↓ (♂♀)	↑ (♂♀)	↓ (♂♀)

Примечание. RR — интервал показатель продолжительности сердечного цикла.

ров, похожих на гепатопатологию, нарушениям в системе гемостаза, а также оказывать некую кардио- и респираторную токсичность. Данное влияние наркотизации следует дифференцировать от действия препаратов в кандидаты ЛС.

Для крыс Ксила (5 мг/кг) и Золетил (15 мг/кг) использовались для предоставления легкой степени анестезии, Ксила (6 мг/кг) и Золетил (20 мг/кг) — для умеренной и Ксила (10 мг/кг) и Золетил (25 мг/кг) — для глубокой. Влияние различных доз препаратов Ксила и Золетил представлены в табл. 3.

Применение комбинации ксила и золетила у крыс в зависимости от дозы может приводить к изменениям показателей крови и ряда физиологических параметров, похожих на нарушения в системе гемостаза, кардио- и респираторную токсичность. Данное влияние наркотизации следует дифференцировать от действия препаратов в кандидаты ЛС.

Тему использования старых/новых препаратов для наркотизации и определения их влияния на кровообращение продолжил Иван Александрович Рыжков, заведующий лабораторией Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии. Цель его доклада «Влияние инъекционных анестетиков на регионарное кровообращение и микроциркуляцию у грызунов» — выявить особенности действия инъекционных анестетиков на параметры кожной микроциркуляции.

Исследование проведено на крысах-самцах линии Wistar. В первой группе анестезию проводили 6% раствором хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг внутривенно (группа «хлоралгидрат», n=14). Во второй группе (Золетил + Ксила) была комбинированная анестезия: Золетил (20 мг/кг) и Ксила (5 мг/кг) внутривенно. Артериальное давление (АД, мм рт.ст.) измеряли в сонной артерии. По ЭКГ рассчитывали ЧСС в 1 мин. Кожный кровоток измеряли методом лазерной доплеровской флоуметрии на подошвенной поверхности ступни крысы. Среднюю величину перфузии (M, пф. ед.), ЭКГ и АД регистрировали в течение 5 мин. Оклюзионную пробу проводили на задней лапе крысы (давление 200–220 мм рт.ст. в течение 3 мин). Регистрировали показатели постокклюзионной реактивной гиперемии: максимальные значения перфузии (M_{max}) и кожной сосудистой проводимости (CVC_{max}) кожи. Спикер рассказал, что в ходе эксперимента выявлено снижение АД в группе с использованием хлоралгидрата по сравнению с комбинацией Золетил + Ксила. ЧСС в группе «хлоралгидрат» была выше, чем при применении комбинации Золетил + Ксила. Кожный кровоток не различался между группами «хлоралгидрат» и «Золетил + Ксила».

Группы «хлоралгидрат» и «Золетил + Ксила» не отличались по пиковым значениям гиперемии (M_{\max}), но вазодилатация (CV_{\max}) при реактивной гиперемии и время ее достижения (T_{\max}) были выше в группе «хлоралгидрат».

В заключение И.А. Рыжков обратил внимание слушателей, что для анестезии хлоралгидратом характерны умеренная артериальная гипотензия и высокая вариабельность кожного кровотока, а для комбинации Золетил + Ксила — относительная брадикардия на фоне сохраненного уровня АД и периферического кровотока.

Исследования Д.Ю. Акимова и И.А. Рыжкова углубляют знания о влиянии наркотизации на организм лабораторных грызунов. Данные, представленные докладчиками, могут быть полезны для дифференцирования анестезии от влияния препаратов в кандидаты ЛС.

Поведенческий анализ в доклинических исследованиях

Одним из наиболее сложных для проведения, а также интерпретации типов доклинических экспериментов, о котором пойдет разговор дальше, является изучение влияния новых фармакологических агентов на поведение лабораторных животных.

В широком понимании поведенческий статус — это сложный комплекс физиологических и психических процессов, который включает в себя все виды реакций и взаимодействий человека или животного с окружающей средой посредством интеграции моторных, сенсорных и ассоциативных функций нейронов. Доклинические исследования поведения животных включают оценку биомаркеров и проведение тестов для измерения эмоционального состояния, когнитивных функций, моторной активности, социального поведения, стереотипий и других параметров. Эти тесты позволяют оценить общий жизненный процесс и функциональное состояние животного (Bale T.L. и соавт., 2019).

В чем заключается причина сложности нейропсихофизиологических исследований в отличие от других доклинических экспериментов? Чаще всего исследователю приходится проводить оценку изменения поведенческого статуса по ряду разработанных косвенных признаков, которые могут быть интерпретированы по-разному (Saré R.M. и соавт., 2021). Функции, оцениваемые с помощью поведенческих методик, можно разделить на области, связанные с неврологическими эффектами, хотя многие из этих тестов в значительной степени дублируют друг друга. Эти зоны могут быть определены следующим образом: вегетативные свидетельствуют о наблюдаемых изменениях в работе симпатической и парасимпатической нервной системы; нервно-мышечные выявляют двигательную дисфункцию центрального и/или периферического происхождения; реактивность или возбудимость может рассматриваться как общая реакция испытуемого на неспецифические стимулы; сенсорные зоны — это оценка двигательной реакции на сенсорный стимул; другие, включая судороги, тремор и физиологические параметры. Следующим моментом, на который необходимо обратить внимание, является то, что в поведенческих исследованиях используется сложная для детектирования техника, либо наоборот, техника отсутствует, и исследователь сам интерпретирует то или иное действие лабораторного животного. Другим примером можно считать моделирование нейропсихофизиологических нарушений, таких как депрессия, тре-

вога, посттравматическое стрессовое расстройство и др. Поскольку такие состояния, как тревога, являются идиопатическими, модели на животных трудно создавать и, следовательно, они несовершенны (van der Staay F.J. и соавт., 2009). В отличие от анатомических нарушений, которые моделируются чаще всего либо посредством операционных манипуляций, либо фармакологического воздействия, чаще всего это сложные поведенческие нарушения, которые необходимо вырабатывать на протяжении длительного времени, используя разнообразные методы, порой спорные относительно этики. Достаточно вспомнить методы моделирования хронического непредсказуемого умеренного стресса, которые заключаются в ежедневном разнообразном физическом воздействии на животных на протяжении от 2 нед до 2 мес, или конфликтный тест Фогеля, используемый для определения анксиолитических свойств лекарств и основанный на воздействии электрического тока на язык лабораторного животного.

Нервная ткань, особенно мозг, чувствительна ко многим чужеродным химическим веществам, и токсическое воздействие может проявляться в виде тонких нарушений поведения задолго до того, как токсическое воздействие станет клинически значимым (Costa L.G. и соавт., 2004). Дефицит интеллектуальных процессов, сенсорных функций, двигательного контроля (особенно координации и квалифицированного исполнения), эмоциональных реакций и др. может быть крайне неблагоприятным, даже если степень клинического проявления не велика и не ведет к смерти. Именно поэтому исследования, направленные на изучение поведения лабораторных животных, должны рассматриваться наиболее качественно и подробно. Несмотря на то что поведенческие тесты разработаны еще в прошлом столетии, в настоящее время нет четкого понимания подготовки и проведения поведенческих исследований. На протяжении десятилетий разрабатывались тесты и модели, направленные на изучение разнообразных аспектов поведенческих реакций и активности, при этом сами тесты принимали разные формы с большей или меньшей специфичностью и чувствительностью к неврологическим эффектам. Важно понимать, что единого протокола поведенческого скрининга в настоящее время не существует, скорее существует некоторый негласный подход, включающий определенные ключевые элементы, которого исследователи стараются придерживаться. Именно поэтому целесообразным в сложившихся обстоятельствах является разработка некоторого протокола проведения поведенческих исследований (нейропсихофармакологических исследований), посредством которого необходимо проработать аспекты проведения исследования, которые уже были освещены ранее, а также о которых сказано далее.

Изучение поведения лабораторных животных в доклинических экспериментах должно складываться из подготовительного периода, непосредственно проведения исследования и этапа завершения (Genzel L., 2021; Sousa N. и соавт., 2006; Wahlsten D., 2010). Смысл подготовительного периода заключается в подготовке животного к эксперименту. Имеется в виду привыкание или адаптация к лаборатории, помещению, где непосредственно будет осуществляться эксперимент. Это связано с тем, чтобы животные не реагировали чрезвычайно эмоционально из-за нового места, освещенности, температуры, запахов и т.д. Это очень важный нюанс, пренебрежение которым может отразиться на всем последующем эксперименте. Внимание также стоит уделить непосредственно помещению для проведения поведенческих экспериментов. Это как минимум должна быть звукоизолированная

комната. Особое место хочется уделить экспериментатору, это должен быть человек, которого животные знают, в противном случае незнакомое лицо также может увеличить эмоциональность лабораторных животных. Этап непосредственно проведения исследования включает помещение животного в испытательную установку, регистрацию определенных показателей за определенное время. В настоящее время в научных статьях можно столкнуться с несогласованностью времени и количеством оцениваемых показателей. Конечно, это можно объяснить индивидуальными особенностями каждого эксперимента, но целесообразней все же стремиться к унифицированной форме его проведения. Этап завершения связан с удалением лабораторного животного из установки, очисткой установки от запахов лабораторного животного перед непосредственным помещением следующего лабораторного животного. Запах от предыдущего животного также может повлиять на действия и эмоциональность животного. Данные аспекты, а также еще множество других, о которых будет сказано далее, требуют в настоящее время некоей унифицированности при всех видах поведенческих исследований. Отсутствие стандартизации может негативным образом сказаться на возможности интерпретации данных в разных лабораториях, а следовательно, привести к неправильным выводам касательно влияния на организм человека.

В поведенческих тестах обычно используют грызунов, таких как мыши или крысы, по нескольким причинам (Saré R.M. и соавт., 2021; d'Isa R. и соавт., 2023). Грызуны являются общепринятыми тест-системами для изучения поведенческих процессов. Они демонстрируют сходные особенности поведения с людьми, что делает их подходящей системой для исследований. Грызуны имеют схожие нейрохимические и нейрофизиологические механизмы с людьми, это дает возможность изучать различные аспекты поведения. Используя генетическую составляющую грызунов, преимущественно мышей, с помощью генной инженерии можно проводить эксперименты, связанные с определенными генетически-обусловленными расстройствами. Высокая репродуктивная способность и короткий жизненный цикл мышей и крыс позволяют проводить эксперименты и анализировать результаты за достаточно короткий срок. Кроме того, эти животные относительно недорогие и легко доступны. Их содержание и обслуживание требуют минимальных затрат, что дает возможность более широкому кругу исследователей проводить эксперименты.

В поведенческих тестах обычно чаще используют крыс, чем мышей. Крысы являются популярным выбором в поведенческой фармакологии из-за их более крупного размера по сравнению с мышами (Ellenbroek B. и соавт., 2016). Однако мыши также часто применяются в исследованиях, особенно в генетике и молекулярной биологии. Выбор между крысами и мышами может зависеть от конкретной цели исследования и доступности определенного вида животных.

Методы поведенческого анализа занимают особую нишу в доклинических исследованиях. С помощью поведенческих методик могут быть реализованы следующие задачи:

- скрининг новых химических веществ для оценки их потенциала в отношении терапии психических заболеваний, нервно-мышечных расстройств и болевых синдромов;
- экспериментальный анализ механизма действия фармакологических агентов;
- оценка влияния на ЦНС в рамках исследований безопасности.

В своем докладе «[Equipment for Animal Behavioral Studies](#)» Federico Montecchiario представил широкий спектр установок для проведения поведенческих исследований, а ведущий научный сотрудник НИИ «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» Елена Владимировна Филатова в докладе «[Новый лабиринт-трансформер для оценки различных видов пространственной навигации, памяти и обучения лабораторных животных](#)» показала разработку новой установки «Лабиринт-трансформер» для оценки различных видов пространственной навигации, памяти и обучения лабораторных животных. Методики поведенческого анализа, разработанные для грызунов (мыши, крысы), представлены в табл. 4 (Whishaw I.Q. и соавт., 1999; Sousa N. и соавт., 2006; Lezak K.R. и соавт., 2022).

Как отметили в своих докладах старший научный сотрудник ФГБНУ «НИИ Фармакологии имени В.В. Закусова» Ольга Николаевна Воронцова («[Поведение грызунов в тесте "Спонтанное распознавание нового объекта"](#)») и консультант ООО «НПК Открытая Наука» Нина Анатольевна Бондаренко («[Тест "Принудительное плавание" по Порсолту: неужели все так плохо?](#)»), а также руководитель доклинических и ветеринарных исследований ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ» Ксения Кирилловна Ганина («[Темно-светлая камера: использование для поведенческого фенотипирования, парадоксальное поведение мышей](#)»), несмотря на то что протоколы поведенческого анализа существуют не одно десятилетие, до сих пор остается актуальным вопрос корректной интерпретации наблюдаемых паттернов поведения.

Некоторые аспекты стандартизации поведенческого анализа

На сегодняшний день многие исследователи занимаются вопросами будущего поведенческого анализа, например, применение алгоритмов машинного обучения для упрощения трудоемкого процесса обработки записей поведения животных и устранения субъективной оценки паттернов поведения (Andreev A. и соавт., 2021; von Ziegler L. и соавт., 2021). Разработка и использование алгоритма автоматического анализа в узкоспециализированных случаях были представлены в докладах заведующего лабораторией экспериментальной фармакологии ФГАОУ ВО «Пермский Государственный Национальный Исследовательский Университет» Александра Игоревича Андреева («[Нейросетевое распознавание поведенческих событий в тесте "Спонтанное распознавание нового объекта"](#)»), студентов ФГБОУ ВО «Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова» Данила Икромжоновича Сидикова («[Анализ паттернов поведения крыс после ишемического инсульта с помощью методов глубокого машинного обучения](#)») и Евгении Владимировны Коноваловой («[Использование алгоритма для анализа субсекундных поведенческих моделей мышей после моделирования ишемии головного мозга](#)»). Тем не менее воспроизводимость экспериментальных данных, полученных с помощью поведенческих методик анализа, все еще является большой проблемой, которая требует внимания и попыток ее решения. Подходя к вопросу унификации процедур поведенческих методик, мы сталкиваемся с тем, что единых требований по валидации физиологических методик не существует. Известная терминология из нормативных документов (процессы верификации и валидации) относится к аналитическим и биоаналитическим методикам и слабо применима в отношении анализа поведения.

Таблица 4

Методики поведенческого анализа, разработанные для грызунов

Оцениваемый параметр/активность	Тест	Характеристика
Локомоторная, ориентировочно-исследовательская активность, нервно-мышечная активность	Открытое поле	Предназначен для оценки локомоторной, ориентировочно-исследовательской активности и эмоционального статуса на открытой площадке
	Сужающаяся дорожка	Предназначен для оценки походки животного, моторного дефицита задних и передних конечностей. Широко используется при моделировании различных патологических состояний мозга, связанных с повреждением моторной коры
	Ротарод	Предназначен для определения двигательного-координационных нарушений по способности животных удерживаться на вращающемся барабане
	Актометр	Регистрируется горизонтальная и вертикальная двигательная активность животного
	Сетка	В тесте оценивается способность животных держаться на металлической сетке в перевернутом положении тела на протяжении определенного периода времени
	Проволока	Направлен на изучение локомоторной активности посредством подвешивания животного двумя передними лапками на горизонтально расположенной металлической проволоке, ведется наблюдение за способностью животного забраться на сетку всеми лапками
Staircase test	Тест предназначен для изучения моторики передних конечностей у крыс. Позволяет оценить незначительные нарушения в работе самой конечности, а также кисти и пальцев	

Продолжение таблицы 4

Оцениваемый параметр/активность	Тест	Характеристика
	Цилиндр	Тест выполняется для выявления асимметрии использования передних конечностей (например, при одностороннем повреждении сенсомоторной коры головного мозга)
	Лестница с перекладинами	Тест используется для оценки моторных функций и координации у грызунов
Тревожное поведение (анксиолитическая активность)	Приподнятый крестообразный лабиринт	Позволяет оценить уровень тревожности животного, симптомы неврологического дефицита, привыкание (habituation)
	О-лабиринт	Предназначен для оценки баланса тревожности и ориентировочно-исследовательской активности животных
	Норковая камера	То же
	Темно-светлая камера	Предназначен для изучения поведения грызунов в условиях переменной стрессогенности (при свободном выборе комфортных условий)
	Тест Вогеля	Используется при проведении питьевого конфликтного теста для оценки анксиолитического эффекта лекарственных препаратов
Депрессивно-подобное поведение (антидепрессивная активность)	Тест Порсолта	Поведенческий тест на отчаяние, в основе которого лежит пассивная стратегия борьбы со стрессом
	Подвешивание за хвост	Поведенческий тест на отчаяние, в основе которого лежит неспособность животного выбраться из стрессогенных условий
	Тест предпочтения сахарозы	Тест на выявление ангедонии (снижение стремления к получению удовольствия)

Окончание таблицы 4

Оцениваемый параметр/активность	Тест	Характеристика
Обучение и память (когнитивные функции/ пространственная память)	Условный рефлекс пассивного избегания или активного избегания	Оценивается формирование и воспроизведение памятного следа в норме и в условиях амнезии
	Лабиринт Барнса	Позволяет оценить пространственное обучение и память.
	Тест распознавания нового объекта	Предназначен для оценки кратковременной или долговременной памяти
	Тест Морриса	Позволяет оценить кратковременную память и зрительно-пространственные способности.
	Восьмилучевой лабиринт	Позволяет оценить пространственную память
	Экстраполяционное избежание	Предназначен для изучения когнитивных функций в условиях острого стресса (вода и узкое пространство)
Социальное поведение	Тест доминирования	Предназначен для быстрой оценки социальной иерархии у животных
	Трехкамерный социальный тест	В тесте оценивается склонность одного животного посещать или избегать зону установки с другим животным
Ноцицепция (анальгетическая активность)	Горячая пластина	Тест «Горячая пластина» используется для измерения времени реакции на тепловое раздражение у грызунов.
	Тест отдергивания хвоста	Разработан для измерения болевого порога при воздействии инфракрасного теплового стимула на хвост грызуна

Таблица 5

Факторы, влияющие на поведение лабораторных животных

Биологические факторы	Физические и химические факторы	Условия содержания	Экспериментальные условия
Вид	Температура	Диета	Помещение для теста
Линия	Влажность	Плотность содержания в клетке	Тип освещенности
Пол	Шум, вибрация	Частота замены подстила	Экспериментатор
Возраст	Освещение	Обогащение среды	Хэндлинг
Циркадные ритмы	Запахи (другие животные, персонал, дезинфектанты)	Режим освещения, сезонность	Последовательность тестов, время тестирования
Эстральный цикл	—	Тип клетки/вольера для рутинного содержания	Путь введения препаратов

Наиболее корректным в отношении поведенческих методик будет использование термина «стандартизация», подразумевая под ним единообразие процедуры проведения и оценки выполнения теста.

Факторов, влияющих на поведение, настолько много (табл. 5), что создать одинаковые условия в каждой лаборатории практически невозможно. Так, например, как отметил в своем выступлении Евгений Леонидович Завьялов [«Паразитарное окружение и его социальные последствия у грызунов»](#), даже оно способно оказывать влияние на их морфологию и поведение. Таким образом, важно учитывать все возможные факторы, тщательно документировать экспериментальный процесс и создавать подробные стандартные протоколы тестов.

Учитывая эту вариативность, становится понятно, что поведенческие тесты нужно стандартизовать в конкретных условиях и под конкретную задачу.

Так, тест «открытое поле», рекомендованный руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Миронов А.Н. и соавт., 2012) и применяемый в рамках доклинических исследований, является скрининговым инструментом для выявления нейротоксических эффектов по показателям двигательной, исследовательской активности и эмоциональности. Тест помогает выполнить довольно конкретную задачу, которая в данном случае допустимо упрощена до оценки в большей степени локомоторной активности, то есть используется «рутинный» вариант теста, при этом он прост в исполнении. Однако надо помнить, что тест не дает возможность ответить на вопрос, влияет ли исследуемое вещество на когнитивные функции. Почему важна стандартизация теста в данном контексте? Конечная цель стандартизации — это установление физиологических норм для возможности корректно оценивать и интерпретировать полученные данные в дальнейших исследованиях. В экспериментах, как правило, есть контрольная группа, но в токсикологических исследованиях мы имеем дело с малыми выборками (то есть мы можем увидеть случайное ложное снижение/увеличение актив-

Таблица 6

Поведение интактных самцов и самок при двух режимах освещения ($n=25$)

Показатель	Белый свет		Красный свет	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки
$M \pm SEM$				
Количество:				
посещенных квадратов	25,4±2,43 ($C_v=48\%$)	43,2±3,81* ($C_v=44\%$)	36,4±3,65** ($C_v=50\%$)	46,4±2,85* ($C_v=31\%$)
пристеночных стоек	6,4±0,53 ($C_v=41\%$)	12,6±0,93* ($C_v=37\%$)	9,0±1,20 ($C_v=67\%$)	13,7±1,31* ($C_v=48\%$)
$Me (Q1; Q3)$				
Количество:				
центровых посещений	0,0 (0,0; 1,0)	1,0 (0,0; 2,0)	1,0 (0,0; 2,0)	2,0 (1,0; 3,0)
свободных стоек	1,0 (0,0; 2,0)	2,0 (0,0; 3,0)	1,0 (0,0; 2,0)	2,0 (0,0; 4,0)
актов груминга	5,0 (5,0; 8,0)	4,0 (3,0; 6,0)	3,0 (2,0; 9,0)	5,0 (4,0; 7,0)
уринаций	1,0 (0,0; 3,0)	1,0 (0,0; 3,0)	1,0 (0,0; 2,0)	1,0 (0,0; 2,0)
болюсов дефекаций	3,0 (2,0; 4,0)	3,0 (2,0; 5,0)	2,0 (1,0; 4,0)	3,0 (0,0; 5,0)

Примечание. Статистически значимые различия при сравнении:

* — самцов и самок (t -тест; $p < 0,05$); ** — двух видов света (t -тест; $p < 0,05$).

ности) или генетически гетерогенными животными (аутбредные). В эксперимент отбираются животные по возрасту, могут встречаться активные и пассивные типы поведения. Сона Смбатовна Арутюнян в своем докладе «Стандартизация теста "открытое поле"» представила результаты работы по стандартизации теста (табл. 6).

Рассчитанные коэффициенты вариации при стандартизированных условиях подтверждают биологическую вариативность, степень которой следует учитывать при планировании, проведении тестов и интерпретации результатов.

Остается актуальным вопрос стандартизации и воспроизводимости экспериментальных данных, полученных с помощью поведенческих методик анализа, так как единых требований по валидации физиологических методик не существует. Поскольку имеется значительное количество факторов, влияющих на поведение, создать одинаковые условия в каждой лаборатории практически невозможно. Биологическую вариативность — это нормальное явление — для снижения разброса данных исследователям остается учитывать все возможные факторы, тщательно документировать экспериментальный процесс и создавать подробные стандарт-

ные протоколы тестов, при этом каждый тест требует стандартизации в конкретных условиях и под конкретную задачу.

Использование методов прижизненной визуализации

Медицинские технологии, такие как компьютерная томография (КТ) и магнитно-резонансная томография (МРТ), ультразвуковое исследование (УЗИ), получение биоптатов у крупных животных вместе с методами визуализации, характерными для биологии, могут помочь в уменьшении количества используемых животных, а также улучшить качество их жизни. Сегодня наблюдается тенденция к объединению всех доступных методов вместе на одном и том же животном, что увеличивает объем информации, которую мы получаем от объекта.

Мария Сергеевна Истомина, младший научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России в своем докладе «Флуоресцентная визуализация в современных экспериментальных исследованиях» рассказала, что основными преимуществами оптических методов визуализации являются: высокая чувствительность и разрешающая способность; возможность мультиплексирования и применения многоканальной визуализации; исследование процессов *in vivo* в режиме реального времени с использованием неинвазивных методов; количественный анализ флуоресцентных и люминесцентных сигналов. Принципиальная схема системы визуализации отражена на рис. 2.

Сравнивая флуоресцентные и биолюминесцентные методы визуализации, лектор среди преимуществ флуоресцентной визуализации отметила:

- а) исследование динамики биораспределения в течение длительного времени;
- б) высокую яркость сигнала;
- в) возможность применения разных флуоресцентных меток в рамках одного исследования;
- г) возможность применения модифицированных клеток, экспрессирующих флуоресцентные белки-репортеры, без применения инвазивных манипуляций

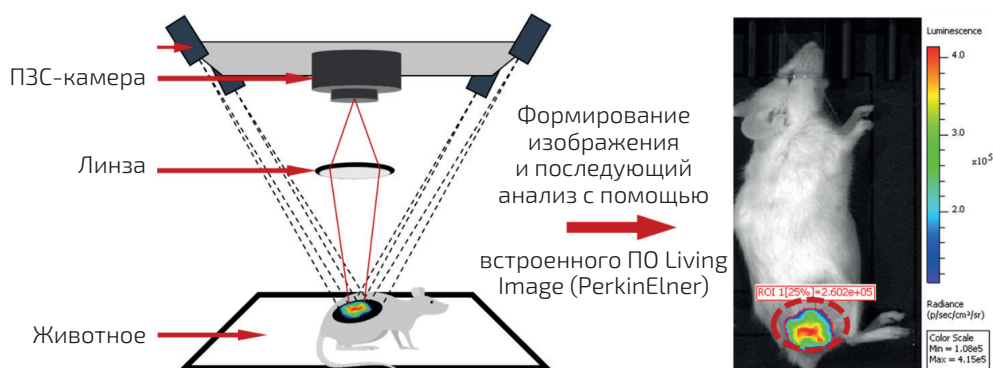


Рис. 2. Основные принципы визуализации

непосредственно перед визуализацией. Недостатками метода оптической визуализации *in vivo* являются следующие аспекты. Во-первых, наблюдается низкая чувствительность из-за присутствия автофлуоресценции ткани животных и фонового шума. Однако в этой области были предприняты шаги для решения данной проблемы. Руководитель компании «Ин Виво Технологии» Сергей Евгеньевич Чалов поделился личным опытом. В докладе «Разработка полусинтетического комбикорма для лабораторных животных (мыши, крысы) и возможность применения в технологии оптической визуализации *in vivo*» представлены приемы снижения автофлуоресценции животных путем использования специальных кормов. Во-вторых, еще одной сложностью данного метода является необходимость проведения предварительной подготовки и химического синтеза материалов для создания структуры носитель—флуоресцентная метка. Это может добавить временные и ресурсные затраты к процессу, что также нуждается в учете при планировании и проведении оптической визуализации *in vivo*.

Преимущества биOLUMИнесцентной визуализации:

- а) высокая чувствительность;
- б) отсутствие токсического эффекта;
- в) низкий уровень автофлуоресценции.

Недостаток метода — требуется введение субстрата перед визуализацией.

Сдерживающий фактор автофлуоресценции ткани — это спонтанное излучение света определенной длины волны со стороны органических компонентов тканей. М.С. Истомина рассказала о методах воздействия на автофлуоресценцию ткани, среди них выделив следующие методы:

- 1) применение спектрального разделения сигналов;
- 2) использование красителей/квантовых точек в окне прозрачности биотканей;
- 3) подбор животных/удаление шерсти для наилучшей визуализации.

Кроме того, лектор предлагает совмещение флуоресцентной визуализации и КТ/МРТ.

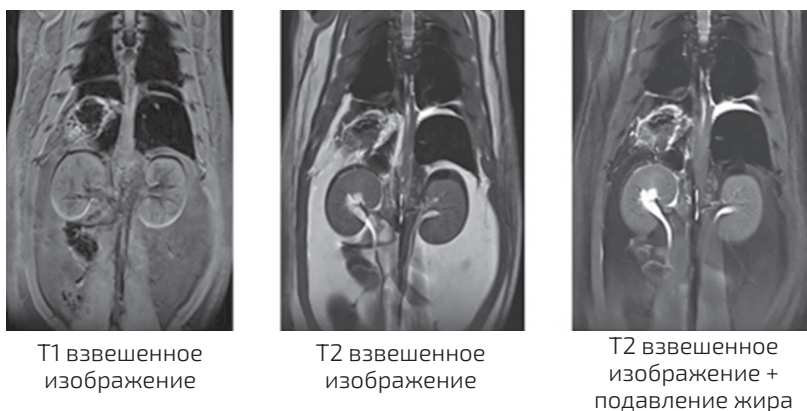
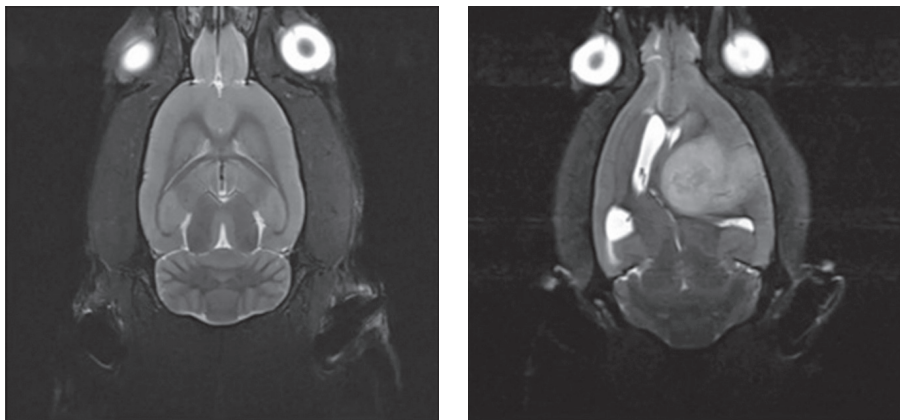


Рис. 3. Мониторинг состояния внутренних органов крысы



Мозг крысы в норме

Мозг крысы с экспериментальной глиомой С6

Рис. 4. Новообразование головного мозга

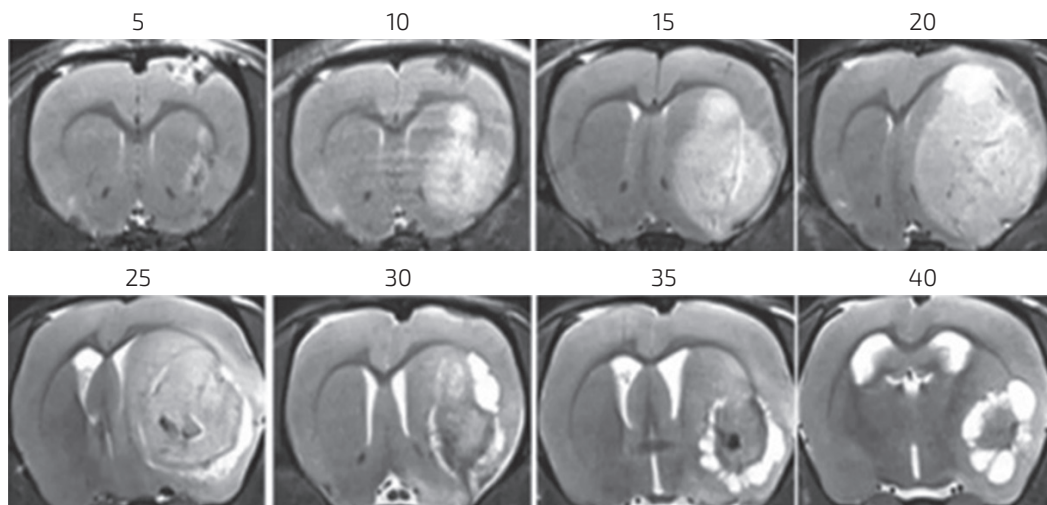


Рис. 5. Опухоль головного мозга в динамике. Цифры — дни проведения исследования на одном животном

Максим Артемович Абакумов, доцент ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России призвал рационально использовать МРТ и КТ, учитывая стоимость работы с использованием данных методик. Переходя к своему докладу [«Магнитно-резонансная томография и оптическая визуализация в доклинических исследованиях»](#), спикер привел примеры изображений, которые можно получить с помощью этих методов (рис. 3–5).

Спикер отметил среди преимуществ МРТ сердца возможность измерения толщины стенок желудочков, измерение объемов желудочков, определение фракции

выброса и ее планиметрического аналога. Кроме того, автор затронул темы люминесценции, флуоресценции и компьютерной томографии.

Таким образом, исследования фармакологической безопасности являются неотъемлемой частью при оценке безопасности лекарственных средств. Сегодня обязательными элементами является оценка влияния препарата на центральную нервную, сердечно-сосудистую и дыхательную системы. Однако, как показывает опыт, подробное изучение других органов и систем в большей степени способно защитить человека от побочных эффектов лекарственных препаратов.

Тесты по фармакологической безопасности хорошо разработаны для традиционно используемых в лабораториях мелких грызунов и существенно меньше для крупных лабораторных животных, что требует более широкого привлечения к доклиническим исследованиям ветеринарных специалистов.

Использование прижизненной визуализации в доклинических исследованиях, как было продемонстрировано на конференции, хотя сегодня и представлено дорогостоящими методами, однако способно дать информацию о патологическом/токсикологическом процессе с использованием меньшего количества животных, но с более высокой кратностью наблюдения и точностью.

Многие задачи фармакологической безопасности и прижизненной визуализации могут быть оценены только на животных, находящихся под наркозом. Поэтому вопросы анестезии и аналгезии лабораторных животных являются зачастую ключевыми при проведении исследований.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andreev A., Ahremenko E., Apushkin D. et al. New Approaches to Studying Rodent Behavior Using Deep Machine Learning // *Advances in Digital Science: ICADS 2021*. Springer International Publishing, 2021. P. 365–374.
2. Bale T.L., Abel T., Akil H. et al. The critical importance of basic animal research for neuropsychiatric disorders // *Neuropsychopharmacology*. 2019. Vol. 44. N. 8. P. 1349–1353. DOI: [10.1038/s41386-019-0405-9](https://doi.org/10.1038/s41386-019-0405-9).
3. Costa L.G., Aschner M., Vitalone A. et al. Developmental neuropathology of environmental agents // *Annu.Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2004. Vol. 44. P. 87–110.
4. d'Isa R., Gerlai R. Designing animal-friendly behavioral tests for neuroscience research: The importance of an ethological approach // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2023. Vol. 16. P. 1090248.
5. Drug Information официальный сайт. США. URL: <https://www.drugs.com/> (дата обращения: 04.08.2023).
6. Ellenbroek B., Youn J. Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? // *Disease models & mechanisms*. 2016. Vol. 9. N. 10. P. 1079–1087.
7. Genzel L. How to Control Behavioral Studies for Rodents — Don't Project Human Thoughts onto Them // *Eneuro*. 2021. Vol. 8. N. 1.
8. Karle A.C., Wrobel M.B., Koepke S. et al. Anti-brolucizumab immune response as one prerequisite for rare retinal vasculitis/retinal vascular occlusion adverse events // *Science Translational Medicine*. 2023. Vol. 15. N. 681. DOI: [10.1126/scitranslmed.abq5241](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abq5241).

9. Lezak K.R., Missig G., Carlezon Jr.W. A. Behavioral methods to study anxiety in rodents // *Dialogues in clinical neuroscience*. 2022.
10. Saré R.M., Lemons A., Smith C.B. Behavior testing in rodents: highlighting potential confounds affecting variability and reproducibility // *Brain sciences*. 2021. Vol. 11. N. 4. P. 522.
11. Sousa N., Almeida O.F.X., Wotjak C.T. A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents // *Genes, Brain and Behavior*. 2006. Vol. 5. P. 5–24.
12. van der Staay F.J., Arndt S.S., Nordquist R.E. Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders // *Behavioral and Brain Functions*. 2009. Vol. 5. P. 1–23.
13. von Ziegler L., Sturman O., Bohacek J. Big behavior: challenges and opportunities in a new era of deep behavior profiling // *Neuropsychopharmacology*. 2021. Vol. 46. N. 1. P. 33–44.
14. Wahlsten D. *Mouse behavioral testing: how to use mice in behavioral neuroscience*. Academic Press, 2010.
15. Whishaw I.Q., Haun F., Kolb B. *Analysis of behavior in laboratory rodents // Modern techniques in neuroscience research*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1999. P. 1243–1275.
16. Енгальчева Г.Н., Сюбаев Р.Д., Горячев Д.В. Исследования фармакологической безопасности лекарственных средств: экспертная оценка полученных результатов // *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2017. Т. 7. № 2. С. 92–97.
17. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., Васильев А.Н. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Москва: Гриф и К, 2012. 944 с.
18. Остроумова О.Д. и др. Лекарственно-индуцированная токсическая оптическая невропатия // *Вестник офтальмологии*. 2020. Т. 136. № 4. С. 156–164. DOI: [10.17116/oftalma2020136041156](https://doi.org/10.17116/oftalma2020136041156).
19. Постников С.С. и др. Нейротоксичность лекарств // *Качественная клиническая практика*. 2017. № 4. С. 68–72.

Организация ветеринарного обеспечения и «культуры ухода» для лабораторных животных

<https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-2-8-s9>

М.А. Акимова¹, Е.В. Бикчурина¹, В.Г. Макаров¹, В.С. Попов², Я.Г. Торопова³

¹ АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»,

³ ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России

Постоянно осуществляемые программы разведения лабораторных животных и их ветеринарного обеспечения составляют основу, позволяющую проводить достоверные научные исследования. Для надлежащего жизнеобеспечения лабораторных животных персонал, осуществляющий уход, должен быть ответственным, обученным, а также внимательным к проведению процедур и благополучию животных.

Однако отрасль лабораторного животноводства как в России, так и за рубежом, испытывает серьезную нехватку подготовленных ветеринарных врачей, зоотехников, лаборантов-исследователей и зоолаборантов (Franco N. H., Kerton A., Lewis D.I., 2023). Имеющиеся программы современной ветеринарии и зоотехнии в России не предусматривают обучение работе с лабораторными животными, что в свою очередь отражается на эффективности деятельности вновь привлеченных сотрудников. По данным статистики, эффективность нового сотрудника в любой отрасли составляет не более 30%.

В своем докладе Javier Guillén, старший директор по Европе и Латинской Америке, AAALAC International, отмечал, что различия в образовательной базе сотрудников приводят к снижению вовлеченности персонала в рабочие процессы, так как низкоквалифицированный персонал не понимает сути производимой работы, целей организации и ценности проводимого исследования. Для вспомогательного персонала чаще всего боль и страдания животных в условиях эксперимента — необоснованная жестокость.

Javier Guillén предлагает еще на этапе введения в работу нового сотрудника рассказывать о подходе организации к использованию животных в исследованиях и ознакомить с концепцией «культуры заботы», которая описывает ожидаемое поведение в этой среде. Четко разграничивать роли и обязанности всех участни-

ков ухода за животными. Руководители на участках должны являться образцом для подражания в вопросах надзора и культуры заботы. Всем сотрудникам необходимо понимать личную ответственность за свою работу, в том числе когда что-то идет не так, как планировалось.

В своем докладе «**Преимственность и развитие экспериментальных знаний и навыков в испытательном центре**» научный руководитель АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», доктор медицинских наук, профессор Валерий Геннадьевич Макаров рассказал об опыте работы с персоналом. Лектор отметил, что для подготовки квалифицированного персонала в области доклинических исследований требуется от 9 до 18 мес. Ключевыми сдерживающими факторами в развитии персонала лектор обозначил этические аспекты, различный базовый уровень образования.

Методом решения, который может улучшить эффективность и качество работы вновь принятого сотрудника, является грамотно составленная программа по подбору и адаптации персонала. Данная программа может включать несколько этапов.

Первый этап — подбор персонала. С момента создания новой должности в организации и до закрытия вакансии как внутренним кадровым резервом, так и внешним, первостепенным будет создание адекватного профиля должности. Профиль должности должен быть ясно отражен не только в должностной инструкции, но и в карточке вакансии на соответствующих ресурсах. Именно корректность профиля вакансии дает понимание кандидату, что его ждет, и чего ожидают от него на новом месте работы.

Разработка должностной инструкции трудоемкий и крайне важный процесс. На предприятиях с иной спецификой работы опорой является профессиональный стандарт и единый тарифно-квалификационный справочник. Для сферы доклинических исследований метод составления должностной инструкции, основанный на профессиональных стандартах, неэффективен. Здесь единственно верным решением будет составление должностных инструкций проектной группой, состоящей из специалиста научного профиля с высокими административными навыками и специалиста по персоналу, имеющему должное понимание о специфике работы организации. Также при необходимости в группу допустимо включение руководителя структурного подразделения, однако данное условие не обязательно. Именно при построении работы подобным образом результатом деятельности группы будут корректные должностные инструкции, отражающие и профессиональные требования к кандидату, и личные качества соискателей.

Второй этап — отбор персонала. Среди всех откликов на появившуюся вакансию необходимо отобрать тех, кто наиболее точно попадает под профиль должности. На данном этапе необходимо понимать, какие дополнительные ограничения, возможно, накладываются на кандидатов, которых не стоит допускать до собеседования. Для работодателя становится очевидным, какой контингент наиболее заинтересован в данной вакансии, что в дальнейшем поможет скорректировать профиль должности для получения откликов необходимого уровня.

Третий этап — оценка персонала. В любой организации должна быть разработана строгая методика оценки персонала, которая отображает, какие тестирования проводятся и каких результатов по каждому тестированию стоит ждать от сотрудника на той или иной должности. Оценка должна быть нацелена на профессиональ-

ные компетенции, личные качества, создание психологического портрета сотрудника, определение типа его мотивации и т.д.

Для каждого соискателя на конкретную должность разрабатывается свой метод оценки. Интерпретацией результатов должен заниматься сотрудник, имеющий достаточное количество знаний в данной области.

Кроме оценки профессиональных качеств, существенное значение имеют мотивации и личностные качества кандидата вакансии. Разработано большое количество теорий для оценки персонала с помощью самых разнообразных методик, стандартизированных тестов и способов статистической обработки полученных данных. Для работы с этими методиками необходим специалист по работе с персоналом. В его компетенции входят выбор подходящих для отрасли методов, разработка подходов проведения, статистическая обработка и анализ результатов, кроме того, установление референсных значений для каждой должности, структурного подразделения и организации в целом.

Одним из возможных инструментов может являться тест оценки мотивации Герчикова, который состоит из 23 проективных вопросов. Данный метод выделяет 5 типов трудовой мотивации.

- Инструментальный — работа не является для такого работника сколько-нибудь значимой ценностью и рассматривается только как источник заработка и других благ, получаемых в качестве вознаграждения за труд.
- Профессиональный — работник этого типа ценит в работе ее содержание, возможность проявить себя и доказать (не только окружающим, но и себе), что он может справиться с трудным заданием, которое не каждому по силам.
- Патриотический — работников этого типа интересует участие в реализации общего, очень важного для организации дела. Им свойственна убежденность в своей нужности для организации, готовность взвалить на себя дополнительную ответственность ради достижения результатов общего дела.
- Хозяйский — работник с таким типом мотивации будет выполнять свою работу с максимальной отдачей, не настаивая на ее особой интересности или высокой оплате, не требуя ни дополнительных указаний, ни постоянного контроля.
- Люмпенизированный — работник этого типа обладает очень слабой мотивацией к эффективной работе.

Тест Герчикова позволяет определить, к какому типу трудовой мотивации относится работник, и сделать выводы о применимости различных методов воздействия в отношении конкретного человека.

Как правило, результатом оценки сотрудника является распределение типов мотивации в процентном соотношении. Чаще всего полученные результаты показывают, что сотрудник относится к нескольким видам трудовой мотивации, но не стоит исключать и других возможных результатов. Работодателю важно определить приемлемое процентное соотношение для каждой из должностей, например, в АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» были разработаны определенные референсные интервалы для сотрудников ветеринарной службы, вспомогательных служб и научного состава (табл. 1). Необходимо отметить, что данные значения применимы только для комплексной оценки структурного подразделения, например, участка

Таблица 1

Тип мотивации	Референсные значения				
	ИН	ПР	ПА	ХО	ЛЮ
<i>Для ветеринарной службы</i>					
Среднее значение, %:					
для руководителей и заместителей руководителя	15–25	20–40	20–35	10–20	0–15
для линейных сотрудников	20–35	20–35	15–30	5–15	5–15
<i>Для сотрудников вспомогательных служб и научного состава</i>					
Среднее значение, %:					
для руководителей и заместителей руководителя	15–30	25–40	20–35	10–20	0–15
для линейных сотрудников	20–40	20–40%	15–30	5–15	5–15

Примечание. ИН — инструментальный; ПР — профессиональный; ПА — патриотический; ХО — хозяйский; ЛЮ — люмпенизированный.

ветеринарной службы, где все сотрудники находятся в подчинении одного линейного руководителя.

В случае если полученные результаты сотрудника не соответствуют установленным референсным значениям его должности, то необходимо спустя некоторое время провести повторное тестирование. Это связано с тем, что на результат могут повлиять не только профессиональные качества, но и личные обстоятельства, настроение, а также наличие конфликтных ситуаций с коллегами.

Четвертый этап — адаптация и наставничество. В лекции Валерия Геннадьевича Макарова подчеркнуто, что крайне важно, чтобы «золотое зерно» — персонал, который годами нарабатывал технику и методики, передавал знания из уст в уста и с рук на руки. Именно преемственность навыков ведет к их совершенствованию, а также сохранению стабильного качества совершаемых манипуляций, а значит и к повышению достоверности исследования. Грамотная система адаптации позволяет сохранить сотрудников, только пришедших в организацию. Отсутствие обучения основным навыкам работы ведет к дезадаптации сотрудников, поэтому рекомендуется уделять им достаточное внимание в первые месяцы работы.

Система адаптации, наставничества, обучения персонала идет на пользу не только организации, которая получает хорошо обученного сотрудника, но и может гарантировать ему профессиональный рост.

Еще одним из важных аспектов является налаживание коммуникации между учеными и персоналом по обслуживанию животных.

Линейный руководитель и/или БЭК/КБЖ (биоэтическая комиссия/комиссия по благополучию животных) играют роль в содействии двустороннему взаимодействию ученых, зоотехников и обслуживающего персонала. Это может включать обеспечение процессов до начала отдельных исследований, когда ожидаются об-

суждение и передача информации между учеными и зоотехником или персоналом по уходу. Повышение осведомленности о том, почему это важно, имеет решающее значение для успеха в определении преимуществ привлечения техников и персонала по уходу за животными для проведения высококачественных исследований как с научной точки зрения, так и с точки зрения благосостояния. Роль ветеринарного врача, зоотехника, лаборанта-исследователя или зоолаборанта не должна восприниматься как работа, при которой выполняются задачи без полного понимания целей и личного вклада каждого (Robinson S. и соавт., 2020).

Встречи перед началом исследования позволяют всем, кто участвует в нем, понять цели, задать вопросы и поделиться опытом. Технический персонал вивария может поднимать любые вопросы, которые могут относиться к процедурам или проведению исследования до начала исследования. Такой подход вовлекает технических специалистов и дает им дополнительную возможность понять цель своей деятельности. Кроме того, двусторонний диалог между техническим персоналом вивария и учеными обеспечивает механизм для повышения качества научных исследований и решения проблем благополучия животных до начала исследования. В свою очередь встречи после исследования дают возможность ученым поделиться результатами, а техническому персоналу полностью понять роль, которую они сыграли. Кроме того, это дает обеим сторонам возможность поделиться знаниями и улучшениями (например, 3Rs).

Сотрудники должны получать признание за добросовестное отношение к своим повседневным задачам и чуткое отношение к животным. Этот тип признания помогает укрепить позитивное поведение и отношение.

Обучение персонала

Подготовка кадров является полностью зоной ответственности руководителей доклинических центров, которые на сегодняшний день вынуждены самостоятельно не только разрабатывать программы обучения для своих специалистов, но и определять необходимый уровень их квалификации (Макаров В.Г. и Шестаков В.Н., 2021).

Одним из важных аспектов успешного этапа становления сотрудника как специалиста является обучение профессиональным навыкам и идеологии компании. Однако стоит отметить, что не все документы должны быть изучены каждым из сотрудников. Одни стандартные операционные процедуры (СОП) будут актуальны только для лаборантов-исследователей, а другие — для офисных работников.

Для формирования единых подходов к обучению профессиональным навыкам и идеологии компании В.Г. Макаров предложил обобщенную таблицу документооборота, с которым должен быть хорошо знаком персонал, исходя из должности, данные представлены в табл. 2.

Из данных табл. 2 видно, что обучение документам уровня 1 и 2, которые включают политики, руководства и положения, важно проводить для всех сотрудников организации, тогда как обучение документам уровня 3 проводят, в зависимости от должности.

Таблица 2

Уровень документации		
Уровень документов	Примеры	Кто должен быть обучен
Базовый (устав, разрешающие документы, лицензии и др.)	Внешние документы — неизменяемые, могут нуждаться в подтверждении, обновлении. Ветеринарное удостоверение (ежегодно)	Руководство
Уровень 1 — политики	Определяют корпоративную политику: — в области качества; — в области охраны труда; — по использованию лабораторных животных и др.	Все сотрудники
Уровень 2 — руководства, положения	Структурируют определенную область деятельности, детализируют политики: — положения о подразделениях; — положение о прохождении испытательного срока; — правила внутреннего трудового распорядка; — руководство по благополучию животных; — руководство по качеству и т.д.	То же
Уровень 3 — паспорта процессов, инструкции, СОП, стандартные методики, прописи	Детальное описание процедуры, манипуляции	В зависимости от должности. Необходимость обучения определяется должностной инструкцией
Уровень 4 — записи	Фиксация событий, манипуляций, результатов и т. п. Обычно это бланки в качестве приложений к документам уровня 3	

Важность обучения политикам организации в разных отраслях также отмечал в своем выступлении Javier Guillén, старший директор по Европе и Латинской Америке, AAALAC International. Только так можно донести до персонала, задействованного в уходе за лабораторными животными, высокую ценность проводимых исследований и обоснованность страданий животных.

В качестве примера можно привести «политики по использованию лабораторных животных», находящиеся в свободном доступе сети Интернета:

- филиала ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (<https://spf-animals.ru/about/animals/>);

- ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук» (<http://fncbst.ru/wp-content/uploads/2019/10/Политика-научного-центра.pdf>);
- АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (<https://doclinika.ru/wp-content/uploads/2020/01/Politika-po-ispol-zovaniya-laboratory-h-zhivotny-h.pdf>);
- ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова» (https://www.vniimp.ru/netcat_files/userfiles/Dokument_2.pdf);
- ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (https://rsmu.ru/fileadmin/templates/DOC/Vivarium/Univer_politika_raboty_s_lab_zhivotnymi.pdf).

Отдельно стоит отметить обучение сотрудников санитарным нормам, поскольку работа с лабораторными животными связана с различными рисками.

При обучении персонала способам применения средств индивидуальной защиты (СИЗ) важно дать понимание, каким путем передаются инфекции, и какие СИЗ могут помочь снизить риск заражения. Как показал опыт, после проведения данного обучения количество нарушений, связанных с отказом или неправильным ношением СИЗ, значительно уменьшается.

Также количество таких нарушений можно снизить, обеспечивая сотрудников более качественными, новыми, современными, удобными и легкими в применении СИЗ. По статистике, сотрудники, получающие СИЗ с минимальным износом, по окончании испытательного срока остаются на своем рабочем месте с вероятностью около 80%, в то время как получившие СИЗ с износом более 15%, покидали его после окончания испытательного срока в 50–60% случаев.

На территории РФ мы сталкиваемся с законодательным требованием проводить оценку профессиональных рисков (ОПР) всех рабочих мест. Тут, к сожалению, само понятие «отрасль доклинических исследований и испытательных центров» крайне размыто, и те требования, которые предъявляются к ОПР, не могут в полной мере объяснить необходимость в отражении специфики отрасли.

На помощь может прийти разработка внутренних инструкций, дополняющих ОПР. Например, вопрос с информированием сотрудников о риске заражения антропозоонозными инфекциями можно решить, включив памятку о возможных патогенах в соответствующий нормативный документ. Каждый сотрудник при трудоустройстве знакомится с памяткой по вакцинации, где указаны наиболее распространенные антропозоонозные инфекции, их пути передачи, а также график вакцинации.

Испытательный центр должен разработать методы, которые позволят оценить знания, навыки и поведение, позволяющие понять элементы отношения к уходу за животными и ЗР. Например, эксперты по качеству могут наблюдать за тем, как обращаются с животными во время манипуляции, и спрашивать персонал, как они оценивают ЗР в процедуре, которую они выполняют. Этот процесс оценки понятен персоналу и используется для всех новых тренингов и повторной оценки. Ожидается, что все сотрудники, работающие с животными, будут регулярно повышать квалификацию, а в графике их работы будет предусмотрено время для этого. Записи обучения протоколируются и хранятся у линейного руководства или служб-

бы качества. Учреждение должно активно предоставлять ресурсы для повышения квалификации, например, проводить обзоры литературы, вебинары, приглашать докладчиков, обеспечивать постерами.

В организации должна существовать культура обучения, постоянного совершенствования и механизмов выражения опасений (персоналу должно быть известно, что любой, кто сообщит о проблемах, получит поддержку со стороны руководства и не будет подвергнут репрессиям).

Крайне важно на этапе обучения персонала внедрять культуру заботы о лабораторных животных, чтобы сотрудники понимали, что использование лабораторных животных — это не право, а в первую очередь привилегия. Javier Guillén в своей лекции напомнил слушателям, что Директива 2010/63/ЕС регламентирует законодательную необходимость поддержания надлежащего климата заботы или культуры заботы среди персонала, связанного с использованием лабораторных животных.

Термин «культура заботы» в контексте использования животных в научных исследованиях описывает стратегию организации, которая оказывает поддержку всему персоналу в стремлении к постоянному совершенствованию и реализации следующих принципов:

- уход за животными и их благополучие;
- забота и благополучие персонала, участвующего в программе ухода за животными и их использования;
- научное качество;
- открытость и прозрачность.

Javier Guillén отметил, что нет культуры заботы за животными без культуры заботы о персонале. В учреждении непосредственный руководитель должен поддерживать и развивать механизмы, демонстрирующие заботу и приверженность персоналу, который работает с животными и ухаживает за ними. Проведение процедур и уход за животными должны быть подтверждены компетенцией и опытом, которые являются необходимым условием для хорошей науки.

Заместитель директора Института экспериментальной медицины по научной работе ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России Яна Геннадьевна Торопова в своем докладе «Лабораторные животные для решения образовательных задач — за и против» сообщила, что согласно имеющимся данным, ежегодно в мире используют от 200 000 до 1 600 000 животных с обучающей целью, что составляет от 2 до 10% животных, используемых в научных и образовательных целях в США, Японии, Китае, странах ЕС и Австралии. Лектор отметила, что статистических данных по использованию лабораторных животных в научных и образовательных целях в России нет. Среди альтернативных методов обучения персонала Я.Г. Торопова отметила высокую эффективность:

- моделей манекенов и механических тренажеров;
- компьютерных и виртуальных стимуляций;
- использование трупов животных, полученных с соблюдением биоэтических норм.

Лектор озвучила сдерживающие факторы полного перехода на альтернативные способы обучения:

- отсутствие осведомленности о гуманных методах обучения;

- представление о том, что гуманные методы не столь эффективны для достижения намеченных результатов обучения;
- инерция научного сообщества — нежелание пересматривать имеющиеся практики;
- 3Rs (и сам принцип замещения) — парадигма, в которой эксперименты на животных являются «золотым стандартом», то есть отправной точкой любого исследования;
- отсутствие обмена данными между учреждениями, реализующими образовательные задачи;
- «давление публикаций»;
- отсутствие регламентирующих документов.

Несмотря на то что в настоящее время существует множество доступных гуманных методов обучения, использование животных в образовании и обучении по-прежнему широко распространено. Я.Г. Торопова привела в пример работу М.А. Zemanova (2021), где при анализе 50 исследований было установлено, что в 90% исследований гуманные методы обучения были такими же или даже более эффективными, чем методы с использованием животных (Zemanova M.A., 2021).

Кто и как определяет в организации — кого чему учить? Еще один важный вопрос, которого касался Javier Guillén в своем выступлении. Этот вопрос должен решать линейный руководитель или ответственный по качеству структурного подразделения. Фактически он заинтересован в этом напрямую, поскольку, распределяя задания среди персонала, руководитель должен быть уверен, что сотрудник выполнит задачу верно, и в конечном счете определит, насколько подразделение будет успешно и своевременно решать поставленные перед ним задачи.

Несмотря на наличие опыта и обучения у персонала, мы не можем полностью исключить ошибки, но можем их минимизировать. Так, в своем докладе Владимир Сергеевич Попов, заведующий лабораторией факультета фундаментальной медицины, кандидат биологических наук, доцент ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» в своем докладе [«Оптимизация рутинных исследовательских задач в виварии»](#) выделил 5 основных правил, которые применяет на базе своей лаборатории.

Правило 1. Заполнение чек-листов в процессе выполнения процедур. Под чек-листами докладчик подразумевает первичную документацию. Лектор отметил, что хорошо вносить записи максимально подробно, например, ставить не только галочку о выполнении, но и вписывать в протокол дополнительные данные (например, информацию с пробирок).

Правило 2. Брифинг и дебрифинг. Лектор обратил внимание слушателей на то, что важно их проводить даже для простой рутинной работы. На брифинге обсуждаются распределение ролей, порядок действий, перечень отбираемых образцов, и главное — планируемые риски и план действий на случай, если что-то пойдет не так. Владимир Сергеевич отметил, что наиболее часто допускаются ошибки на простых манипуляциях, которые выполняются ежедневно и, кажется, доведены до автоматизма. На дебрифинге следует разбирать, что пошло не так, как это могло повредить полученным данным, и что необходимо изменить в будущем.

Правило 3. Работа вдвоем. Даже простые манипуляции лучше проводить вдвоем, так как это удобно и производится перекрестный контроль.

Таблица 3

Норма обслуживания животных на 1 сотрудника

Вид	Время на 1 клетку/бокс	Число клеток/боксов за рабочий день на 1 сотрудника	Среднее число голов на клетку/бокс	Всего животных за 1 рабочую смену на 1 сотрудника
Мыши	121 с	297	10	2970
Сирийские хомячки	91 с	395	3	1185
Песчанки	91 с	395	4	1580
Крысы	81 с	444	5	2220
Морские свинки	96 с	375	2	750
Хорьки	210 с	171	2	342
Кролики	240 с	150	1	150
Карликовые свиньи	79 мин	7	8	56
Кошки	70 мин	8	10	80
Собаки	90 мин	7	4	26
Обезьяны	78 мин	8	4	30

Правило 4. Проговаривать вслух каждый шаг. Первым произносит вслух тот, кто проводит манипуляцию, помощник подтверждает правильность выполнения.

Правило 5. Хороший/плохой. Персонал лучше условно разделить на тех, кто проводит с животными нестрессовые процедуры, такие как кормление, поение, хендлинг, и персонал, который выполняет стрессорирующие процедуры, такие как фиксация, инъекция, взятие крови. Спикер говорит о том, что это должны быть два разных человека.

На работоспособность персонала также влияет равномерное распределение работы. Для этого требуется понимать нормы обслуживания лабораторных животных. В работе М.А. Акимовой и соавт. (2023) приведены нормы обслуживания животных зоолаборантом в зависимости от вида животного (табл. 3).

Отмечается важность проведения тайм-менеджмента, что позволяет планировать количество зоолаборантов и норму выработки в зависимости от вида и количества обслуживаемых животных. Следует учитывать условия труда, такие как тип содержания (клетка, вольер, бокс и т.д.), использование средств малой механизации труда, особенности кормления, среды обогащения и прочие нюансы.

Javier Guillén предложил оценивать «культуру заботы» в организации по таким показателям, как:

- численность персонала, соответствующая размеру организации, типу работы и виду животных;

- низкая текучесть кадров и минимальная потребность в подборе нового персонала для «заполнения пробелов»;
- персонал имеет достаточно времени и ресурсов для ежедневной адекватной рутинной работы;
- ветеринарный врач доступен, чтобы дать совет;
- лицо, ответственное за надзор, уход и благополучие животных, регулярно встречается с сотрудниками и знает об их работе;
- лицо, отвечающее за обеспечение доступа сотрудников к информации о видах животных, имеет достаточные ресурсы для этой роли;
- наличие коммуникаций между учеными и зоотехниками;
- четкая система сообщения о проблемах, поддерживаемая руководством;
- задокументированные записи об обучении;
- программа проверки и переоценки компетентности.

Подобные индикаторы можно объективно проверить и измерить. Такой подход должен обеспечить всесторонний комплексный анализ культуры заботы и того, как она развивается.

Организация ветеринарного обеспечения и культуры ухода за лабораторными животными — это командная работа. На создание достойной команды уходит много времени. Важными этапами являются подбор персонала и его адаптация на новом рабочем месте. Задача работодателя и прямого руководителя — обеспечить обучение, максимально комфортные условия труда и сопровождение во время всего периода работы. Осознание своей роли и места в команде для достижения основной цели помогает укрепить связь между работником и руководством и стать залогом долгосрочного сотрудничества.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Franco N.H., Kerton A., Lewis D.I. Education in laboratory animal science and the 3Rs // *Lab. Anim.* 2023. Vol. 57. N. 2. P. 109–111. DOI: [10.1177/00236772231162166](https://doi.org/10.1177/00236772231162166).
2. Robinson S., Sparrow S., Williams B. et al. The European Federation of the Pharmaceutical Industry and Associations' Research and Animal Welfare Group: Assessing and benchmarking "Culture of Care" in the context of using animals for scientific purpose // *Lab. Anim.* 2020. Vol. 54. N. 5. P. 421–432. DOI: [10.1177/0023677219887998](https://doi.org/10.1177/0023677219887998).
3. Zemanova M.A., Knight A. The Educational Efficacy of Humane Teaching Methods: A Systematic Review of the Evidence // *Animals (Basel)*. 2021. Vol. 11. N. 1. P. 114. DOI: [10.3390/ani11010114](https://doi.org/10.3390/ani11010114).
4. Консультант GLP-PLANET. Мнение фармацевтической отрасли: Монография / Под редакцией В.Г. Макарова, В.Н. Шестакова. Москва: Издательский дом «Русский врач», 2021. 168 с. DOI: [10.29296/978-5-7724-0177-4](https://doi.org/10.29296/978-5-7724-0177-4).

Подходы к организации этической экспертизы научно-исследовательских работ, выполняемых на лабораторных животных

<https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-2-8-s10>

Д.Ю. Акимов¹, Е.А. Кушнир^{2,3,4}, М.Л. Ловать^{2,3,4}, М.Н. Макарова¹, В.С. Попов^{3,4}

¹ АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,

² ООО «НИИ Митоинженерии МГУ»,

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

⁴ Ассоциация специалистов по лабораторным животным (Rus-LASA)

Законодательство в области работы с лабораторными животными

Вопросы нормативно-правового регулирования в области работы с лабораторными животными являются ключевыми для разработки биоэтических аспектов в био-медицинских исследованиях с использованием моделей *in vivo*.

Главным документом **Российской Федерации** в сфере взаимодействия с животными является Закон РФ от 14 мая 1993 г. № 4979-1 «О ветеринарии»¹. Закон регулирует отношения в области ветеринарии в целях защиты животных от болезней, выпуска безопасных в ветеринарном отношении продуктов животноводства и защиты населения от болезней, общих для человека и животных. Однако проблемы гуманного обращения с лабораторными животными в документе не рассмотрены.

В 2018 г. был принят Федеральный закон (ФЗ) «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации»². Однако уже в главе 1 дается строгое определение того, что положения настоящего ФЗ не применяются к сельскохозяйственным и лабораторным животным.

¹ Закон РФ от 14 мая 1993 г. № 4979-1 «О ветеринарии».

² ФЗ № 498 от 27 декабря 2018 г. «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации».

В функции ветеринарного врача на основании профессионального стандарта входят разработка плана проведения хирургической операции, включая выбор способа обезболивания, определение способа и доз для введения лекарственных препаратов в организм животных, выполнение обезболивания животных с использованием наркотических, нейролептических и местно-анестезирующих препаратов³.

Вопрос роли ветеринарного врача в хирургических манипуляциях более полно раскрыт в международных нормативах.

Нормативно-правовое регулирование **Австралии** в области использования лабораторных животных регламентирует Австралийский кодекс ухода за животными и их использования в научных целях⁴.

Кодекс регламентирует обеспечение благополучия животных в научных исследованиях, ветеринарный врач контролирует их состояние, при необходимости предпринимает соответствующие действия, обеспечивает надлежащее использование фармакологических и немедикаментозных средств для минимизации боли и дистресса, обеспечивает анестезию, обезболивание и седацию, а также устранение боли и дистресса.

Законодательная база **США** более сложна, и использование лабораторных животных регламентируется:

- Службой общественного здравоохранения (Public Health Service — PHS), а именно политикой PHS по гуманному уходу и использованию лабораторных животных⁵;
- Законом о расширении медицинских исследований, часть «Животные в исследованиях», раздел 495⁶;
- Управлением защиты лабораторных животных [The Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW), ранее Управление по защите от исследовательских рисков, отдел защиты животных];
- Руководством по уходу и использованию лабораторных животных⁷ (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals Eighth Edition);
- Принципами Правительства США по использованию и уходу за позвоночными животными, применяемыми в тестировании, исследованиях и обучении⁸ (U.S. Government Principles for the Utilization and Care of Vertebrate Animals Used in Testing, Research, and Training);
- Законом о защите животных;

³ Работник в области ветеринарии, рег. № 141, Приказ Минтруда и Соц. защиты РФ от 12 октября 2021 г. № 712н. URL: <https://docs.cntd.ru/document/726730439> (дата обращения: 07.2023).

⁴ Australian code for the care and use of animals for scientific purposes (2013). URL: https://www.nhmrc.gov.au/about-us/publications/australian-code-care-and-use-animals-scientific-purposes#toc_303 (дата обращения: 07.2023).

⁵ Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals (2015). URL: <https://olaw.nih.gov/policies-laws/phs-policy.htm> (дата обращения: 19.12. 2022).

⁶ States, U. (1985). Health Research Extension Act of 1985. Public Law 99–158. URL: <https://olaw.nih.gov/policies-laws/hrea-1985.htm> (дата обращения: 07.2023).

⁷ National Research Council et al. Guide for the care and use of laboratory animals. 2011.

⁸ Interagency Research Animal Committee et al. US government principles for the utilization and care of vertebrate animals used in testing, research and training. 2010.

- Руководством Американской ветеринарной медицинской ассоциации по эвтаназии животных (American Veterinary Medical Association, AVMA) (Underwood W. и соавт., 2020).

Ветеринарные врачи могут специализироваться в одной из нескольких ролей в крупных учреждениях или одновременно выполнять несколько ролей в небольших лабораториях. В числе прочего ветеринарный врач обеспечивает анестезиологические и/или хирургические услуги для исследователей.

Страны ЕС руководствуются Директивой 2010/63/ЕС⁹ с поправками, внесенными Регламентом (ЕС) 2019/1010.

В обязанности ветеринарного врача в странах ЕС входит обеспечение здоровья и благополучия животных, используемых для исследований. В том числе проведение карантина, мониторинга состояния здоровья, наблюдение за заболеваниями, диагностика, лечение, контроль заболеваний, хирургическое вмешательство, определение боли и дистресса, ведение медицинских записей, эвтаназия и/или другие клинические обязанности, перечисленные в качестве основных обязанностей ветеринара.

Законодательства в разных странах в отношении обеспечения свободы от боли и страданий лабораторных животных при использовании их в научных исследованиях в целом схожи. Однако подробное рассмотрение вопросов, связанных с определением степени тяжести, планируемой/выполняемой процедуры, выбором анестезирующих средств, доз применимых для разных видов/линий, возраста/массы животных подробно не рассматриваются, что создает потенциальные риски для благополучия животных в исследовании, а следовательно, и достоверности получаемых научных данных.

Можно заключить, что согласно международным нормативным документам, в штате каждой организации, занимающейся работой с лабораторными животными, должен быть ветеринарный врач. В зависимости от квалификации специалиста и целей организации трудовые функции ветеринара могут быть описаны несколькими пунктами.

1. Разработка и контроль выполнения превентивных мероприятий для всех видов животных, имеющих в организации (санитарно-гигиенические, лечебно-профилактические, противоэпизоотические, определение перечня контролируемых патогенов или составление программы по мониторингу здоровья животных, участие в формировании референсных значений вверенной ему популяции лабораторных животных и т.д.).
2. Проведение клинического осмотра, в случае выявления животных, испытывающих боль и мучения, назначение необходимых диагностических, лечебных, хирургических, ограничительных мероприятий или реализация гуманной конечной точки (эвтаназия животного).
3. Составление программ по благополучию животных; правил выполнения конкретных манипуляций и процедур, в том числе хирургических.
4. Участие в исследованиях. Непосредственное участие и выполнение процедур и/или контроль за состоянием животного или группы животных, например, при выполнении хирургических манипуляций.

⁹ EU Directive 2010/63/EU Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

5. Обучение и консультирование руководителей исследований и персонала, задействованного в проведении эксперимента.
6. Ветеринарный врач может быть назначен руководителем участка, на котором содержатся животные или проводятся эксперименты. В таком случае он руководит процессами на участке и управляет персоналом, при этом несет всю ответственность, связанную с жизнеобеспечением лабораторных животных, и наравне с руководителем исследований отвечает за достоверность данных.
7. Взаимодействие с надзорными органами, такими как Россельхознадзор, Ветеринарное управление, районные станции по борьбе с болезнями животных.
8. Участие в комиссии по оценке проектов, связанных с использованием лабораторных животных. Контроль соответствия фактической степени тяжести процедур заявленной и составление отчета с ретроспективной оценкой степени тяжести процедур, осуществлявшихся в ходе проектов.

Представленный список трудовых функций не является полным и может быть дополнен исходя из целей организации.

Состав биоэтической комиссии (БЭК)

В Австралии нормативно-правовая база в отношении лабораторных животных децентрализована, и каждый штат в значительной степени контролирует свою собственную политику (Whittaker A., 2014). Несмотря на это, все локальные законы основаны на Австралийском своде правил по уходу и использованию животных в научных целях¹⁰, который был принят в 1969 г., а последние поправки в него вносились в 2004 г. Биоэтическая комиссия состоит из председателя и других участников. Кодекс предлагает рассмотреть вопрос о назначении председателя, лица занимающего руководящую должность в учреждении. Кроме того, регламентирует как минимум наличие по одному человеку из четырех категорий:

- категория А — лицо с ветеринарной квалификацией, достаточной для регистрации в качестве ветеринарного хирурга в Австралии, имеющее опыт, соответствующий деятельности учреждения;
- категория В — лицо с соответствующей квалификацией, обладающее как значительным, так и небольшим опытом использования животных в научных целях, имеющее отношение к учреждению и деятельности организации;
- категория С — лицо с явной приверженностью делу улучшения благополучия животных и подтвержденным опытом, которое не работает в учреждении или иным образом не связано с ним;
- категория D — лицо, не работающее в учреждении или иным образом не связанное с ним, и которое никогда не участвовало в исследованиях с использованием животных.

Категории С и D должны вместе представлять не менее одной трети членов БЭК.

¹⁰ Australian code for the care and use of animals for scientific purposes. 2013. URL: https://www.nhmrc.gov.au/about-us/publications/australian-code-care-and-use-animals-scientific-purposes#toc__303 (дата обращения: 07.2023).

Страны ЕС

В статье 38, пункт 3 Директивы 2010/63/ЕС определены критерии для оценки проектов с использованием животных компетентными органами: «...В основе получения разрешения на реализацию проекта должна лежать всесторонняя его оценка, принимающая во внимание этические аспекты использования животных и гарантирующая выполнение принципа замещения, сокращения и усовершенствования в этих проектах...», однако не дается характеристика и численность состава БЭК.

Компетентный орган — это структура, назначенная государством-членом ЕС для выполнения обязательств, вытекающих из Директивы 2010/63/ЕС (Guillén J. и соавт., 2015). В европейских странах эту роль в основном выполняет Министерство сельского хозяйства и окружающей среды (Министерство внутренних дел в случае Правительства Великобритании), а иногда и Министерство здравоохранения, образования, науки и инноваций¹¹ (Silva S. и соавт., 2016). В некоторых странах ЕС эта ответственность разделена между двумя или более министерствами. Более того, согласно Директиве, каждое государство-член должно создать национальный комитет. В дополнение к этим центральным органам европейская политика действует на более локальном уровне через специальные структуры, назначенные компетентным органом для осуществления деятельности, направленной на оценку и утверждение проектов, а также на проверку и контроль деятельности учреждений, включая оценку компетентности, благополучия и процедур ухода за животными и общее соответствие принципам 3Rs. Что касается реализации проектов исследований, государства-члены должны обеспечить меры, при которых эксперименты на животных не могли проводиться без предварительного разрешения компетентного органа (Official Journal of the European Union Directive, 2010). Некоторые государства-члены, такие как Германия и Великобритания, возлагают ответственность за оценку проекта исследования на один и тот же компетентный орган; другие делегируют эту ответственность комитетам, которые могут быть национальными, региональными или местными. Для получения проектных разрешений исследователей просят заполнить заявку с предложениями и всеми элементами научной работы, включая сведения о 3Rs. Государства ЕС могут использовать общие шаблоны, такие как шаблон, разработанный во Франции Министерством науки (например, руководство по этической оценке проектов, связанных с использованием животных в научных целях) (Guillén J. и соавт., 2015). В государствах ЕС, где компетентный орган наблюдает за процессом утверждения проекта, часто требуется его предварительная оценка представителями исследовательского учреждения. Необходимо осуществлять надзорные функции и руководство по вопросам, связанным с благополучием животных и контролем за ежедневным применением принципов 3Rs в организации. Директива делегирует эту ответственность ряду сотрудников, которые в силу характера их задач вместе называются органом защиты животных (Official Journal of the European Union Directive, 2010).

¹¹ European Commission. Report from the Commission to the European Parliament and the Council on the Implementation of Directive 2010/63/EU on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes in the Member States of the European Union, 15 Final. European Commission; Brussels, Belgium. 2020.

Орган защиты животных (AWB Animal Welfare Body)

Одним из нововведений Директивы 2010/63/ЕС стало создание органов защиты животных (AWB) (Olsson I.A. S. и соавт., 2016). Деятельность AWB направлена на защиту лабораторных животных и обеспечение им наилучших условий жизни. В состав AWB должно входить как минимум лицо, ответственное за благополучие и уход за животными, а если пользователем животных является научно-исследовательский институт, эту функцию выполняет ученый; кроме того, участники AWB должны взаимодействовать с назначенным ветеринарным врачом. Такие структуры как AWB существуют по всему миру под разными названиями, например, Комитет по уходу за животными ACC — Animal Care Committee в Канаде (Griffin G., Locke P., 2016) или IACUC — Institutional Animal Care and Use Committees в США (Bayne K.A., Garnett N. L., 2008). Однако эти местные комитеты могут быть организованы по-разному и часто решают вопросы, связанные как с этической экспертизой предлагаемых исследований, так и со стандартами благополучия животных. Подводя итог, можно сказать, что AWB играют очень важную роль в обеспечении благополучия животных, с одной стороны, и качества в науке — с другой.

Отношения между AWB и БЭК

Согласно Директиве 2010/63/ЕС, ответственность за оценку проекта возложена не на AWB, а на БЭК. В ЕС функции AWB принадлежат Министерству сельского хозяйства и продовольствия, а функции этической экспертизы — Министерству науки. Более того, в то время как AWB находятся внутри организации, БЭК могут быть внутренними или внешними, если ее участники своевременно встречаются для оценки проектов. В состав AWB должно входить не менее двух членов, а в состав БЭК — не менее пяти, чтобы можно было выражать различные взгляды и находить оптимальные решения¹². Однако помимо этих различий в конфигурации, задачи AWB и БЭК часто могут быть схожими или пересекаться в зависимости от политики каждой страны. В то время как во Франции для оценки и одобрения проектов экспериментов назначаются только БЭК, в Испании AWB могут называться комитетами по этике экспериментов на животных и определяться как уполномоченные органы для оценки проектов.

Канадская система, в отличие от системы США, не имеет законодательства, непосредственно регулирующего уход за животными и их использование в исследованиях. Центральным элементом канадской системы является Канадский совет по уходу за животными, созданный для поддержки университетов и государственных ведомств, занимающихся наукой о животных (Griffin G., Locke P., 2016).

За исключением нескольких стран, Латинская Америка является регионом, в котором отсутствует правовая база или государственная инфраструктура для надзора за использованием исследовательских животных. Наиболее развитая политика существует в Бразилии, Мексике и Уругвае. В Бразилии действующий закон № 11.794

¹² French National Committee for Consideration of Ethics in Animal Experimentation National Charter on the Ethics of Animal Experimentation. 2008. URL: <https://enseignementsup-recherche.gouv.fr>.

был принят Федеральным указом № 6899 в 2009 г. Его выполнение обеспечивается Национальным советом по контролю над экспериментами на животных и основывается на руководствах и технических руководящих документах по использованию животных в обучении, исследованиях или тестировании. В Мексике в 1999 г. был принят закон NOM-062 «Технические спецификации по производству, уходу и использованию лабораторных животных». Он основан на международных документах, таких как «Руководство по уходу и использованию лабораторных животных» (Garber J.C. и соавт., 2011). В Уругвае закон № 18.611 регулирует использование животных в экспериментальной деятельности, обучении и научных исследованиях в сотрудничестве с Национальной комиссией по экспериментам на животных. В других странах были предприняты усилия по одобрению международных стандартов и принятию законов об использовании животных в тестировании и обучении (Rivera E. и соавт., 2016).

В Китае ответственность по надзору за использованием лабораторных животных возложена на Министерство науки и технологий, в то время как местные органы власти создают центральный, региональный и институциональный уровни контроля. В некоторых провинциях требуется дополнительное подразделение, которое занимается управлением лабораторными животными и проводит этическую проверку проектов. Те компании, у которых нет подобного подразделения, должны доверить управление проектами другим организациям (Gao L., 2020). Комитет по этике в Китае должен состоять как минимум из одного из следующих лиц: специалист по лабораторным животным, ветеринарный врач, персонал по управлению лабораторными животными, исследователь, использующий лабораторных животных, неспециалист. Члены Комитета по этике назначаются на срок от 3 до 5 лет (MacArthur Clark J.A., 2020).

В России не существует законодательных актов, которые регламентируют оценку этического отношения к лабораторным животным на этапе проектов исследования, а следовательно, нет требований к БЭК. Заинтересованные учреждения сами устанавливают требования к составу и регламенту работы БЭК.

На основании проведенного обзора требований к экспертизе проектов исследований на животных можно дать следующие рекомендации по численности и составу БЭК.

- Председатель. Данную функцию может выполнять руководитель ветеринарной службы или иное лицо из числа руководителей подразделений или научных групп.
- Независимый эксперт в области ветеринарии. Данную функцию может выполнять лицо не из числа сотрудников организации, а например, сотрудник ветеринарного управления, станции по борьбе с болезнями животных, ветеринарный врач клиники и т.д.
- Сотрудники организации, являющиеся экспертами в области здоровья и благополучия лабораторных животных (ветеринарные врачи, зоотехники, ветеринарные фельдшера и др.).
- Сотрудники организации, являющиеся специалистами в области доклинических исследований.
- Сотрудники организации, вовлеченные в исследования, но непосредственно не участвующие в работе с животными, например, патоморфологи, специалисты лабораторий, провизорской службы и т.д.

- Сотрудники организации, не имеющие отношения к научной работе организации, например, менеджер, бухгалтер, специалист по охране труда и т.д.
- Представитель общественности, неспециалист в области работы с животными.
- Лица, являющиеся специалистами в области альтернативных методов исследований.

Таким образом, оптимальная численность БЭК составляет не менее 8 экспертов из различных областей. В небольших учреждениях этой численности достичь сложно, и комиссии могут состоять из меньшего числа экспертов, в этом случае важно установить минимальную численность экспертов, присутствующих при экспертизе проектов исследований, и отсутствие конфликта интересов у членов БЭК. Кроме того, при налаживании процедуры оценки проектов исследований необходимо обеспечить автономность и независимость работы БЭК от коммерческих и научных интересов организации.

Этическая экспертиза проектов

Любой эксперимент с использованием животных должен предваряться оценкой (экспертизой) БЭК заявки на проведение исследования, поданной научно-исследовательским коллективом. От содержания этой заявки во многом зависят дальнейшая судьба животных, качество эксперимента, полнота и достоверность полученных данных, востребованность результатов, а также содержание итогового отчета. В РФ нет жестких требований к содержанию такой заявки.

Содержание заявки на эксперимент

1. Административная часть

- *Заголовок документа*, например, «Заявка на проведение экспертизы проекта исследования биоэтической комиссией», номер заявки и дата.
- Основанием к проведению исследования могут служить контракт, грант, дипломная, кандидатская или докторская работа.
- *Название исследования*. Должно соответствовать тематике гранта, научной работы или договора.
- *Инициатор исследования*. Организация или государственная структура, напрямую заинтересованная в выполнении работы и получении данных.
- *Исследовательское учреждение*. Название организации, в которой планируется выполнять исследование, должно совпадать с учреждением, при котором действует БЭК.
- *Руководитель исследования*. ФИО и иные данные лица, ответственного за предоставление итогов работы.
- *Испытательная площадка*. Для мультицентровых исследований следует указать название организации, где будет проходить часть работ, которые выполняются вне исследовательского учреждения.

- *Ведущий исследователь/ответственный исполнитель* — при выполнении мультицентровых исследований следует указать ответственное лицо из числа сотрудников испытательной площадки.

2. Биологическая часть (данные о животных и условиях содержания в ходе эксперимента)

- *Обоснование выбора животных*: вид/линия или сток/генетически модифицированные животные/пол, возраст, микробиологический статус.
- *Обоснование количества животных*: размер выборки, статистические методы оценки мощности выборки. Указывая количество, желательно выделить животных, которые будут подвергнуты процедурам, а также количество сентинел, используемых в качестве контроля микробиологического статуса, и резервных особей.
- *Условия содержания* (может быть вынесено в отдельную заявку). Необходимо указать все изменяемые параметры, отклоняющиеся от рекомендованных для данного вида.
- *Микроклимат*: будут ли условия соответствовать какому-то принятому стандарту или необходимы какие-либо изменения (например, повышение или снижение температуры).
- *Освещение*: будет ли оно стандартным или потребуется изменение интенсивности, спектра, цикла день/ночь, депривация сна и т.д.
- *Контролируется ли уровень шума* (включая ультразвук) и вибрации.
- *Кормление и поение*. Указать все изменения в режиме кормления, поения, применение специальных диет или растворов для поения. Если предполагается повышенная жажда у животных, требуется предоставить дополнительное поение. При необходимости лишения животных корма или воды по условиям эксперимента требуется указать его продолжительность. Должны быть предусмотрены действия, если в ответ на эти изменения животные будут демонстрировать признаки дистресса.
- Исходя из дизайна эксперимента, может потребоваться индивидуальное содержание, что требует отдельного обсуждения в рамках заседания БЭК, и должно быть обосновано в заявке на проект исследования.
- *Судьба животных по окончании исследования*. Для животных, подлежащих умерщвлению, необходимо указать запланированный метод эвтаназии и обосновать его. Если есть вероятность гибели животных в ходе исследования, следует указать критические признаки (критерии для гуманной конечной точки), при которых можно осуществить гуманную эвтаназию, заменив ею спонтанную смерть.
- Для животных, остающихся по окончании эксперимента в живых, указать их количество или примерный процент, а также сообщить, планируется ли их повторное использование. Если да, то при соблюдении каких условий. Возможна ли передача животного новым владельцам.
- Информация о квалификации сотрудников, задействованных в экспериментальных процедурах.

- Прохождение специализированного обучения (курсов) работе с лабораторными животными, подразумевающей базовые манипуляции с животными, а также непосредственно связанной с выполняемыми в исследовании процедурами.
- Указать опыт проведения процедур, наличие необходимых навыков и стаж. При необходимости предоставить информацию о приемах планируемого контроля за неопытными сотрудниками.

Предварительная оценка степени тяжести

Руководитель исследования должен указать в заявке на экспертизу проекта планируемую степень тяжести процедур (см. Приложение VIII к Директиве 2010/63/EU), которой будут подвергнуты животные в ходе всего исследования. Особый фокус внимания исследователей, планирующих болезненные экспериментальные процедуры, должен быть направлен на подробный анализ всех этапов работы с животными. При планировании всей последовательности манипуляций с животными должна быть оценена степень тяжести воздействия на животных (легкая, умеренная, тяжелая или без выхода из наркоза). При этом учитываются все возможные меры, минимизирующие боль, страдания и долговременные негативные эффекты, оказываемые на физическое и психическое здоровье животных. Оптимально заранее продумать алгоритм действий как для предотвращения негативных последствий экспериментальных манипуляций, так и на случай прочих возможных осложнений, влияющих на самочувствие животного. Отнесение различных видов воздействий на животных к категориям степени тяжести представлено в Директиве 2010/63/EU и научной литературе (Макарова М.Н., Ковалева М.А., 2022).

Оценка степени тяжести должна осуществляться на всех этапах исследования, в ходе которых проводятся манипуляции с животными, потенциально влияющие на его благополучие.

Описание каждого этапа должно включать как минимум следующую информацию: перечень вероятных нежелательных эффектов и упоминание факторов, которые могут еще больше усугубить состояние животных (возможная степень тяжести и ее причины).

1. Методы и конкретные меры, которые позволят не допустить или уменьшить страдания животных.
2. Предполагаемая степень тяжести данного этапа после принятия всех мер по улучшению состояния животных и, соответственно, снижению тяжести процедуры.
3. Критерии для гуманной конечной точки для тех ситуаций, когда есть вероятность ухудшения состояния животных.
4. Обоснование применения болезненных/травмирующих методов (пояснения, почему для решения поставленных вопросов выбраны именно эти, а не альтернативные или более усовершенствованные методы).

Пример оценки степени тяжести одной из процедур приведен на рис. 1 (в рамках исследования в таблицу вносят каждую процедуру, потенциально влияющую на благополучие животных).

По совокупности всех процедур, которым будут подвергаться животные в эксперименте, необходимо указать максимальную предполагаемую степень тяжести эксперимента.


Этапы процедуры, проводимые с животными		Маркировка проколом ушной раковины
Перечень нежелательных эффектов Что может еще больше усугубить состояние животных?		Боль в ходе процедуры, замятие уха — нечитаемые метки, воспаление уха
Назначьте возможную степень тяжести процедуры		От легкой до умеренной
Как можно уменьшить/ не допустить страданий животных	Методы и конкретные меры по снижению тяжести процедуры	<ul style="list-style-type: none"> • Не использовать у грызунов до 2-недельного возраста. • Использование острого и качественного перфоратора. • Дезинфекция перфоратора после каждого использования. • Использование квалифицированных обученных сотрудников для проведения процедуры
	Укажите предполагаемую степень тяжести после всех возможных улучшений	Легкая степень тяжести
	Укажите критерии для гуманной конечной точки	Кровотечения, признаки воспалительного процесса (покраснение, нагноение, абсцессы), разрыв ушной раковины
Обоснование применения болезненных/ травмирующих методов Объясните, почему для решения поставленных вопросов выбраны именно эти (болезненные и травмирующие) методы на животных, а не альтернативные или более усовершенствованные		Необходима постоянная надежная маркировка на срок более 3 мес Шаблон карты оценки степени тяжести процедур исследования  https://docs.glp-planet.com/2023/Z9TNSK

Рис. 1. Пример оценки степени тяжести одной из процедур

Указать, по каким признакам будет оцениваться и документироваться неблагополучие животных в ходе болезненных/стрессирующих воздействий, а также по их окончании. Желательно привести пример-шаблон для регистрации этих признаков (бланк или чек-лист), разработанный на этапе планирования исследования.

Продумать алгоритм действий в случае выявления этих отклонений. Желательно привести вариант соответствующей инструкции для сотрудников.

Описание манипуляций, проводимых с животными

1. **Хендлинг.** Обозначьте способ хендлинга.
2. **Адаптация.** Укажите, к чему были адаптированы животные (к новым условиям содержания, экспериментальным установкам, фиксации и др.).
3. **Маркировка животных.** Обозначьте метод маркировки. Не рекомендуется применять для маркировки токсичные препараты или вещества, имеющие собственную фармакологическую активность. При использовании новых, ранее не используемых препаратов опишите, как это может сказаться на результатах исследования.
4. **Введение веществ (инъекции/гаваж/аппликации и др.).** Опишите: способ и/или точку введения, кратность и периодичность введений, вводимый объем (укажите, является ли этот объем максимальным или рекомендуемым при данном пути введения, данному виду животных, при введении максимально допустимого объема обоснуйте), калибр иглы/зонда, возможно ли раздражающее или иное негативное воздействие вещества и/или его растворителя и если возможно, то как это воздействие будет нивелировано.
5. **Анестезия (наркоз)/анальгезия (обезболивание).** Укажите процедуру (включая ее продолжительность), в рамках которой проводится анестезия, наименование препарата для анестезии, дозу, допустимую повторную дозу, способ введения, дополнительные условия (препараты для сопутствующей терапии; антидоты; необходимость ИВЛ и др.).
6. **Отбор биологических образцов (прижизненный).** Укажите вид/ткань образца (кровь/плазма/сыворотка/моча и др.), место/способ отбора, частоту/периодичность отборов, калибр иглы (если применимо), запланированный объем образца (укажите, является ли этот объем максимальным или рекомендуемым при данном пути отбора данному виду животных, планирование отбора максимально допустимого объема обоснуйте).
7. **Моделирование патологии путем хирургического вмешательства.** Какая функция пострадает в результате данного вмешательства? Кратко опишите порядок проведения операции (основные шаги без подробностей). Опишите приемы предоперационной подготовки и послеоперационного ухода. Укажите особые требования к персоналу, если таковые имеются.
8. **Введение радиоактивных веществ.** Какая функция пострадает в результате данного вмешательства? Кратко опишите порядок процедур. Укажите требования к квалификации персонала и меры предосторожности, необходимые для сотрудников.
9. **Прочие способы моделирования патологического состояния.** Какая функция пострадает в результате данного вмешательства? Кратко опишите порядок процедур. Укажите требования к квалификации персонала и меры предосторожности, необходимые для сотрудников.
10. **Проведение иммунизации.** Опишите частоту иммунизации, длительность интервалов между иммунизациями. Укажите вид и дозу иммуногена. Прочие особенности введения.

11. **Нейрофизиологические исследования/поведенческие тесты.** Укажите наименование тестов и опишите, что будут ощущать животные.
12. **Другое.** Опишите любые воздействия, вызывающие боль и/или влияющие на благополучие животных (провоцирующие дистресс, страдания и/или возможную гибель). Укажите измеряемые параметры. При необходимости обозначьте меры предосторожности для исследователей, необходимые при данном виде воздействий.

На все манипуляции с животными в организации должны быть разработаны СОПы (стандартные операционные процедуры). Если манипуляция в организации будет проводиться впервые, она должна быть описана максимально подробно.

Следование принципам 3Rs

Этическая экспертиза проектов с использованием животных подразумевает оценку соблюдения в исследовании принципов 3Rs (replacement, reduction, refinement). С этой точки зрения, если доказано, что эксперимент не может быть проведен без использования животных, то при выборе модели предпочтение необходимо отдавать видам, обладающим наименьшей чувствительностью и/или стоящим на более низкой ступени эволюционного развития (принцип замещения) (Макарова М.Н. и соавт., 2022). К использованию должно быть запланировано наименьшее количество животных, позволяющее достичь целей эксперимента (принцип уменьшения). При планировании, например, хирургических или других болезненных процедур исследователи должны продемонстрировать применение надлежащих методов обезболивания и обеспечение периоперационного ухода за животными, а также при необходимости использование гуманных конечных точек (принцип усовершенствования). Последние подразумевают гуманную эвтаназию или выведение животных из эксперимента на этапе, когда они испытывают тяжелую боль или страдание. Все указанные меры должны быть продуманы заранее, чтобы в ходе исследования минимизировать степень тяжести экспериментальных процедур и не допустить длительных и тяжелых страданий животных [подробнее об оценке степени тяжести процедур см. в статье (Кушнир Е.А. и соавт., 2022)]. Описание данных подходов должно быть представлено в заявке на этическую экспертизу исследования.

Пример приведен на рис. 2.

Проведение надлежащего обезболивания, соотнесение глубины анестезии и степени тяжести процедуры, взаимодополняемость анестезии и анальгезии

До недавнего времени основной задачей общей анестезии при хирургических манипуляциях являлось выключение сознания и болевой чувствительности животного, которое достигалось с помощью введения больших доз наркоза. Неконтролируемое использование таких доз оказывало неблагоприятное влияние на организм животного, снижая его резистентность как в ходе проведения хирургических процедур, так

1.1 Рассмотрены варианты замещения (**Replacement**): *in vitro*, *ex vivo*:

а) для токсикологических исследований:

- альтернативы найдены, но не могут быть применены, поскольку может быть...;
- не учитывают системное воздействие исследуемого препарата;
- не применимы для исследуемого препарата в связи с его физико-химическими свойствами или агрегатным состоянием;
- альтернативы не найдены.

б) для фармакологических исследований:

- поиск в PubMed:
найдено источников _____, из них релевантны _____;
- поиск в eLIBRARY.ru:
найдено источников _____, из них релевантны _____;
- альтернативы не найдены;
- альтернативы обнаружены, заявка на БЭК будет пересмотрена.

1.2 Рассмотрены варианты замещения (**Replacement**): *in vivo* (животные, стоящие на более низком филогенетическом уровне):

- замещение не применимо, так как тест-система регламентирована нормативными документами _____; перечислить документы
- замещение не применимо, так как тест-системы, стоящие на более низком филогенетическом уровне, не отвечают целям исследования.

1.3 Рассмотрено сокращение количества животных (**Reduction**):

- сокращение количества тест-систем не применимо, так как объем выборки регламентирован _____;
- сокращение количества тест-систем не применимо, поскольку в этом случае пострадает мощность выборки;
- сокращение количества тест-систем применимо, одобрено комиссией и не приведет к снижению достоверности полученных данных.

1.4 Будут применены варианты усовершенствования (**Refinement**):

- использование технических навыков компетентного персонала;
- мониторинг появления боли и дистресса, использование незамедлительных мер для их предотвращения;
- использование анальгезии при выполнении болезненных процедур;
- другое _____

Рис. 2. Пример заявки на этическую экспертизу исследования

и в послеоперационном периоде (угнетаются дыхательный и сосудодвигательный центры).

Введение в ветеринарную практику комбинаций миорелаксантов, ингаляционных и неингаляционных анестетиков позволило установить основные принципы анестезиологии, такие как отказ от универсальных и длительно действующих лекарственных средств; раннее пробуждение животного сразу после окончания манипуляций; создание оптимального режима жизнедеятельности организма животного во время проведения анестезии и после нее. Однако если с анестезиологическими протоколами у востребованных животных (кошки, собаки) в условиях ветеринарной клиники картина ясна, то с животными, используемыми как тест-система в доклинических исследованиях, возникает ряд сложностей.

На сегодняшний день в инструкциях к применению препаратов для ветеринарного использования отсутствуют дозы для мелких грызунов и некоторых других видов животных, а в открытом доступе нет протоколов анестезии и аналгезии в соответствии с видом манипуляций (и, следовательно, со степенью тяжести процедуры).

В наших работах ранее уже были рассмотрены современные классификации процедур по тяжести их воздействия, которые применяются в доклинических исследованиях, а также сопоставлены стадии анестезии (легкая, умеренная и глубокая) и степени тяжести процедур согласно Директиве 2010/63/EU (Макарова М.Н., Ковалева М.А., 2022; Зиятдинова А.Р., Алешанова Н.А. и соавт., 2021). В указанных работах также проведен основательный анализ средств для обеспечения анестезии и аналгезии животных, доступных на территории России, а также предложены варианты развития данной ситуации: регистрация инновационных средств для наркотизации животных на территории России, разработка методических рекомендаций по использованию средств для анестезиологического обеспечения в соответствии с видом животного и стадией анестезии.

Контроль состояния и облегчение страданий животных в послеоперационном периоде — методы оценки и воздействия

А. Общие принципы

Мониторинг признаков боли, дистресса и страдания животных (далее — мониторинг) в эксперименте преследует несколько задач:

- а) определение моментов времени, способов и объема оказания животным ветеринарной помощи или гуманной эвтаназии с целью минимизации страданий до необходимого уровня;
- б) предотвращение потери экспериментальных данных из-за внезапной гибели или значительного ухудшения состояния животных;
- в) сбор первичных экспериментальных данных в тех случаях, когда состояние животного выступает одной из измеряемых переменных.

Мониторинг — часть исследовательского протокола, то есть дополнительная задача по отношению к рутинному контролю состояния животных в виварии.

Мониторинг должен быть разработан отдельно для каждого экспериментального протокола, в ходе реализации которого по предварительной оценке возможно ухудшение состояния животных. Мониторинг подлежит обязательному рассмотрению комиссией по биоэтике.

Мониторинг складывается из:

- системы оценки состояния животных;
- сформулированных и ясно определенных мер реагирования на ухудшение состояния, критериев их применения;
- инструкций для персонала с зафиксированным распределением зон ответственности.

Включение в исследовательский протокол мониторинга не избавляет исследователя от обязанности превентивно применять меры по облегчению страданий, которые могут появиться при проведении экспериментальных процедур.

Мониторинг обязательно должен быть адаптирован к конкретному виду, линии, полу и возрасту животных, манипуляциям, исследовательским задачам, инструментальному оснащению и компетенциям доступного персонала.

Б. Кто оценивает?

Обязанности по мониторингу состояния животных могут быть возложены на любого члена исследовательской группы при соблюдении следующих условий:

- 1) он обладает общими фундаментальными представлениями о необходимости минимизировать страдания животных в эксперименте, о принципиальной важности корректного сбора первичных экспериментальных данных, а также достаточно развитой эмпатией для распознавания неблагополучия животных;
- 2) он обладает достаточной компетенцией и опытом работы с конкретной экспериментальной моделью, умеет распознавать признаки ухудшения состояния животного, в том числе специфические для конкретной экспериментальной ситуации;
- 3) он обучен проведению немедленной гуманной эвтаназии с использованием доступного оборудования, умеет распознавать ситуации, когда эвтаназия необходима;
- 4) он наделен достаточными полномочиями в рамках протокола для самостоятельного принятия решения о судьбе животных, включая принятие решения о немедленной эвтаназии;
- 5) он находится в контакте с руководителем исследования и может в любой момент связаться с ним по поводу состояния животных;
- 6) в случае, если мониторингом занимаются несколько человек (например, в разные дни), для них обязательно предварительно проводить разъяснение процедуры, основные этапы этого разъяснения необходимо документировать. В ходе этого разъяснения должна быть достигнута уверенность в том, что все сотрудники будут одинаково трактовать одни и те же наблюдаемые признаки.

В. Как оценивать?

Процедура мониторинга заключается в периодическом формализованном осмотре животных, который может проводиться как визуально (без контакта с животным), так и при непосредственном контакте (взятие животного в руки, вызванное поведение и т.д.).

При проведении осмотра нужно иметь в виду, что любое посещение персоналом комнаты содержания животных, включение дополнительного освещения и тем более взятие в руки так или иначе беспокоят животных и могут влиять на их благополучие. В связи с этим перед началом эксперимента показан предварительный хендлинг животных (приручение к рукам), в процессе которого можно провести контрольную оценку благополучия животных и использовать ее для дальнейшего сравнения.

Независимо от того, предполагается ли брать животных в руки, осмотр следует начинать с общей оценки обстановки в помещении содержания. Информативным будет наличие посторонних запахов, звуков (или отсутствие нормальных фоновых шумов) и т.д. Можно использовать приемы для определения нормальной суточной активности: например, вставлять салфетки между прутьями верхней решетки, если при следующем обходе салфетки будут все еще на месте — это тревожный знак с точки зрения проявления нормальной активности. Информативным является также осмотр остатков корма и воды в поилках, подстила, гнездового материала. В целом, состояние среды обитания животных может быть не менее важным компонентом мониторинга, чем проявление клинических признаков.

В последнее время распространение получили системы по-настоящему дистанционного мониторинга состояния животных, использующие либо видеотрансляцию, либо оценку перемещения животных внутри клетки при помощи различных датчиков. Такие системы имеют очевидное преимущество, так как: а) являются истинно неинвазивными, не требующими присутствия наблюдателя и б) позволяют осуществлять мониторинг непрерывно в режиме реального времени. Сложностью в использовании подобных систем является интерпретация получаемых данных — оценка состояния животного и определение моментов необходимого ветеринарного вмешательства по измеряемым параметрам. Применение таких систем, как правило, предполагает использование методов машинного обучения и тщательной тренировки персонала, отвечающего за мониторинг.

При проведении мониторинга обязательным является заполнение чек-листа (бланка/шаблона) с указанием проявления признаков неблагополучия животных. Пример чек-листа приведен в табл. 1.

Признаки могут иметь количественное выражение (например, процент потери массы тела) или качественное (например, наличие или отсутствие порфирина); каждый признак может быть ранжирован (например, в баллах от 0 до 3 или любая другая градация в зависимости от особенностей исследования).

Важно понимать, каким образом будет складываться итоговая численная оценка благополучия животного, — простым суммированием значений всех параметров или каким-то параметрам будет придаваться больший вес (исходя из того, что они вносят более существенный вклад в общее состояние животных). Также необхо-

Таблица 1

Бланк для оценки фактического состояния животных во время эксперимента

Номер/Код исследования										
ФИО руководителя исследования/ветеринарного врача										
Дата оценки										
№ животного	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Признак 1										
Признак 2										
Признак 3										
Признак 4										
Признак X										
Сумма баллов										
Комментарии										

димой является графа «комментарии», куда должны быть внесены все неучтенные признаки неблагополучия либо иного нетипичного поведения.

Принципиальным вопросом является собственно составление чек-листа: включение в него признаков и определение степени их проявления в количественном или качественном выражении. Очевидно, от этого этапа зависит итоговая оценка состояния и, как следствие, — принимаемые меры. При составлении чек-листа следует ориентироваться на:

- особенности модели и предполагаемые негативные эффекты;
- публикации работ по аналогичным моделям (как правило, содержат чек-листы проверки состояния);
- общие опубликованные рекомендации.

Чек-лист не должен быть слишком большим и требующим длительного времени на оценку. Обычно такие листы содержат от 5 до 10 разных параметров, оценка одного животного по чек-листу не должна занимать более 5–7 мин.

Для количественной оценки неблагоприятного состояния, кроме чек-листов (или наряду с ними), применяют различные шкалы, оценивающие общую степень неблагополучия по внешним проявлениям.

Примерами таких шкал могут быть:

- шкалы для определения неблагополучия по выражению морды у мышей (Langford D. и соавт., 2010), крыс (Sotocinal S.G. и соавт., 2011) и кроликов (Keating S. и соавт., 2012);
- методы оценки неблагополучия на основании частоты проявления маркерных форм поведения (Roughan J.V., Flecknell P. A., 2003; Wright-Williams S.L. и соавт., 2007).

Эти шкалы не только разработаны, но и валидированы (Miller A.L. и соавт., 2015). При применении любой шкалы такого рода обязательно следует проводить предва-

рительное обучение сотрудников, которые будут заниматься мониторингом и контролировать сходимость их результатов.

Г. Когда проводить?

Вопрос о временных параметрах мониторинга затрагивает два различных аспекта — *периодичность* и *длительность*.

Общим правилом является стандартная периодичность осмотра — раз в сутки (после того, как животное успешно вышло из наркоза и восстановило подвижность). Это необходимый минимум, который зафиксирован в большинстве современных руководств по научной работе с животными. Периодичность осмотров может увеличиваться в зависимости от состояния животных, например, 1 раз в 6 ч в первые послеоперационные сутки, потом ежедневно.

При определении времени осмотра важно учитывать естественный суточный ритм животных. Например, наблюдение гиперактивных или, напротив, неподвижных животных в темный и светлый период суток, очевидно, будет иметь противоположную интерпретацию.

Длительность мониторинга может быть определена в абсолютных величинах (дни после операции или в течение всего эксперимента до эвтаназии) или привязана к оценке состояния животных (до тех пор, пока в соответствии с чек-листом животные не вернуться к нормальному состоянию).

Д. Что делать?

Мониторинг теряет смысл без ясно сформулированного плана действий на случай ухудшения состояния животных. Пример дифференцированного алгоритма действий по результатам мониторинга представлен в табл. 2–5.

Таблица 2

Снижение сатурации (SpO ₂) более 95%							
Параметр	Уровень, %	Препарат	Хорек	Кролик	Собака	Кошка	Карликовая свинья
1-я степень	90–94	Смоченная аммиаком ватка, приложенная к носу на 2–3 с, или подача кислорода при подключении животного к ветеринарному наркозному комплексу					
2-я степень	78–89						
3-я степень	Менее 75	Кофеин-бензоат натрия*, мл/кг	0,26	0,15	0,11	0,19	0,05
Гипоксемическая кома	Менее 60	Кордиамин**, мл/кг	0,18	0,10	0,07	0,12	0,04

Примечание. * 20% раствор для подкожного (п/к) введения, 200 мг/мл, ампула 1 мл.
 ** 25% раствор для внутривенного (в/в) введения, 250 мг/мл, ампула 2 мл
 (перед введением препарат развести в 0,9% растворе натрия хлорида 1:5, вводить медленно в течение 1–3 мин).

Таблица 3

Изменение температуры						
Параметр	Препарат	Хорек	Кролик	Собака	Кошка	Карликовая свинья
<i>Охлажденные растворы, мл/кг</i>						
Повышение температуры	NaCl 0,9%	10	10	45	35	5
	Рингера	10	10	45	35	5
<i>Теплые растворы, мл/кг</i>						
Понижение температуры	NaCl 0,9%	10	10	45	35	5
	Рингера	10	10	45	35	5

Таблица 4

Аритмия						
Препарат	Хорек	Кролик	Собака	Кошка	Карликовая свинья	
Новокаинамид*, мл/кг	0,4	0,05	0,15	0,06	0,09	

Примечание. * Раствор для в/в введения 100 мг/мл, ампула 5 мл, вводить медленно.

Таблица 5

Изменение артериального давления						
Параметр	Препарат	Хорек	Кролик	Собака	Кошка	Карликовая свинья
Понижение	Мезатон* мл/кг	0,02	0,01	0,1	0,02	0,004
Повышение ^{4*}	Магния сульфат**, мл/кг	0,01	0,01	0,005	0,01	0,003
	Пентамин***, мл/кг	0,9	0,03	0,02	0,03	0,01

Примечание. * **Раствор для в/в введения 100 мг/мл, ампула 5 мл** (перед введением дозу препарата развести в 0,9% растворе натрия хлорида 1:10, вводить медленно в течение 1–3 мин).

** **Раствор для в/в введения 250 мг/мл, ампула 5 мл.**

*** **Раствор для в/в введения 50 мг/мл, ампула 1 мл** (перед введением развести в 0,9% растворе натрия хлорида 1:20).

^{4*} Применение магния сульфата (время действия до 30 мин) и пентамина (время действия до 3 ч) осуществляется не одновременно, а последовательно, при неэффективности магния сульфата на протяжении 10–15 мин осуществляют введение пентамина.

В случае если ухудшение состояния незначительное или критические параметры не изменились, в качестве первой меры реагирования обычно используют увеличение частоты наблюдений. Специфические изменения, например воспаление шва, требуют применения специфических заранее известных и отработанных действий (обработка антисептиком). Обязательно должны быть сформулированы однозначные критерии гуманной конечной точки, которые должны дифференцировать два состояния: а) допустимо оставить животное в живых на минимальное время, необходимое для снятия экспериментальных данных; б) безусловно требуется немедленная эвтаназия. Критерий гуманной конечной точки должен быть сформулирован не только в виде порогового значения суммы баллов по чек-листу, но и в виде перечня признаков (общих и специфических для данной модели), свидетельствующих о наступлении тяжелых необлегчаемых страданий животного.

Перечень возможных действий по результатам мониторинга должен быть сформирован исходя из вероятных осложнений, навыков сотрудников, доступных препаратов и оборудования.

Необходимым элементом мониторинга является брифинг научной группы по окончании эксперимента с анализом всех случаев, когда сотрудникам пришлось реагировать на ухудшение состояния животных, и обсуждением эффективности этих мер с последующим изменением СОП лаборатории.

Ретроспективная оценка степени тяжести — оценка фактических страданий, анализ результатов и изменения в протоколе будущих исследований

По окончании исследования анализируют заполненные формы (бланки/чек-листы) оценки состояния животных и для каждого животного подводят итог о фактической степени тяжести, которую оно испытало в ходе всего эксперимента; при этом вывод о фактической степени тяжести процедуры для каждого отдельного животного должен основываться на самом высоком уровне тяжести, испытанном в течение всего эксперимента, а не на степени страданий животного по его окончании. Фактическая степень тяжести, кроме того, должна учитывать суммарный опыт животного, принимая во внимание сложность процедуры и интенсивность ее воздействия, длительность, кратность, а также время восстановления между ее этапами. Вероятность превышения фактической степени тяжести предварительно оцененной степени должна быть сведена к минимуму своевременными действиями исследователей. Фактическая степень тяжести является ключевым фактором при оценке возможности повторного использования в дальнейших процедурах (если это применимо в данном исследовании); она рассматривается отдельно для каждого животного. Животное, уже участвующее в одной или нескольких процедурах, может быть использовано повторно при соблюдении следующих условий: а) проводимые ранее процедуры классифицируются как «легкие» или «умеренные»; б) доказано, что общее состояние здоровья животного и его самочувствие полностью восстановлены; в) планируемые процедуры клас-

сифицируются по степени тяжести как «легкие», «умеренные» или «без выхода из наркоза»; г) проведение процедур должно быть согласовано с ветеринарным врачом, который принимает во внимание жизненный опыт животного (Директива 2010/63/EU, статья 16).

На этапе обработки данных, на основании фактической степени тяжести у каждого единичного животного в эксперименте, проводится **ретроспективная оценка степени тяжести всего** исследования. Такая итоговая оценка проекта должна, с одной стороны, давать представление о том, были ли достигнуты цели исследования, а с другой — осуществлять анализ полноты и эффективности принятых мер во всех случаях ухудшения состояния экспериментальных животных и, самое главное, определение дальнейших возможностей для реализации принципов 3Rs в аналогичных исследованиях в будущем (см. ниже «Анализ фактической степени тяжести и ретроспективная оценка в модели нейропатических болей у грызунов»). Результаты ретроспективной оценки указываются в отчете по исследованию и могут быть запрошены комиссией по биоэтике в первую очередь в случае исследования на приматах или при проведении тяжелых процедур.

Пример ретроспективной оценки степени тяжести процедур при моделировании нейропатической боли у крыс путем перевязки спинно-мозговых нервов и дальнейшего испытания на них потенциальных антиаллодинических препаратов приводим ниже.

1. Анализ фактической степени тяжести по каждому животному

Контрольная группа (вводили растворитель)

Благодаря интенсивному периоперационному уходу все животные, за исключением одного, благополучно пришли в себя после операции без непредвиденных осложнений.

Анализ болевой чувствительности показал, что в результате данной операции животные испытывают легкую или умеренную боль.

1 из 10 животных не пришло в сознание по окончании операции (**«без выхода из наркоза»**).

1 из 10 животных демонстрировало признаки самоповреждения и было подвергнуто эвтаназии (**умеренная степень тяжести**).

1 из 10 животных достигло гуманной конечной точки и было подвергнуто эвтаназии (**умеренная степень тяжести**).

7 из 10 животных демонстрировали плохие показатели ноцицептивных и поведенческих тестов по сравнению с животными, получавшими препарат. Каких-либо других клинических эффектов (в том числе снижения массы тела) у них не наблюдалось. У этих животных развивался умеренный неврологический моторный дефицит, но впоследствии клинический осмотр демонстрировал постепенное уменьшение выраженности этих нарушений, возможно, в результате компенсаторных механизмов, обеспечивающих адаптацию к длительному неврологическому дефициту (**умеренная степень тяжести**).

Экспериментальная группа (оценивали эффективность антиаллодинических препаратов)

У 10 из 10 животных, получавших более низкую дозу исследуемого препарата, вместе со снижением баллов по шкале клинической оценки наблюдалось некоторое улучшение двигательной функции. Препарат обладал антиаллодиническим эффектом по сравнению с растворителем. Каких-либо побочных эффектов не выявлено (**умеренная степень тяжести**).

У 10 из 10 животных, получавших более высокую дозу, наблюдалось улучшение клинических показателей и значительное улучшение двигательной функции. Препарат обладал выраженным антиаллодиническим эффектом по сравнению с растворителем; каких-либо побочных эффектов выявлено не было (**умеренная степень тяжести**).

Хотя животные в экспериментальных группах испытывали меньшую боль, тем не менее из-за хирургического вмешательства и длительной аллодинии категория тяжести для всех животных была расценена как **умеренная**.

2. Ретроспективная оценка степени тяжести всего проекта

Ретроспективная оценка показывает, что степень тяжести проекта по созданию модели нейропатической боли у крыс путем перевязки спинно-мозговых нервов и дальнейшего исследования потенциальных антиаллодинических препаратов была **умеренной**.

3. Корректировка подходов для будущих исследований

3.1. Внесение изменений в процедуры ухода за животными

Поскольку хирургические осложнения чаще всего обнаруживаются в ходе восстановления в раннем послеоперационном периоде, то для гарантии выявления побочных эффектов и своевременного принятия мер по их устранению, необходим постоянный (особенно это критично в течение первых 24 ч) и чуткий мониторинг состояния животных с документированием результатов осмотра в подготовленных для эксперимента бланках. Оперированным животным также желательно обеспечить обогащение окружающей среды с учетом уровня их инвалидности (например, размягченные корма и размещение его на уровне пола, локальное повышение температуры в клетке содержания и др.).

3.2. Внесение корректив в бланк для оценки состояния животных

Нет.

3.3. Корректировка алгоритма действий

Если в течение первых суток после операции страдания животных превышают умеренную степень, рекомендуется их гуманно умертвить.

3.4. Корректировка предварительной оценки степени тяжести

При своевременном выполнении перечисленных мер данная процедура в будущих исследованиях может быть категоризирована как процедура **умеренной степени тяжести**

В работе рассматриваются законодательные акты ведущих стран мира, касающиеся этического регулирования экспериментов с использованием лабораторных животных, оценивается роль ветеринарного врача. Проведен анализ организации биоэтических комиссий в разных странах; даны рекомендации по составу и численности такой комиссии. Подробно рассмотрено содержание заявки на этическую экспертизу научно-исследовательских проектов, использующих лабораторных животных; разъяснена методика предварительной оценки степени тяжести экспериментальных процедур, и приведен пример документального оформления такой оценки. Предложены общие принципы контроля состояния животных в послеоперационном периоде (мониторинга состояния) и методы снижения боли, дистресса и страдания животных. Описана процедура ретроспективной оценки степени тяжести завершенных проектов на лабораторных животных, приведен пример такой оценки после моделирования нейропатической боли у крыс путем перевязки спинно-мозговых нервов и дальнейшего испытания на них потенциальных антиаллодинических препаратов.

Результаты работы могут способствовать внедрению этических норм и гуманных принципов работы с животными в вивариях доклинических центров.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bayne K.A., Garnett N.L. Mitigating Risk, Facilitating Research // *ILAR J.* 2008. Vol. 49. P. 369–371. DOI: [10.1093/ilar.49.4.369](https://doi.org/10.1093/ilar.49.4.369).
2. Gao L. The laboratory animal legal system of China // *Derecho Animal. Forum of Animal Law Studies.* 2020. Vol. 11. N. 2. P. 30–39. DOI: [10.5565/rev/da.500](https://doi.org/10.5565/rev/da.500).
3. Garber J.C., Barbee R.W., Bielitzki J.T. et al. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* 8th ed. Washington, DC, USA: The National Academic Press, 2011. P. 219.
4. Griffin G., Locke P. Comparison of the Canadian and US laws, regulations, policies, and systems of oversight for animals in research // *ILAR J.* 2016. Vol. 57. P. 271–284. DOI: [10.1093/ilar/ilw037](https://doi.org/10.1093/ilar/ilw037).
5. Guillén J., Robinson S., Decelle T. et al. Approaches to ethical project evaluation in Europe after implementation of Directive 2010/63/EU // *Lab. Anim.* 2015. Vol. 44. P. 23–31. DOI: [10.1038/labam.604](https://doi.org/10.1038/labam.604).
6. Keating S., Thomas A.A., Flecknell P.A. et al. Evaluation of EMLA cream for preventing pain during tattooing in rabbits: changes in physiological, behavioural and facial expression responses // *PLoS ONE.* 2012. Vol. 7. P. e44437. DOI: [10.1371/journal.pone.0044437](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044437).
7. Langford D., Bailey A., Chanda M. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse // *Nat. Methods.* 2010. Vol. 7. P. 447–449. DOI: [10.1038/nmeth.1455](https://doi.org/10.1038/nmeth.1455).
8. MacArthur Clark J.A., Sun D. Guidelines for the ethical review of laboratory animal welfare People's Republic of China National Standard GB/T 35892. 2018 // *Animal models and experimental medicine.* 2020. Vol. 3. N. 1. P. 103–113. DOI: [10.1002/ame2.12111](https://doi.org/10.1002/ame2.12111).

9. Miller A.L., Leach M.C. The Mouse Grimace Scale: A Clinically Useful Tool? // PLoS One. 2015. Vol. 10. N. 9. P. e0136000. DOI: [10.1371/journal.pone.0136000](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136000).
10. Olsson I.A.S., Silva S.P.D., Townend D. et al. Protecting animals and enabling research in the European Union: An overview of development and implementation of directive 2010/63/EU // ILAR J. 2016. Vol. 57. P. 347–357. DOI: [10.1093/ilar/ilw029](https://doi.org/10.1093/ilar/ilw029).
11. Rivera E., Hernandez R., Carissimi A.S. et al. Laboratory animal legislation in Latin America // ILAR J. 2016. Vol. 57. P. 293–300. DOI: [10.1093/ilar/ilw017](https://doi.org/10.1093/ilar/ilw017).
12. Roughan J.V., Flecknell P.A. Evaluation of a short duration behaviour based post-operative pain scoring system in rats // European Journal of Pain. 2003. Vol. 7. N. 5. P. 397–406. DOI: [10.1016/S1090-3801\(02\)00140-4](https://doi.org/10.1016/S1090-3801(02)00140-4).
13. Silva S., Lassen J., Sandoe P. et al. Final Report on Task 3.1: Map Ethical Bodies and Ethical Review Systems for Animal Research in EU. Animpact 2016. — URL: http://www.animpact.eu/sites/default/files/images/WP3_firstresults_2nd%20Report_0.pdf (дата обращения 08.2023).
14. Sotocinal S.G., Sorge R.E., Zaloum A. et al. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions // Mol. Pain. 2011. Vol. 29. P. 7–55. DOI: [10.1186/1744-8069-7-55](https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-55).
15. Whittaker A. Animal research regulation in Australia—does it pass the test of robustness? // Global Journal of Animal Law. 2014. Vol. 1. P. 1–14.
16. Wright-Williams S.L., Courade J.P., Richardson C.A. et al. Effects of vasectomy surgery and meloxicam treatment on faecal corticosterone levels and behaviour in two strains of laboratory mouse // Pain. 2007. Vol. 130. N. 1. P. 108–118. DOI: [10.1016/j.pain.2006.11.003](https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.11.003).
17. Зиятдинова А.Р., Алешанова Н.А., Акимов Д.Ю. и др. Проблемы анестезии экспериментальных животных и степени тяжести процедур согласно директиве 2010/63/EU (Сообщение 1) // Лабораторные животные для научных исследований. 2021. № 3. С. 50–58. DOI: [10.29296/2618723X-2021-03-06](https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-03-06).
18. Каркищенко Н.Н., Грачев С.В. (ред.) Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. Москва: Профиль — 2С, 2010. 358 с.
19. Кушнир Е.А., Белопольская М.В., Попов В.С. и др. Оценка степени тяжести процедур, проводимых на лабораторных животных. Теоретические и прикладные аспекты // Лабораторные животные для научных исследований. 2022. № 4. С. 57–71. DOI: [10.57034/2618723X-2022-04-07](https://doi.org/10.57034/2618723X-2022-04-07).
20. Лапин К.Н., Рыжков И.А., Мальцева В.А. и др. Катетеризация сосудов мелких лабораторных животных при проведении биомедицинских исследований: технологические аспекты метода (обзор) // Бюллетень сибирской медицины. 2021. Т. 20. № 3. С. 168–181. DOI: [10.20538/1682-0363-2021-3-168-181](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2021-3-168-181).
21. МакКормик Б. (ред.) Базовый курс анестезиолога: учебное пособие, электронный вариант / перевод с англ. под ред. Э.В. Недашковского, В.В. Кузькова. Архангельск: Северный государственный медицинский университет, 2010. 238 с.
22. Макарова М.Н., Ковалева М.А. Определение степени тяжести процедур. В кн. Консультант GLP-PLANET 2022. Мнение фармацевтической от-

расли. Под ред. В.Г. Макарова, В.Н. Шестакова. Санкт-Петербург, 2022. DOI: [10.57034/978-5-6048955-0-4-s8](https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-0-4-s8).

23. Макарова М.Н., Матичин А.А., Матичина А.А. и др. Принципы выбора животных для научных исследований. Сообщение 1. Выбор модельных организмов на основании филогенетических связей // Лабораторные животные для научных исследований. 2022. № 2. С. 58–70. DOI: [10.29296/2618723X-2022-02-07](https://doi.org/10.29296/2618723X-2022-02-07).

Эвтаназия лабораторных животных

<https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-2-8-s11>

М. Н. Макарова, М. А. Ковалева, С. А. Челахова
АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»

*Данная глава подготовлена на основании рекомендаций
AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals
с целью популяризации гуманного отношения
к лабораторным животным¹*

Эвтаназия животных проводится, как правило, в два этапа. Первый этап — потеря сознания, для минимизации или полного исключения стресса и страданий, второй этап — смерть. При проведении процедуры важно руководствоваться следующими принципами: метод не должен вызывать боль, потеря сознания должна наступать быстро, время до смерти должно быть минимальным, быть безопасным для исследователей и соответствовать цели исследования (учитывая особенности проведения гистологического, гематологического, биохимического анализов и т.д.), а также экономичным. Подавляющее большинство животных, используемых в научных исследованиях во всем мире, подлежат эвтаназии, потому что для оценки фармакологической активности и/или безопасности лекарственных средств требуется проводить гистологический анализ, либо уже достигнута гуманная конечная точка, или лабораторные животные не соответствуют требованиям (например, из-за чрезмерного размножения, или если они не имеют желаемого генотипа).

Американская ветеринарная медицинская ассоциация, или American Veterinary Medical Association (AVMA), опубликовала рекомендации по эвтаназии животных. В рекомендациях AVMA различные методы эвтаназии рассматриваются как приемлемые, приемлемые с определенными условиями или неприемлемые. Приемлемыми считаются методы, которые приводят к гуманной смерти животного. Методы, приемлемые в определенных условиях, — это те, которые

¹ AVMA GUIDELINES FOR THE EUTHANASIA OF ANIMALS: 2020 EDITION. URL: <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf>

требуют выполнения некоторых дополнительных условий для надежного достижения гуманной смерти.

Руководство AVMA по эвтаназии животных предназначено для использования ветеринарными специалистами, которые проводят или наблюдают за эвтаназией животных. Главной задачей этого руководства является предоставление ветеринарным специалистам рекомендаций по облегчению боли и страданий животных, подлежащих эвтаназии.

Группа AVMA разрабатывает руководство и обязана проводить всесторонний обзор и обновлять отчет не реже одного раза в 10 лет, хотя возможны более частые серьезные пересмотры на основе существенной информации, полученной в результате новых исследований и опыта практического применения. Чтобы рекомендации оставались как можно более актуальными, в них также вносятся промежуточные изменения (отражающие существенные обновления), а также незначительные редакционные исправления.

История комиссии по эвтаназии

С 1963 г. AVMA созывает дискуссионный форум по эвтаназии (Panel on Euthanasia, POE) для оценки методов и потенциальных способов эвтаназии с целью разработки рекомендаций для ветеринаров, которые проводят эвтаназию животных или наблюдают за ней. Объем издания 1963 г. был ограничен методами и рекомендациями, применяемыми к собакам, кошкам и другим мелким млекопитающим. Последующие издания, опубликованные в 1972 и 1978 г., включали больше методов и видов (лабораторных животных и животных, предназначенных в пищу, соответственно), включали дополнительную информацию о физиологических и поведенческих реакциях животных на эвтаназию (в частности, боль, стресс и дистресс), о влиянии эвтаназии на наблюдателей, а также экономическую целесообразность и воздействие на окружающую среду различных подходов. В 1986 г. введены сведения о пойкилотермных, водных и пушных зверях; в 1993 г. были добавлены рекомендации, касающиеся лошадей и животных, живущих в дикой природе.

Пересмотр руководства в 2020 г. представляет собой 9-е издание отчета POE.

В этом издании руководства были обновлены методы, приемы и средства эвтаназии, а также включены подробные описания, чтобы помочь ветеринарам в применении их профессиональных суждений. Разделы, посвященные конкретным видам, были расширены и теперь включают дополнительные рекомендации для наземных и водных видов, содержащихся для различных целей и в разных условиях.

Схемы, представленные на рисунках 1 и 2, могут быть полезны в качестве «дерева» принятия решений и оценки этичности решения об эвтаназии. Ветеринары говорят, что обращаются к этому «дереву» решений как к способу определить, оправдана ли эвтаназия, когда это не вполне очевидно.

При попытке принять наилучшее из возможных решений тщательным и взвешенным образом ветеринары могут найти эту матрицу решений полезной. Это

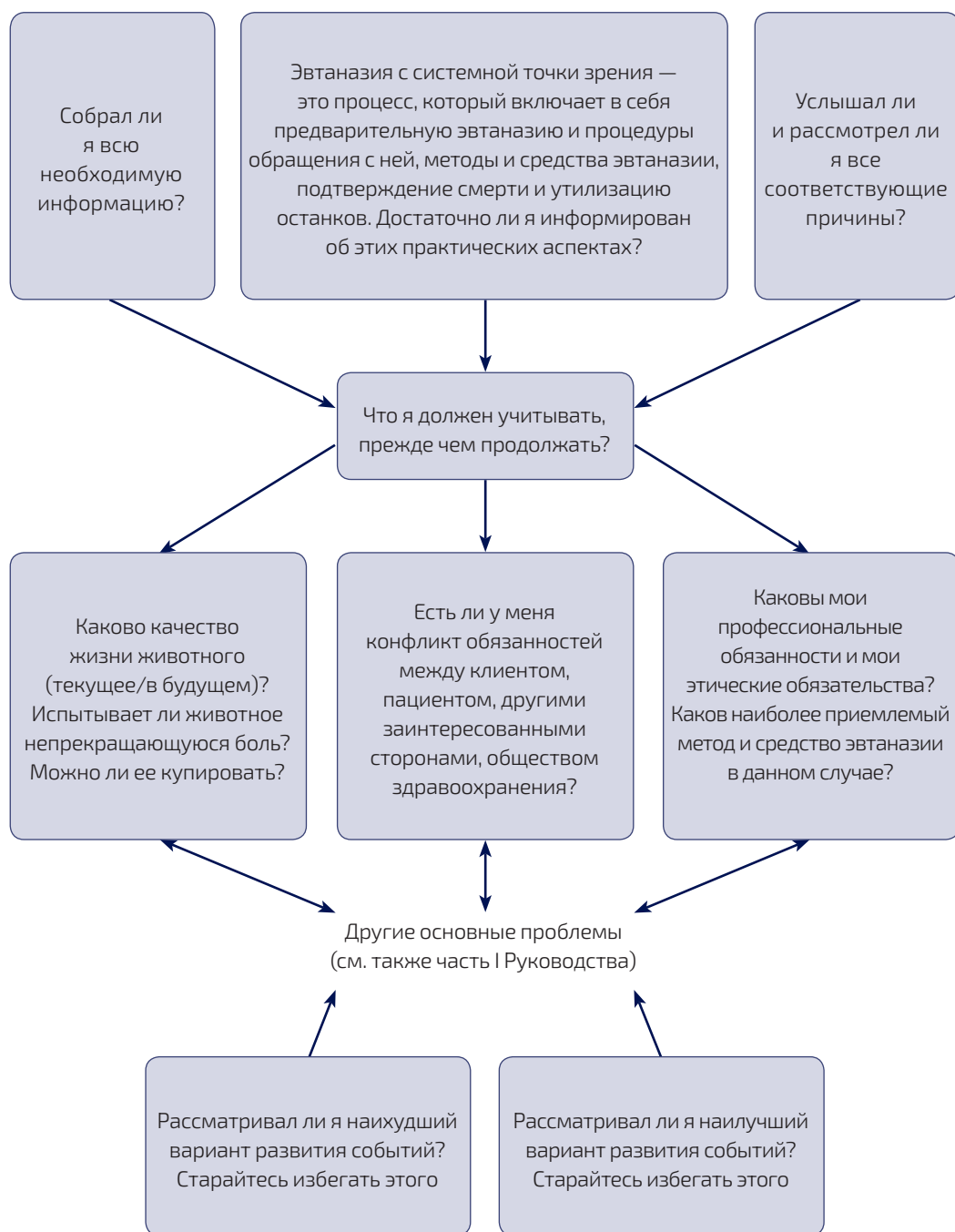


Рис. 1. Принятие решения о проведении эвтаназии

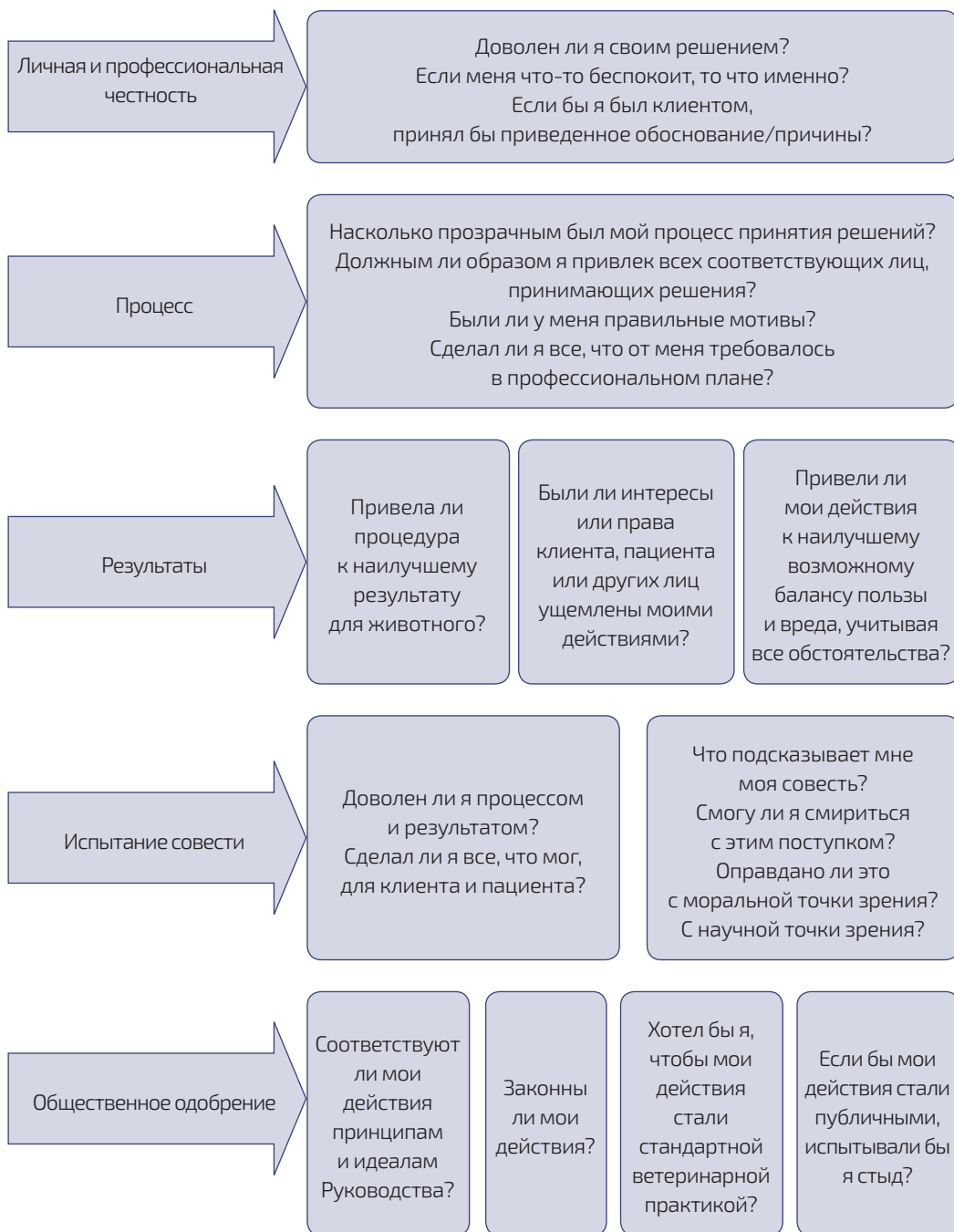


Рис. 2. Оценка этичности принятого решения

может помочь в оценке нравственности эвтаназии в конкретных случаях, особенно если они не очевидны.

Оценка методов эвтаназии

При оценке методов эвтаназии РОЕ учитывал следующие критерии:

- 1) способность вызывать потерю сознания и смерть при минимальной боли и страданиях;
- 2) время, необходимое для того, чтобы вызвать потерю сознания;
- 3) надежность;
- 4) безопасность персонала;
- 5) необратимость;
- 6) совместимость с предполагаемым использованием и назначением животных;
- 7) задокументированное эмоциональное воздействие на наблюдателей или операторов;
- 8) совместимость с последующей оценкой, исследованием или использованием ткани;
- 9) доступность наркотиков и возможность злоупотребления ими среди людей;
- 10) совместимость с видами, возрастом и состоянием здоровья;
- 11) способность поддерживать оборудование в надлежащем рабочем состоянии;
- 12) безопасность для хищников или падальщиков в случае употребления в пищу останков животного;
- 13) юридические требования;
- 14) воздействие на окружающую среду метода или утилизации останков животного.

Термины

Следует различать термины «седация», «транквилизация» и «анестезия». Общей характеристикой как седативных средств, так и транквилизаторов является то, что при достаточной стимуляции может произойти пробуждение так, что животные, находящиеся под действием седативных средств или иммобилизованные с помощью них, могут все еще находиться в сознании. В отличие от правильно применяемых методов физической эвтаназии, при которых потеря сознания является мгновенной и однозначной (например, болт-пистолет, огнестрельное оружие, поражение электрическим током), применение других одобренных методов эвтаназии требует, чтобы животные сначала были полностью в бессознательном состоянии (например, внутрисердечное введение пентобарбитала, внутривенное введение $MgSO_4$ или KCl , обескровливание). Надо учитывать, что седативные, снотворные средства и транквилизаторы при приеме в достаточном количестве могут вызывать состояние, похожее на сон, но сохраняя связь с окружающей действительностью. Поэтому не следует полагаться на иммобилизирующие, транквилизирующие или седативные средства, чтобы вызвать, действительно, бессознательное состояние независимо от введенной дозы.

Механизмы эвтаназии

Средства эвтаназии вызывают смерть по трем основным механизмам:

- 1) прямое угнетение нейронов, необходимых для жизнедеятельности;
- 2) гипоксия;
- 3) физическое нарушение активности мозга.

Процесс эвтаназии должен свести к минимуму или устранить боль, беспокойство и дистресс до потери сознания. Поскольку потеря сознания в результате этих механизмов может происходить с разной скоростью, пригодность конкретного средства или метода будет зависеть от того, испытывает ли животное дистресс до потери сознания.

Подтверждение смерти

Смерть должна быть подтверждена до начала утилизации любых останков животного при сочетании критериев, включая отсутствие пульса, дыхания, установленных в том числе с помощью стетоскопа, отсутствие роговичного и межпальцевого рефлекса, бледность слизистых оболочек и трупное окоченение. Ни один из этих признаков сам по себе, кроме трупного окоченения, не подтверждает смерть.

У мелких животных подтверждение смерти может быть дополнено пункцией сердца. Отсутствие движения иглы и прикрепленного шприца после введения в сердце (аспирация крови свидетельствует о правильном расположении) указывает на отсутствие движения сердечной мышцы и смерть.

Методы эвтаназии

Ингаляционные средства

Ниже указаны непредвиденные обстоятельства, которые могут возникнуть при использовании всех ингаляционных средств для эвтаназии.

Время до потери сознания при вдыхании средств зависит от скорости вытеснения объема контейнера и концентрации. Желаемая конечная концентрация будет достигнута быстрее при использовании большей скорости вытеснения.

Потеря сознания будет более быстрой, если животные первоначально подвергнутся воздействию высокой концентрации средства. Однако воздействие высоких концентраций может вызывать неприязнь и дистресс, так что постепенное вытеснение может быть более гуманным вариантом.

Ингаляционные средства должны подаваться в очищенной форме без загрязнений или примесей, таким образом, чтобы можно было легко определить эффективную скорость вытеснения и/или концентрацию.

Оборудование, используемое для доставки и обслуживания ингаляционных средств, должно быть в исправном состоянии и соответствовать государственным нормативным актам. Негерметичное или неисправное оборудование может приве-

сти к медленной смерти от стресса и представлять опасность для других животных и персонала.

Большинство вдыхаемых веществ опасны для работников из-за риска взрыва (например, эфир, CO), наркоза (галоглеродные анестетики, закись азота, CO₂, удушающие газы), гипоксии (удушающие газы, CO), вызывания зависимости (например, N₂O, галоглеродные анестетики) или других последствий для здоровья, возникающих в результате хронического воздействия (N₂O, CO, возможно, галоглеродные анестетики).

У больных или подавленных животных, у которых вентиляция легких снижена, возбуждение во время индукции более вероятно, поскольку повышение концентрации альвеолярного газа замедляется. Аналогичное замедленное повышение концентрации альвеолярного газа может наблюдаться у возбужденных животных с увеличенным сердечным выбросом. Для таких животных следует рассмотреть возможность проведения подходящей премедикации или неингаляционных методов эвтаназии.

Новорожденные животные, по-видимому, устойчивы к гипоксии, и поскольку все вдыхаемые вещества в конечном итоге вызывают гипоксию, им требуется больше времени для наступления смертельного исхода, чем взрослым особям.

Рептилии, амфибии, ныряющие птицы и млекопитающие обладают способностью задерживать дыхание и осуществлять анаэробный метаболизм. Следовательно, время введения анестезии и срок до потери сознания при использовании ингаляционных средств могут значительно увеличиваться. Для этих видов следует рассмотреть неинвазивные методы эвтаназии, а для их умерщвления требуется дополнительный метод.

Быстрые потоки газа создают шум или сквозняк, что может приводить к стрессу. Если требуется высокая скорость потока воздуха, оборудование должно быть сконструировано таким образом, чтобы свести к минимуму шум и попадание газовых потоков непосредственно на животных.

По возможности ингаляционные средства следует вводить в условиях, когда животным наиболее комфортно (например, для грызунов — это затемненная домашняя клетка). Если животных необходимо скомбинировать, они должны принадлежать к одному виду и совместимым когортам и при необходимости быть ограниченными или отделены друг от друга, чтобы не причинять вреда себе или другим. Камеры не должны быть перегружены и содержаться в чистоте, чтобы свести к минимуму запахи, которые могут вызвать дискомфорт у животных.

Поскольку некоторые вдыхаемые вещества легче или тяжелее воздуха, наслоение или потери вещества могут позволить животным избежать воздействия. Перемешивание достигается за счет обеспечения достаточного расхода поступающего газа или пара. При этом необходимо обеспечить хорошую герметичность камер и контейнеров.

Смертельный исход следует подтвердить после введения ингаляционных средств. Это может быть сделано либо путем обследования отдельных животных, либо применяя проверенные методы воздействия, которые, как доказано, приводят к смерти. Если животное не умерло, воздействие необходимо повторить или применить другой метод эвтаназии.

Принципы газовой анестезии

Скорость изменения концентрации газа в любом замкнутом пространстве представляет собой экспоненциальный процесс и может быть получена из экспоненциальных функций поступления и вымывания.

Уравнения экспоненциального поступления и вымывания используются для получения константы времени (τ) для замкнутого объема или пространства. Эта математическая константа, представляющая собой отношение объема к скорости потока.

Таким образом, скорость вытеснения газа имеет решающее значение для гуманного применения ингаляционных методов эвтаназии. Для адекватного проведения процедуры необходимы соответствующая комбинация редуктора давления и расходомера или иное оборудование с доказанной способностью генерировать рекомендуемую скорость вытеснения для используемого контейнера соответствующего объема.

Азот, аргон и СО коммерчески поставляются в баллонах под высоким давлением. СО₂ уникален тем, что поставляется в сжиженном состоянии под высоким давлением. Снижая высокое давление на клапане баллона, поток газа к расходомеру становится постоянным по мере снижения давления в баллоне во время использования. Регулятор СО₂ также действует для предотвращения высоких скоростей потока газа, которые могут привести к подаче замерзающего газа животным, а также обледенению регулятора и замораживанию баллона.

Ингаляционные анестетики

Для эвтаназии многих видов используется передозировка ингаляционных анестетиков (например, эфира, галотана, метоксифлурана, изофлурана, севофлурана, десфлурана, энфлурана). Галотан быстро вызывает анестезию и является эффективным ингаляционным средством для эвтаназии. Энфлуран менее растворим в крови, чем галотан. При глубокой анестезии могут возникать судороги. Энфлуран является эффективным средством для эвтаназии, но связанные с ним судорожные припадки могут вызывать беспокойство персонала. Изофлуран менее растворим, чем галотан, и вызывает анестезию быстрее. Однако он имеет резкий запах, при этом наступление бессознательного состояния может быть отсрочено из-за задержки дыхания. Из-за меньшей эффективности для наступления смерти может потребоваться больше изофлурана по сравнению с галотаном. Севофлуран менее эффективен, чем изофлуран или галотан, и имеет более низкое давление паров. Концентрация анестетика может быть быстро достигнута и поддерживаться, но для наступления смерти животного необходимо больше препарата. Хотя севофлуран, как сообщается, обладает менее неприятным запахом, чем изофлуран, некоторые виды животных могут сильно сопротивляться и испытывать апноэ, когда севофлуран вводят через лицевую маску или индукционную камеру. Как и энфлуран, севофлуран индуцирует эпилептиформную электрокортикальную активность. Десфлуран в настоящее время является наименее растворимым сильнодействующим ингаляционным анестетиком, при этом его пары довольно едкие, что может

замедлить индукцию анестезии. Этот препарат настолько летуч, что может вытеснить O_2 и вызвать гипоксемию во время индукции. И диэтиловый эфир, и метоксифлуран хорошо растворимы, однако их использование может сопровождаться возбуждением, поскольку индукция анестезии происходит довольно медленно. Диэтиловый эфир раздражает глаза, нос и дыхательные пути, при этом представляет серьезную опасность из-за воспламеняемости и взрывоопасности.

Пары анестетика вдыхаются до тех пор, пока дыхание не прекратится и не наступит смерть. Поскольку жидкое состояние большинства ингаляционных анестетиков вызывает раздражение слизистых оболочек, животные должны подвергаться воздействию только паров. При использовании ингаляционных анестетиков животных можно поместить в закрытый сосуд, содержащий вату или марлю, пропитанные соответствующим количеством жидкого анестетика, при этом пары анестетика могут вводиться из испарителя. Возможности испарителей анестетика обычно ограничены 5–7%. Максимальная производительность составляет от 0,5 до 10 л на 1 мин расхода O_2 . Время индукции будет зависеть от настройки, скорости потока и размера контейнера. Количество жидкого анестетика, необходимое для получения заданной концентрации паров анестетика в любом закрытом контейнере, может быть легко рассчитано; в случае изофлурана при 20 °C может образовываться максимум 33% паров. Во время индукционного периода должно быть обеспечено достаточное количество воздуха или O_2 для предотвращения гипоксии. В случае помещения мелких грызунов в большой контейнер в камере будет достаточно O_2 для предотвращения гипоксии. Более крупным видам, помещенным в небольшие контейнеры, первоначально может потребоваться дополнительный воздух или O_2 .

Закись азота является наименее мощным из ингаляционных анестетиков. У людей минимальная альвеолярная концентрация (МАК, определяемая как средняя эффективная доза) для N_2O составляет 104%; его активность у других видов менее чем в 2 раза ниже, чем у человека (то есть приблизительно 200%). Поскольку эффективная доза N_2O превышает 100%, его нельзя применять отдельно при давлении в 1 атм у любого вида без возникновения гипоксии, предшествующей остановке дыхания или сердца. В результате животные могут испытывать беспокойство до потери сознания, если N_2O используется в качестве единственного средства. N_2O можно применять до 70% с другими вдыхаемыми газами для ускорения наступления анестезии; однако эффект N_2O составит лишь половину (от 20% до 30%) от ожидаемого у людей из-за его сниженной эффективности у животных.

Добавление N_2O к вдыхаемым газам может представлять собой усовершенствование эвтаназии. Добавление 75% N_2O к 5% изофлурана в кислороде сокращает время до потери сознания у мышей приблизительно на 18%, а введение смеси 60% N_2O с CO_2 — на 10%.

Должны быть внедрены эффективные процедуры, позволяющие уменьшить воздействие паров анестетика на работников.

Преимущества использования газовой анестезии для эвтаназии.

1. Ингаляционные анестетики особенно эффективны для эвтаназии мелких животных (менее 7 кг) или для животных, у которых затруднена венопункция.
2. Ингаляционные анестетики могут вводиться несколькими различными способами в зависимости от обстоятельств и доступного оборудования (например,

маска для лица, вата или марля с нанесенным анестетиком, если животному не разрешается непосредственно контактировать с анестезирующей жидкостью, испаритель для предварительной обработки, контейнеры).

3. Галотан, энфлуран, изофлуран, севофлуран, десфлуран, метоксифлуран и N₂O являются негорючими и невзрывоопасными в обычных клинических условиях.
4. Ингаляционные анестетики могут быть полезны в качестве единственного средства для эвтаназии или как часть двухэтапного процесса, при котором животных сначала лишают сознания путем воздействия ингаляционных анестетиков, а затем умерщвляют с помощью второго метода.

Недостатки использования газовой анестезии для эвтаназии.

1. Ингаляционные анестетики вызывают неприязнь у кроликов и лабораторных грызунов, и то же самое может быть верно для других видов. Животные могут сопротивляться и проявлять беспокойство во время введения анестезии. При возникновении апноэ или возбуждения время до потери сознания может быть увеличено.
2. Эфир является раздражающим, легковоспламеняющимся и взрывоопасным веществом. В том числе взрывы могут происходить, когда животных, подвергнутых эвтаназии эфиром, помещают в холодильник или морозильную камеру, а упакованных в мешки животных помещают в мусоросжигательную установку.
3. Индукция метоксифлураном у некоторых видов происходит неприемлемо медленно.
4. Из-за конструктивных ограничений, связанных с выходом пара, у испарителей анестетиков время до наступления смерти может быть увеличено, поскольку O₂ обычно используется в качестве носителя газа-пара.
5. Закись азота, используемая сама по себе, создает гипоксическую атмосферу и будет вызывать беспокойство при высоких концентрациях.
6. Персонал и животные могут получить травмы в результате воздействия этих веществ.
7. Поскольку большое количество ингаляционных анестетиков всасывается и в значительном объеме остается в организме в течение нескольких дней, применение ингаляционных анестетиков для эвтаназии непригодно для животных, используемых в пищу.

Общие рекомендации

Ингаляционные анестетики приемлемы в условиях эвтаназии мелких животных (менее 7 кг) при соблюдении следующих условий.

1. У тех видов животных, у которых не было отмечено беспокойства или явной попытки избегания, предпочтительно воздействие высоких концентраций, приводящих к быстрой потере сознания. В противном случае можно использовать методы постепенного заполнения камеры, учитывая ее объем, расход и концентрацию анестетика. Ингаляционные анестетики могут вводиться в качестве единственного средства для эвтаназии или как часть двухэтапного процесса, при котором животных сначала лишают сознания путем воздействия ингаляционного анестетика, а затем умерщвляют вторичным методом.

2. Предпочтительными являются изофлуран, галотан, севофлуран, энфлуран, метоксифлуран и десфлуран с закисью азота или без нее. Закись азота не следует использовать отдельно. Метоксифлуран приемлем при определенных условиях только в том случае, если другие средства или методы недоступны. Эфир неприемлем для эвтаназии.
3. Несмотря на приемлемость, ингаляционные анестетики, как правило, не используются для более крупных животных из-за дороговизны и сложности введения.
4. Воздействие анестетиков на работников должно соответствовать государственным правилам охраны труда.
5. Новорожденным животным потребуется более длительное время воздействия.

Угарный газ

Угарный газ представляет собой бесцветный газ без запаха, негорючий и невзрывоопасный при концентрациях менее 12%. Угарный газ является кумулятивным ядом, вызывающим смертельную гипоксемию; он легко соединяется с гемоглобином и блокирует поглощение O_2 эритроцитами, образуя карбоксигемоглобин. Газ трудно поддается обнаружению и обладает высокой токсичностью даже при низких концентрациях.

У людей клиническая картина вдыхания CO неспецифична и характеризуется головной болью, головокружением и слабостью. По мере увеличения концентрации CO эти признаки могут сопровождаться снижением остроты зрения, шумом в ушах, тошнотой, прогрессирующей депрессией, спутанностью сознания и коллапсом. При более высоком уровне воздействия могут возникнуть кома, судороги и остановка сердца и дыхания. Угарный газ стимулирует двигательные центры в головном мозге, так что потеря сознания может сопровождаться судорогами и мышечными спазмами. Отчетливые признаки CO-отравления не проявляются до концентрации CO в воздухе 0,05%, а острые признаки — примерно 0,2%. У людей воздействие 0,32% CO и 0,45% CO в течение 1 ч вызывает потерю сознания и смерть соответственно. Хроническое воздействие низких концентраций CO может быть опасным для здоровья особенно в отношении развития сердечно-сосудистых заболеваний и тератогенных эффектов. Необходима эффективная вытяжная или вентиляционная система для предотвращения случайного воздействия на людей.

Преимущества

1. Угарный газ вызывает потерю сознания без боли и с минимально заметным дискомфортом в зависимости от вида.
2. Гипоксемия, вызванная CO, может оказаться незамеченной.
3. Смерть наступает быстро, если используются концентрации от 4% до 6%.

Недостатки

1. Угарный газ вызывает неприязнь у лабораторных грызунов, то же самое может быть верно и для других видов.
2. Необходимо принять меры предосторожности для предотвращения воздействия на персонал и контроля за ним.

3. Электрооборудование, подверженное воздействию CO (например, осветительные приборы и вентиляторы), должно быть безискровым и взрывозащищенным.

Общие рекомендации

Окись углерода приемлема при соблюдении условий эвтаназии и следующих непредвиденных обстоятельств.

1. Персонал, использующий CO, должен быть тщательно проинструктирован по его использованию и понимать его опасности и ограничения.
2. Камера CO должна иметь конструкцию самого высокого качества и обеспечивать возможность разделения отдельных животных. Если животных необходимо объединить, они должны быть одного вида и при необходимости ограничиваться или отделяться друг от друга, чтобы не причинять вреда себе или другим. Камеры не должны быть перегружены, их надо содержать в чистоте, чтобы свести к минимуму запахи, которые могут причинять беспокойство животным, которых впоследствии усыпляют.
3. Источник CO и камера должны располагаться в хорошо проветриваемом помещении, предпочтительно на открытом воздухе.
4. Камера должна быть хорошо освещена и позволять персоналу наблюдать за животными.
5. Скорость потока CO должна быть достаточной для быстрого достижения равномерной концентрации CO, не менее 6% после помещения животных в камеру.
6. Если камера находится внутри помещения, в нем должны быть установлены датчики CO для предупреждения персонала об опасных концентрациях.
7. Очень важно, чтобы использование CO соответствовало государственным правилам охраны труда и техники безопасности.
8. Окись углерода должна поставляться в точно отрегулированной и очищенной форме без загрязнителей или примесей. Поскольку скорость вытеснения газа имеет решающее значение для рационального использования CO, абсолютно необходимо использовать регулятор снижения давления и счетчик расхода газа.

Азот, аргон

Азот и аргон — газы без запаха, цвета и вкуса, инертные, негорючие и невзрывоопасные. Азот обычно составляет 78% атмосферного воздуха, тогда как аргон составляет менее 1%. В современных условиях эти газы функционируют путем вытеснения воздуха (и содержащегося в нем O₂), вызывая кислородное голодание.

Преимущества

1. Азот и аргон, по-видимому, не вызывают прямой неприязни у кур или индеек, и возникающая в результате гипоксия носит неаверсивный характер. Аналогичным образом газовые смеси азота и аргона не вызывают у свиней прямой неприязни и уменьшают, но не устраняют поведенческие реакции на гипоксию.

2. Азот и аргон негорючи, невзрывоопасны и легко доступны в виде сжатых газов.
3. Опасность для персонала минимальна при использовании правильно сконструированного оборудования.
4. Газовые смеси аргона и N_2-CO_2 тяжелее воздуха, что нужно учитывать при использовании.

Недостатки

1. Гипоксия, возникающая в результате воздействия этих газов, вызывает неприязнь у крыс, мышей и норок;
2. Методы постепенного вытеснения воздуха с использованием азота или аргона отдельно или в смеси с другими газами могут привести к развитию гипоксических состояний вплоть до потери сознания. Потере сознания будет предшествовать дыхание с открытым ртом и гиперпноэ.
3. Для умерщвления свиней требуется время воздействия более 7 мин.
4. Как и в случае применения CO_2 , у крыс, подвергнутых эвтаназии с помощью аргона, наблюдается альвеолярное кровоизлияние, соответствующее терминальной асфиксии.
5. Аргон стоит примерно в 3 раза дороже, чем азот.
6. Эти газы, как правило, вызывают более судорожное хлопанье крыльями у домашней птицы, чем используемый CO_2 в воздушных смесях.

Общие рекомендации

Гипоксия, возникающая в результате воздействия газовых смесей аргона или азота, допустима при соблюдении условий для эвтаназии кур и индеек. Аналогичным образом гипоксия, возникающая в результате воздействия газовых смесей аргона или N_2-CO_2 , приемлема для эвтаназии свиней при условии, что животных можно непосредственно поместить в атмосферу с содержанием O_2 менее 2%, при этом время воздействия должно быть более 7 мин. Использование аргона или азота неприемлемо для других млекопитающих. Эти газы создают бескислородную среду, которая вредна для некоторых видов и вызывает отвращение у лабораторных грызунов и норок; для этих видов предпочтительнее другие методы эвтаназии. Гипоксия в случае применения аргона или азота при концентрации O_2 менее 2% может быть использована для умерщвления этих животных после того, как они потеряют сознание приемлемым способом, для летального исхода может потребоваться длительное воздействие.

Азот, аргон и смеси, содержащие эти газы, должны подаваться в точно отрегулированном и очищенном виде без загрязнений или примесей. Поскольку скорость вытеснения газа имеет решающее значение для рационального использования этих газов, абсолютно необходимо применять регулятор снижения давления и счетчик расхода газа.

Углекислый газ

Вдыхание CO_2 вызывает респираторный ацидоз и обратимое состояние анестезии за счет быстрого снижения внутриклеточного pH. Как базальная, так и вызван-

ная нейронная активность подавляются вскоре после вдыхания 100% CO₂. Вдыхание CO₂ в концентрации 7,5% повышает болевой порог, а концентрации 30% и выше вызывают глубокую анестезию и смерть при длительном воздействии. Способы введения CO₂ включают помещение животных непосредственно в закрытую, предварительно заполненную камеру, содержащую CO₂, или воздействие постепенно увеличивающейся концентрации CO₂.

Углекислый газ потенциально может вызывать дистресс у животных с помощью 3 различных механизмов: 1) боль из-за образования углекислоты на дыхательных и глазных мембранах; 2) выработка так называемого воздушного голода и чувства одышки; 3) прямая стимуляция ионных каналов в миндалинах, связанная с реакцией на страх. Сообщается о существенных различиях между видами и линиями животных.

Углекислый газ может вызывать боль из-за образования углекислоты при контакте с влагой на дыхательных и глазных оболочках. У людей, крыс и кошек большинство ноцицепторов начинает реагировать при концентрации CO₂ приблизительно 40%. Люди сообщают, что дискомфорт чувствуется при 30–50% CO₂ и усиливается до явной боли при более высоких концентрациях. Известно, что вдыхаемые раздражители вызывают рефлекторное апноэ и снижение частоты сердечных сокращений, считается, что эти реакции уменьшают поступление вредных веществ в организм. У крыс 100% CO₂ вызывает апноэ и брадикардию, но CO₂ в концентрациях 10%, 25% и 50% — нет, предполагается, что методы постепенного перемещения с меньшей вероятностью вызывают у грызунов боль до потери сознания, которая наступает до того, как концентрация в камере достигает уровней, связанных с активацией ноцицепторов. С другой стороны, сообщается, что брадикардия, связанная с воздействием CO₂, у крыс возникает до потери сознания.

Углекислый газ играет ключевую роль в качестве стимулятора дыхания, и известно, что повышенные концентрации оказывают глубокое воздействие на дыхательную, сердечно-сосудистую системы и ЦНС. У людей чувство нехватки воздуха начинается при концентрациях 8%, это ощущение усиливается при более высоких концентрациях и становится серьезной угрозой примерно при 15%. При незначительном увеличении вдыхаемого CO₂ усиленная вентиляция приводит к уменьшению или устранению нехватки воздуха, но у этого компенсаторного механизма есть ограничения, так что при спонтанном дыхании с умеренной гиперкапнией и гипоксемией может возникнуть нехватка воздуха. Добавление O₂ к CO₂ иногда устраняет признаки дистресса, а иногда нет. Дополнительное введение O₂, однако, продлит время до смерти от гипоксемии и может отсрочить наступление потери сознания.

Преимущества

1. Быстрое угнетающее, обезболивающее и анестезирующее действие CO₂ хорошо известно.
2. Углекислый газ легко доступен в баллонах со сжатым газом.
3. Углекислый газ недорог, негорюч и невзрывоопасен и представляет минимальную опасность для персонала при использовании с правильно сконструированным оборудованием.
4. Углекислый газ не приводит к накоплению токсичных остатков в тканях у животных, которые употребляются в пищу.

Недостатки

1. Существенные и противоречивые различия в реакции на вдыхание CO_2 существуют между видами, линиями и породами, также внутри них, что затрудняет широкие обобщения.
2. Углекислый газ независимо от того, вводится ли он методом предварительного заполнения или постепенного вытеснения, может вызывать неприязнь у некоторых видов и, следовательно, потенциально может вызвать дистресс.
3. Поскольку CO_2 тяжелее воздуха, скопление газа или неполное заполнение камеры может позволить животным поднимать голову выше эффективной концентрации и избегать воздействия.
4. Незрелые особи и некоторые водные и роющие виды могут обладать исключительной переносимостью CO_2 .
5. Рептилии и амфибии могут дышать слишком медленно для использования CO_2 .
6. Эвтаназия путем воздействия CO_2 с добавлением O_2 может занять больше времени, чем эвтаназия другими способами.
7. Индукция потери сознания при концентрациях менее 80% может привести к посмертным поражениям легких и верхних дыхательных путей.
8. Сухой лед и жидкий CO_2 являются потенциальными источниками дистресса или травм, если возможен непосредственный контакт с животными.

Общие рекомендации

Углекислый газ допустим при соблюдении условий для эвтаназии у тех видов, где неприязнь или дистресс можно свести к минимуму. Воздействие углекислого газа с использованием метода постепенного заполнения с меньшей вероятностью вызовет боль из-за активации ноцицепторов углекислотой до наступления потери сознания; для грызунов рекомендуется скорость перемещения от 30% до 70% объема камеры в минуту. Следует учитывать преимущества использования затемненной домашней клетки, а также помнить о необходимости наблюдения за животным. Всякий раз, когда используются методы постепенного вытеснения, поток CO_2 следует поддерживать в течение по крайней мере 1 мин после остановки дыхания. Ювенильные животные должны подвергаться воздействию высоких концентраций CO_2 в течение длительного периода времени, чтобы гарантировать летальный исход. Кислород, вводимый вместе с CO_2 , скорее всего, дает мало преимуществ и не рекомендуется для эвтаназии. Эвтаназия CO_2 после предварительного воздействия ингаляционных анестетиков нецелесообразна и не способствует реализации принципа гуманного обращения с лабораторными животными. Помещение грызунов, находящихся в сознании, в камеру, заполненную 100% CO_2 , недопустимо. Двухэтапный процесс, при котором животных сначала вводят в наркоз, а затем помещают в 100% CO_2 , предпочтителен в тех случаях, когда не могут быть использованы методы постепенного вытеснения. Использование CO_2 для эвтаназии кроликов требует дальнейшего изучения, на сегодняшний день нет убедительных данных, позволяющих рекомендовать данный способ эвтаназии для этого вида животных.

Газовые смеси диоксида углерода и CO_2 должны подаваться в точно отрегулированном и очищенном виде без загрязнений или примесей.

Неингаляционные средства

Общие положения

Неингаляционные средства эвтаназии включают химические вещества, которые вводятся в организм иными способами, чем путем прямой доставки в дыхательные пути. Основными путями их введения являются парентеральная инъекция, местное нанесение и погружение. При определении того, подходит ли конкретное лекарственное средство и способ введения для эвтаназии, необходимо учитывать соответствующий вид, фармакодинамику химического вещества, степень требуемого физического или химического ограничения, потенциальную опасность для персонала, последствия преднамеренного или непреднамеренного употребления остатков животного другими лицами, а также потенциальную опасность для окружающей среды, связанную с остатками химических веществ. Многие неингаляционные средства для эвтаназии могут вызывать бессознательное состояние, во время которого проявляются минимальные жизненно важные функции, после чего некоторые животные могут оправиться. Следовательно, как и при любом методе эвтаназии, смерть должна быть подтверждена до окончательной утилизации остатков животного.

Пути введения

Парентеральная инъекция

Использование инъекционных средств эвтаназии является одним из самых быстрых и надежных методов выполнения эвтаназии. Обычно это наиболее желательный метод, когда его можно выполнять, не вызывая страха или беспокойства у животного. При правильном введении приемлемые инъекционные средства эвтаназии приводят к плавной потере сознания до прекращения сердечной и/или дыхательной функции, сводя к минимуму боль и страдания животного. Тем не менее при использовании инъекционных средств для эвтаназии необходимо повышенное внимание к безопасности персонала, поскольку было показано, что травмы от укола иглой, связанные с этими препаратами, приводят к неблагоприятным последствиям (41,6% случаев); 17% этих побочных эффектов были системными и тяжелыми.

Внутривенные инъекции доставляют средства эвтаназии непосредственно в сосудистую систему, что позволяет быстро поступать средству в мозг или к нервным окончаниям и приводит к скорой потере сознания (для некоторых беспозвоночных с замкнутой системой кровообращения интрагемолимфальная инъекция считается аналогичной внутривенной инъекции). Когда необходима фиксация животного при внутривенном введении, поскольку это может причинить дополнительный дискомфорт животному или создать чрезмерный риск для оператора, то следует использовать седацию, анестезию или приемлемый альтернативный путь или метод введения. Паралитические обездвиживающие средства (например, миорелаксанты) неприемлемы в качестве единственного средства эвтаназии, поскольку животные под их воздействием остаются в сознании и способны чувствовать боль. При этом бывают определенные обстоятельства (например, для диких или одичавших жи-

вотных), когда введение паралитических средств (например, нервно-мышечных блокаторов) может быть наиболее быстрым и гуманным способом обездвиживания перед эвтаназией из-за их более быстрого действия по сравнению с другими иммобилизующими средствами.

В таких ситуациях паралитические иммобилизующие средства можно использовать только в том случае, если выбранный метод эвтаназии можно применить сразу после иммобилизации. Паралитические иммобилизующие средства никогда не должны использоваться в качестве единственного способа эвтаназии, а также не должны применяться, если ожидается задержка между иммобилизацией и эвтаназией.

Интрацеломальное введение приемлемо для некоторых пойкилотермов. При введении средств для инъекционной эвтаназии в брюшную или целомическую полости позвоночные могут медленно проходить I и II стадии анестезии. Соответственно их следует помещать в небольшие вольеры в тихих местах, чтобы свести к минимуму волнение и травматизм. Внутривентральное введение средств для эвтаназии является приемлемым способом у беспозвоночных с открытой системой кровообращения.

Ретробульбарная инъекция [не более 200 мкл раствора анестетика для инъекций (кетамин : ксилазин)] допустима при состояниях, приводящих к смерти в течение 5 с после прекращения инъекции. Внутрикостное введение некоторых растворов для эвтаназии бодрствующим животным может вызвать боль из-за вязкости средства, химического раздражения или других причин. Размещение внутрикостных (большой вертел бедренной кости, большой бугорок плечевой кости, медиальная часть проксимального отдела большеберцовой кости) катетеров при введении средств для эвтаназии и внутрисердечных, внутривентральных, интраселезеночных или внутривентральных инъекций допустимо только при выполнении на наркотизированных животных или находящихся без сознания. Эти пути введения неприемлемы для бодрствующих млекопитающих и птиц из-за сложности и непредсказуемости точного выполнения техник с минимальным дискомфортом. У некоторых пойкилотермных животных, для которых внутрисердечная пункция является стандартным средством доступа к сосудам (например, у некоторых змей и других рептилий), допустимо внутрисердечное введение растворов для эвтаназии бодрствующим животным.

Погружение

Эвтаназия рыб и некоторых водных амфибий и беспозвоночных должна учитывать огромные различия в метаболизме, дыхании и устойчивости к гипоксии мозга среди различных водных видов. Поскольку водные животные имеют разные физиологические и анатомические характеристики, оптимальные методы доставки средств эвтаназии будут различаться. Во многих ситуациях погружение водных животных в воду, содержащую средства для эвтаназии, является лучшим способом минимизировать боль и страдания. Реакция водных животных на анестезирующие средства может варьировать в зависимости от вида, концентрации средства и качества воды; следует учитывать эти факторы при выборе подходящего препарата для эвтаназии. Средства, добавленные в воду, могут всасываться несколькими путями, в том числе через жабры, при приеме внутрь и/или через кожу.

В идеале вещества, добавленные в воду, не будут раздражать кожу, глаза, ткани полости рта и дыхательных путей и приведут к быстрой потере сознания с минимальными признаками дистресса или избегающего поведения. В настоящее время не существует одобренных препаратов для эвтаназии водных животных. Зарегистрированные в США вещества для отравления рыбы (например, ротенон, антимицин) не рекомендуются в качестве средств для эвтаназии, поскольку их механизмы действия и время до наступления смерти не соответствуют критериям эвтаназии.

Местное применение

Всасывание средств для местного применения происходит медленно и непостоянно, поэтому оно неприемлемо для эффективной доставки средств для эвтаназии для большинства животных. Исключение составляют животные с высокой проницаемостью кожи, на которую наносят нераздражающие, быстро впитывающиеся средства (например, амфибии, усыпленные гелем бензокаина).

Пероральное введение

Пероральный путь имеет несколько недостатков при рассмотрении вопроса о введении средств для эвтаназии, включая отсутствие установленных препаратов и доз, вариабельность биодоступности вещества и скорости всасывания, потенциальную сложность введения (в том числе возможную аспирацию) и возможность потери вещества через рвоту или срыгивание (у видов, которые способны к этим функциям). По этим причинам пероральный путь неприемлем в качестве единственного средства эвтаназии. Тем не менее пероральный путь является подходящим средством для доставки седативных средств перед введением парентеральных средств эвтаназии.

Производные барбитуровой кислоты

Барбитураты угнетают ЦНС, затем происходит потеря сознания, прогрессирующая до анестезии. При передозировке глубокая анестезия переходит в апноэ из-за угнетения дыхательного центра, за которым следует остановка сердца.

Все производные барбитуровой кислоты, используемые для анестезии, приемлемы для эвтаназии при внутривенном введении. Действие начинается быстро. Приоритетными барбитуратами являются сильнодействующие, не вызывающие раздражения, длительного действия, стабильные в растворе и недорогие. Пентобарбитал натрия лучше всего соответствует этим критериям и используется наиболее широко, хотя другие препараты, такие как секобарбитал, также приемлемы. Необходимы дополнительные исследования эффективности, скорости действия и ноцицептивных реакций внесосудистых путей введения растворов барбитуратов для эвтаназии, прежде чем можно будет рекомендовать эти альтернативные пути.

Преимущества

1. Основным преимуществом барбитуратов является время наступления эффекта, который зависит от дозы (концентрации), пути и скорости введения.

2. Эвтаназия барбитуратами считается гуманной, данный способ не приводит к страданиям животного.
3. Барбитураты, как правило, имеют более низкую стоимость, чем многие другие средства эвтаназии.

Недостатки

1. Для эвтаназии барбитураты необходимо вводить внутривенно, для этого требуется обученный персонал.
2. При проведении процедуры животное должно быть зафиксировано.
3. Текущие правила в отношении оборота наркотических и психотропных средств требуют строгого учета барбитуратов.
4. У животных без сознания может наблюдаться терминальный вздох.
5. Некоторые животные могут демонстрировать фазу возбуждения, что может приводить к субъективному ощущению «чувства вины» у персонала.
6. Эти препараты сохраняются в останках животных и могут вызывать седативный эффект или даже смерть при попадании в организм.
7. У некоторых видов животных, подвергнутых эвтаназии барбитуратами, могут наблюдаться тканевые дефекты (например, спленомегалия).
8. Имеются ограничения при приобретении, хранении и использовании.

Общие рекомендации

Преимущества использования барбитуратов для эвтаназии собак и кошек намного перевешивают недостатки. Внутривенная инъекция производного барбитуровой кислоты является предпочтительным методом эвтаназии собак, кошек, других мелких животных и лошадей. Барбитураты также приемлемы для всех других видов животных, если позволяют обстоятельства. Внутривенная или интрацеломическая инъекция может быть использована в ситуациях, когда внутривенная инъекция может быть болезненной, опасной или затруднительной из-за небольшого размера животного. Внутрисердечные (у млекопитающих и птиц), внутримышечные, внутripеченочные и внутripочечные инъекции следует использовать только в том случае, если животное находится без сознания или под наркозом (за исключением внутripеченочных инъекций у кошек).

Комбинации пентобарбитала

Некоторые средства для эвтаназии сочетают производное барбитуровой кислоты (обычно пентобарбитал натрия) с местными анестетиками, другими средствами, угнетающими ЦНС (например, фенитоин, этанол), или веществами, которые метаболизируются до пентобарбитала. Фармакологические свойства и рекомендуемое применение препаратов для эвтаназии, сочетающих пентобарбитал натрия с такими препаратами, как лидокаин или фенитоин, взаимозаменяемы с таковыми у чистых производных барбитуровой кислоты.

Смешивание пентобарбитала со средством, блокирующим нервно-мышечную передачу в одном инъекционном устройстве, неприемлемо для эвтаназии, поскольку может привести к развитию паралича до наступления потери сознания.

Трибутам

Раствор трибутама для эвтаназии представляет собой инъекционный небарбитуратный препарат для эвтаназии, каждый миллилитр которого содержит 135 мг эмбутрамида, 45 мг хлорохинфосфата и 1,9 мг лидокаина, растворенных в воде и этиловом спирте. Окончательный состав имеет бирюзово-синий цвет с добавлением горького вещества бензоата денатония, чтобы свести к минимуму риск случайного проглатывания раствора.

Эмбутрамид является производным γ -гидроксибутирата, который исследовался в качестве общего анестетика в конце 1950-х годов, но никогда не использовался в качестве фармацевтического средства из-за низкого уровня безопасности, связанного с тяжелыми сердечно-сосудистыми эффектами, включая гипотензию, угнетение миокарда и желудочковые аритмии. Эмбутрамид можно ввести отдельно, чтобы вызвать смерть, но время до ее наступления может превышать 5 мин. Впоследствии к эмбутрамиду был добавлен хлорохина фосфат, противомаларийный препарат с сильным сердечно-сосудистым угнетающим действием, и исследования подтвердили значительно более короткое время до смерти. Исследования на собаках показали эффективность этой комбинации, но при тестировании данного способа эвтаназии у кошек наблюдали значительную реакцию на внутривенную инъекцию (периферическая вена). Это действие почти полностью устраняется добавлением лидокаина. Добавление хлорохина и лидокаина также позволяет снизить дозу эмбутрамида, необходимую для эвтаназии. Смерть от трибутама наступает в результате тяжелого угнетения ЦНС, гипоксии и циркуляторного коллапса.

Трибутам вызывает потерю сознания у собак менее чем за 30 с, а смерть наступает в течение 2 мин; агональное дыхание может возникать в 60–70% случаях. Препарат следует вводить внутривенно в дозе 0,45 мл/кг в течение 10–15 с через предварительно установленный катетер или иглу для подкожного введения.

Преимущества

1. Трибутам имеет быстрое начало действия. Этот эффект зависит от дозы (концентрации), пути и скорости введения.
2. Трибутам плавно вызывает эвтаназию с минимальным дискомфортом для животного.

Недостатки

1. В настоящее время он не производится.
2. Необходима внутривенная инъекция, которую проводит обученный персонал.
3. Каждое животное должно быть индивидуально зафиксировано.
4. У животных без сознания может наблюдаться агональное дыхание.
5. Входящие в состав вещества имеют тенденцию сохраняться в останках животных и могут вызывать седативный эффект или даже смерть при попадании в организм.
6. Имеются ограничения при приобретении, хранении и использовании.

Общие рекомендации

Если препарат будет производиться, то станет приемлемым для эвтаназии собак при условии, что он вводится внутривенно высококвалифицированным специалистом в рекомендуемых дозах и с надлежащей скоростью. Способы введения трибутама, кроме внутривенных инъекций, неприемлемы.

T-61

T-61 представляет собой инъекционную, небарбитуратную, ненаркотическую смесь эмбутрамида, мебозония (мебензония) йодида и тетракаина гидрохлорида. Эмбутрамид вызывает наркоз и угнетение дыхания, тогда как мебозоний — недеполяризующий мышечный паралич. Выражалась озабоченность по поводу того, что паралитический эффект мебозония возникает до потери сознания, вызванного эмбутрамидом, может привести к стрессу животного до потери сознания и проявляется мышечной активностью и/или вокализацией во время инъекции. Однако электрофизиологические исследования на собаках и кроликах показали, что потеря сознания и двигательной активности происходит одновременно после инъекции T-61. Могут возникать неприятные реакции у собак на инъекцию T-61 в виде дисфории, наблюдаемой во время вводной фазы анестезии, при этом поведение, демонстрируемое во время этих реакций, может вызвать дистресс у персонала, наблюдающего за эвтаназией. Из-за этих опасений производитель добровольно отозвал T-61 с рынка, и он больше не производится и не продается в США, хотя он доступен в Канаде и других странах. T-61 следует вводить только внутривенно и с тщательно контролируемой скоростью, чтобы избежать дисфории во время инъекции.

Преимущества

1. T-61 имеет быстрое начало действия и может использоваться для эвтаназии собак, кошек, лошадей, лабораторных животных, птиц и диких животных.
2. Терминальное (агональное) удушье, которые может возникнуть у животных, подвергнутых эвтаназии барбитуратами внутривенно, не наблюдается при использовании T-61.

Недостатки

1. T-61 в настоящее время не производится в США.
2. Препарат требуется вводить внутривенно медленно, чтобы избежать дисфории до потери сознания.
3. Для проведения процедуры животное должно быть зафиксировано, манипуляцию должен проводить обученный персонал.
4. Вторичный токсикоз может возникнуть у животных, потребляющих останки животных, подвергнутых эвтаназии с помощью T-61.
5. Имеются ограничения при приобретении, хранении и использовании.

Общие рекомендации

T-61 приемлем в качестве средства эвтаназии при условии, что он вводится должным образом обученным персоналом. Пути введения T-61, отличные от внутривенного, неприемлемы.

Сверхсильные опиоиды

Гидрохлорид эторфина и цитрат карфентанила являются ультрасильными опиоидами (в 10 000 раз сильнее сульфата морфина). Эти опиоиды использовались в качестве препаратов для иммобилизации и эвтаназии главным образом крупных животных, особенно диких. Карфентанил применялся через слизистую оболочку в виде леденцов для усыпления крупных обезьян, содержащихся в неволе. Эти препараты воздействуют на μ -опиоидные рецепторы, вызывая глубокое угнетение ЦНС и смерть, вторичную по отношению к остановке дыхания.

Преимущества

1. Эторфин и карфентанил можно вводить внутримышечно или через слизистые оболочки в ситуациях, когда внутривенное введение невозможно или опасно.
2. Эти препараты имеют быстрое начало действия.

Недостатки

1. Имеются ограничения при приобретении, хранении и использовании.
2. При обращении с препаратами существует значительный риск для людей, ведь вещества могут всасываться через поврежденную кожу или слизистые оболочки.
3. Эти опиоиды могут представлять риск вторичного токсикоза при проглатывании останков умерщвленных животных, поэтому важное значение имеет надлежащая их утилизация.

Общие рекомендации

Эторфин или карфентанил допустимы для проведения эвтаназии только в ситуациях, когда использование других средств непрактично или опасно. Персонал, работающий с препаратами, должен быть знаком с их опасностью. При проведении манипуляции должен присутствовать дополнительный сотрудник, чтобы вызвать скорую помощь и/или оказать первую помощь в случае случайного воздействия.

Диссоциативные средства и агонисты α_2 -адренорецепторов

Вводимые диссоциативное вещество и агонисты α_2 -адренорецепторов вызывают быструю потерю сознания, а иногда и расслабление мышц перед хирургическим, стоматологическим вмешательством или другими процедурами. Эти препараты иногда используют перед введением растворов для эвтаназии, чтобы свести к минимуму страдания животных, облегчить их фиксацию и/или обеспечить более эстетичную обстановку для эвтаназии при участии владельца животного. В ситуациях передозировки эти вещества могут привести к смерти; однако дозы, которые постоянно приводят к смерти, не установлены для большинства видов. У мышей инъекция 100 мкл раствора кетамин : ксилазин в соотношении 10 : 1 (мг : мг) приводила к смерти в течение 3–5 с после завершения инъекции. Внутривентральное введение диссоциирующих средств в комбинации с агонистами α_2 -адренорецеп-

торов в дозе в 5 раз превышающей дозу анестетика, использовалось в качестве средства усыпления лабораторных животных.

Преимущества

1. Эти вещества легкодоступны.
2. Комбинация этих средств вызывает быструю потерю сознания.
3. Несмотря на то, что внутривенная инъекция для эвтаназии предпочтительнее, эти комбинации можно вводить внутримышечно в ситуациях, когда внутривенное введение невозможно или опасно.

Недостатки

1. Дозы, которые последовательно вызывают быструю смерть, не установлены для большинства видов.
2. Стоимость более высоких доз препаратов, необходимых для того, чтобы вызвать смерть, может существенно превышать цену одобренного средства для эвтаназии.
3. Многие диссоциирующие вещества являются контролируруемыми веществами, а их приобретение, хранение и использование ограничены.
4. Некоторые средства для инъекций могут быть опасны для персонала при случайном воздействии.
5. Воздействие остатков инъекционных анестетиков в останках усыпленных животных на окружающую среду не определено.

Общие рекомендации

У видов, для которых установлены эффективные дозы и способы эвтаназии, передозировка комбинаций диссоциативного вещества и агониста α_2 -адренорецепторов является допустимым методом эвтаназии. Эти средства используются при определенных условиях в ситуациях, когда одобренные препараты для эвтаназии недоступны или применяются в качестве вторичного средства эвтаназии у уже подвергнутых анестезии животных при условии соблюдения максимальной осторожности, чтобы убедиться, что смерть наступила до утилизации останков животных. Эти комбинации также приемлемы в качестве первого шага в двухэтапном методе эвтаназии. До тех пор, пока не будет определено воздействие остатков тканей на окружающую среду, необходимо соблюдать особую осторожность при утилизации останков животных. Инъекционные анестетики не следует применять животным, предназначенным для употребления в пищу.

Хлорид калия и соли магния

Несмотря на неприемлемость при использовании у позвоночных животных, находящихся в сознании, растворов хлорида калия, хлорида магния или сульфата магния, вводимых внутривенно или внутрисердечно животному, находящемуся без сознания или под общим наркозом, является допустимым способом вызвать остановку сердца и смерть. Быстрое внутривенное или внутрисердечное введение хлорида калия в дозе 75–150 мг/кг вызовет остановку сердца. Это инъекционный метод эвтаназии домаш-

него скота или представителей дикой природы, который может снизить риск токсикоза у хищников или падальщиков в ситуациях, когда можно употреблять останки усыпленных животных. Хлорид калия, введенный внутривенно в дозе 3 мг/кг попугаям, подвергнутым анестезии изофлураном, вызвал слабую вокализацию у 1 из 6 птиц и привел к асистолии через 68 с. Внутривенное введение 10 мг/кг попугаям, подвергнутым анестезии, привело к непроизвольному дрожанию мышц у 5 из 6 птиц и асистолии за 32,8 с. Ни одна из доз не вызывала появления гистологических дефектов.

Соли магния также могут быть подмешаны в воду для использования в качестве средств для погружной эвтаназии некоторых водных беспозвоночных. У этих животных соли магния приводят к смерти из-за подавления нервной активности.

Преимущества

1. Хлорид калия и соли магния не являются контролируруемыми веществами и легко приобретаются, транспортируются и смешиваются в полевых условиях.
2. Растворы хлорида калия и соли магния, вводимые после того, как животное потеряло сознание, приводят к получению останков животных, которые потенциально менее токсичны для падальщиков и хищников и могут быть хорошим выбором в случаях, когда надлежащая утилизация останков животных (например, обезвреживание, сжигание) невозможна или непрактична.

Недостатки

1. Дрожь мышечной ткани и клонические судороги могут возникать во время или вскоре после инъекции.
2. Необходимо приготовление насыщенных растворов для получения подходящих концентраций для быстрого введения крупным животным.

Общие рекомендации

Персонал, выполняющий эту технику, должен быть обучен и хорошо разбираться в технике анестезии, а также быть компетентным в оценке уровня потери сознания, необходимого для внутривенного введения растворов хлорида калия и солей магния. Внутривенное введение растворов хлорида калия или соли магния требует, чтобы животные находились в хирургическом состоянии анестезии, характеризующемся потерей сознания, рефлекторной мышечной реакции и реакции на вредные раздражители. Применение у животных, находящихся без сознания (лежачих и невосприимчивых к вредным раздражителям), приемлемо в ситуациях, когда другие методы эвтаназии недоступны или неосуществимы. Несмотря на то, что в случае применения хлорида калия или солей магния в сочетании с общим анестетиком не сообщалось о токсикозах, вызываемых падалью, всегда следует пытаться надлежащим образом утилизировать останки животных, загрязненных общими анестетиками, чтобы предотвратить возможный токсикоз при их употреблении.

Хлоралгидрат и α -хлоралоза

Хлоралгидрат (1,1,1-трихлор-2,2,-дигидроксиэтан) когда-то использовался в комбинации с сульфатом магния и пентобарбиталом натрия в качестве экономичного

средства для анестезии и эвтаназии крупных животных, но сейчас редко используется в ветеринарии. α -Хлоралоза является производным хлоралгидрата более длительного действия, которое используется для анестезии лабораторных животных, в частности, при исследовании мозгового кровообращения. При внутривенном введении эти препараты оказывают почти немедленное седативное действие, но если их не комбинировать с другими анестетиками, начало анестезии замедляется. Смерть при их применении вызвана гипоксемией, возникающей в результате прогрессирующего угнетения дыхательного центра, и ей могут предшествовать удушье, мышечные спазмы и вокализация.

Преимущества

1. Исторически хлоралгидрат был недорогим анестетиком и средством для эвтаназии, что делало его экономичным при использовании у крупных животных.
2. Хлоралгидрат имеет некоторые ограничения в получении, хранении и применении.

Недостатки

Хлоралгидрат медленно угнетает работу головного мозга, поэтому фиксация может быть проблемой для некоторых животных.

Общие рекомендации

Хлоралгидрат и α -хлоралоза не являются приемлемыми средствами для эвтаназии, поскольку связанные с ними побочные эффекты могут быть серьезными, реакции нежелательными, а другие продукты являются лучшим выбором.

Спирты

Этанол и другие спирты повышают текучесть клеточных мембран, изменяют ионные каналы внутри нервных клеток и снижают их активность. Спирты вызывают смерть через угнетение нервной системы и дыхания, что приводит к анестезии и кислородному голоданию. Спирты использовались в качестве вторичных методов эвтаназии для некоторых видов рыб и в качестве основных инъекционных средств для эвтаназии у лабораторных мышей в возрасте 35 дней и старше, у крыс путем внутрибрюшинной инъекции этанола. Введение мышам внутривенно 0,5 мл 70% этанола приводит к постепенной потере мышечного контроля, коме и смерти в течение 2–6 мин. Тем не менее у мышей в возрасте менее 35 дней время до смерти увеличивалось после интраперитонеального введения этанола, поэтому этот метод не подходит для мышей этой возрастной группы или для новорожденных мышей. Этот метод неприемлем для эвтаназии крыс из-за необходимости введения очень больших объемов этанола и длительного времени до остановки дыхания. Также в качестве анестетика у лабораторных грызунов используется трибромэтанол.

Преимущества

Спирты недороги и легкодоступны.

Недостатки

1. Спирты вызывают дозозависимое раздражение тканей.
2. Наступление потери чувствительности и смерть могут быть отсрочены после приема алкоголя ранее.
3. Объем, необходимый для эвтаназии животных крупнее мышей, делает большинство спиртов непрактичными в качестве средств эвтаназии.
4. Трибромэтанол не является коммерчески доступным продуктом фармацевтического качества.

Общие рекомендации

Этанол в низких концентрациях является приемлемым вторичным средством эвтаназии рыб, анестезированных другими способами, а также первичным или вторичным средством эвтаназии некоторых беспозвоночных. Использование высоких концентраций (например, 70%) этанола недопустимо. Этиловый спирт допустим в определенных условиях в качестве средства эвтаназии для мышей в возрасте 35 дней и старше, но неприемлем в качестве средства эвтаназии для более крупных видов. Трибромэтанол можно использовать в качестве средства эвтаназии лабораторных грызунов при соответствующем приготовлении, хранении и введении в соответствующей дозе.

MS 222

Трикаина метансульфонат, обычно называемый MS 222, зарекомендовал себя для временной иммобилизации рыб, амфибий и других водных, хладнокровных животных. Трикаина метансульфонат использовался для эвтаназии рептилий, амфибий и рыб. Его эффективность повышается в теплой воде и снижается в холодной. Погружение рыб в растворы MS 222 на 30 мин до потери ритмичного движения глазных яблок достаточно для эвтаназии большинства рыб. Из-за различия видов в реакции на MS 222 для многих рыб рекомендуется вторичный метод эвтаназии, чтобы гарантировать смерть. Срок выведения MS 222 из организма составляет 21 день, поэтому он не подходит для эвтаназии животных, предназначенных для употребления в пищу.

MS 222 быстро проникает в ЦНС и изменяет нервную проводимость за счет блокады чувствительных к напряжению натриевых каналов. Кроме того, его накопление в миокарде приводит к снижению сердечно-сосудистой функции. Смерть наступает из-за снижения нервной и сердечно-сосудистой функций.

Исследования с *Xenopus laevis* (Африканская шпорцевая лягушка, или платанна) показали, что концентрации MS 222, традиционно используемые для эвтаназии земноводных (0,25–0,5 г/л), недостаточны для выполнения эвтаназии у этого вида. Погружение лягушек в MS 222 с концентрацией 5 г/л приводило к глубокой анестезии в течение 4 мин, но для надежной эвтаназии 100% лягушек требовалось не менее 1 ч погружения в эту концентрацию. Авторы этого исследования рекомендовали, если концентрация MS 222 менее 5 г/л или более короткий промежуток времени воздействия, чем 1 ч, использовать метод вторичной эвтаназии для *Xenopus laevis*. Сообщается, что интрацеломическая инъекция MS 222 в максимально возможной

дозе (2590 мг/кг) не привела к эвтаназии: 6 из 20 лягушек восстановили подвижность в течение 3 ч после инъекции. Следовательно, интрацеломическая инъекция MS 222 не считается приемлемым методом эвтаназии для *Xenopus laevis*, возможно, и для других земноводных.

Описан двухэтапный метод эвтаназии рептилий с использованием MS 222. На первом этапе внутривенно вводят от 250 до 500 мг/кг рН-нейтрализованного раствора (от 0,7% до 1,0% MS 222), что приводит к быстрой потере сознания (от менее 30 с до 4 мин). Как только происходит потеря сознания, вводят вторую интрацеломическую инъекцию забуференного 50% MS 222.

Преимущества

1. Трикаина метансульфонат растворим как в пресной, так и в соленой воде и может использоваться для лечения широкого круга рыб, амфибий и рептилий.
2. Трикаина метансульфонат имеется в продаже и не является контролируемым веществом, что упрощает приобретение, хранение и введение.

Недостатки

1. Трикаина метансульфонат имеет высокую стоимость и может быть непомерно дорогим препаратом при использовании для крупных рыб, амфибий и рептилий или для больших популяций.
2. По-видимому, существует значительная изменчивость видов в ответ на MS 222, при этом некоторым видам требуются более высокие дозы или вторичные меры для обеспечения гибели.
3. Инъекция MS 222 не подходит для рыб, так как быстрое выделение через жабры делает его неэффективным при таком пути введения.
4. Трикаина метансульфонат нельзя использовать у животных, предназначенных для употребления человеком.
5. Воздействие остатков MS 222 в умерщвленной рыбе на окружающую среду или виды падальщиков не установлено.

Общие рекомендации

Трикаина метансульфонат является приемлемым методом эвтаназии для рыб и некоторых амфибий и рептилий. При использовании для некоторых рыб и некоторых земноводных (например, *Xenopus spp*) следует использовать вторичный метод, чтобы гарантировать смерть. Сама по себе интрацеломическая инъекция MS 222 не является приемлемым методом эвтаназии для *Xenopus laevis*, возможно, и для других земноводных. Животные, подвергнутые эвтаназии с помощью MS 222, не должны использоваться в качестве пищи для людей или других животных.

Бензокаина гидрохлорид

Бензокаин, соединение, аналогичное MS 222, не растворимо в воде и поэтому готовится в виде исходного раствора (100 г/л) с ацетоном или этанолом; присутствие этих растворителей может вызывать раздражение тканей. И наоборот, бензокаина

гидрохлорид растворим в воде и может быть использован непосредственно либо для анестезии, либо эвтаназии рыб и амфибий. Продукты, содержащие бензокаин, должны быть защищены от света и от замораживания или чрезмерного нагревания (более 40 °C). Местное нанесение 7,5% или 20% геля бензокаина гидрохлорида на брюшную полость амфибии эффективно и не требует буферизации. Подобно MS 222, бензокаин действует путем блокады чувствительных к напряжению натриевых каналов в ЦНС и сердце, что приводит к угнетению нервной и сердечно-сосудистой систем.

Нанесение геля гидрохлорида бензокаина на брюшную полость земноводных (концентрация 20%; аппликация 2 см × 1 см) является эффективным средством анестезии и эвтаназии для некоторых видов. После нанесения геля на брюшную полость *Xenopus laevis* и помещения во влажное ведро рефлексы выпрямления и отдергивания угасали в течение 7 мин, а смерть наступала в течение 5 ч. Никаких признаков кожного повреждения, потери кожной гидратации или затрудненного дыхания не было связано с местным применением геля бензокаина гидрохлорида у амфибий. В недавнем исследовании эвтаназии взрослых *Xenopus laevis* указывается доза 182 мг/кг геля бензокаина гидрохлорида как эффективная. Сравнение применения бензокаина гидрохлорида с погружением в ледяную суспензию для эвтаназии костистого леща показало, что для некоторых видов тепловодных рыб ледяная суспензия вызывает меньшую двигательную реакцию, чем передозировка бензокаином в качестве метода эвтаназии, но необходима дополнительная работа, чтобы определить наиболее гуманный метод.

Преимущества

1. Бензокаина гидрохлорид является относительно быстродействующим и эффективным средством эвтаназии для рыб и земноводных.
2. Бензокаина гидрохлорид не является контролируемым веществом.
3. Средство имеет низкую токсичность для человека в концентрациях, используемых для эвтаназии рыб.
4. Бензокаина гидрохлорид представляет небольшой риск для окружающей среды, поскольку он легко фильтруется с использованием активированного угля и разлагается в воде примерно в течение 4 ч.

Недостатки

1. Бензокаина гидрохлорид может быть непомерно дорогим для эвтаназии крупных рыб, амфибий и рептилий или больших популяций.
2. Растворы бензокаина гидрохлорида должны быть тщательно забуферены, чтобы избежать раздражения тканей.
3. Воздействие остатков бензокаина в умерщвленной рыбе на окружающую среду или на виды падальщиков не установлено.

Общие рекомендации

Гель и растворы бензокаина гидрохлорида являются приемлемыми средствами для эвтаназии рыб и земноводных. Бензокаина гидрохлорид не является приемлемым средством эвтаназии для животных, предназначенных для употребления в пищу.

Эвгенол

Гвоздика содержит ряд эфирных масел, включая эвгенол, изоэвгенол и метилэвгенол. Эвгенол содержит от 85% до 95% эфирных масел, содержащихся в гвоздике, и используется в качестве пищевого ароматизатора и местного анестетика при стоматологическом вмешательстве у человека. Эвгенол проявляет противогрибковую, антибактериальную, антиоксидантную и противосудорожную активность. Некоторые другие компоненты гвоздичного масла, такие как изоэвгенол, являются возможными канцерогенами на основании исследований на грызунах. Гвоздичное масло и его экстракты стали популярными в качестве анестетиков для пресноводных и морских рыб из-за их широкой доступности, низкой стоимости и более короткого времени индукции по сравнению с MS 222. Было обнаружено, что в отличие от MS 222 в качестве анестезирующего вещества эвгенол имеет более быструю индукцию, длительное восстановление и узкий предел безопасности, поскольку он может вызывать быстрое начало дыхательной недостаточности при высоких концентрациях (более 400 мг/л).

Механизм анестезии гвоздичного масла и его производных плохо изучен, но, по-видимому, они действуют так же, как и другие местные анестетики, ингибируя чувствительные к напряжению натриевые каналы нервной ткани. Исследования у грызунов указывают, что этот класс веществ может вызывать паралич в дополнение к их анестезирующим эффектам.

Преимущества

1. Гвоздичное масло и его производные широко доступны, относительно недороги и не являются контролируруемыми веществами.
2. Эти вещества имеют короткое время индукции.
3. Гвоздичное масло и его производные эффективны при широком диапазоне температур воды.
4. Эвгенол имеет низкий риск токсичности для человека в концентрациях, используемых для эвтаназии рыб.

Недостатки

1. Животные, усыпленные производными гвоздичного масла, не одобрены к употреблению в пищу человеком.
2. Некоторые производные гвоздичного масла являются потенциальными канцерогенами.
3. Воздействие остатков гвоздичного масла в умерщвленной рыбе на окружающую среду или виды падальщиков не установлено.

Общие рекомендации

Гвоздичное масло, изоэвгенол и эвгенол являются приемлемыми средствами эвтаназии для рыб. Рекомендуется, когда это возможно, использовать продукты со стандартизированными известными концентрациями эфирных масел, чтобы можно было их точно дозировать. Эти вещества не являются приемлемыми средствами эвтаназии для животных, предназначенных для потребления.

2-Феноксиэтанол

Погружение в 2-феноксиэтанол использовалось для анестезии и эвтаназии рыб при концентрациях от 0,3 до 0,5 мг/л и выше. Растворимость 2-феноксиэтанола снижается в более холодной воде. Механизм действия 2-феноксиэтанола плохо изучен, но считается, что смерть наступает от гипоксии, вторичной по отношению к угнетению ЦНС. Рыбу следует выдержать в растворе 2-феноксиэтанола не менее 10 мин после прекращения движения глазных яблок.

Преимущества

1. 2-Феноксиэтанол можно использовать в одноэтапном методе погружения для эвтаназии рыб.
2. Препарат не является контролируемым веществом.

Недостатки

1. Время индукции может быть увеличено.
2. Существуют различия в уровнях дозы и продолжительности воздействия, необходимых для эвтаназии.
3. Некоторые виды проявляют гиперактивность до потери сознания.
4. Воздействие остатков 2-феноксиэтанола в умерщвленной рыбе на окружающую среду или на виды падальщиков не установлено.

Общие рекомендации

Хоть и, вероятно, существуют более эффективные иммерсионные вещества, 2-феноксиэтанол является приемлемым методом эвтаназии для рыб при определенных обстоятельствах. 2-Феноксиэтанол не является приемлемым средством эвтаназии животных, предназначенных для употребления в пищу.

Хинальдин

(2-метилхинолин, хинидина сульфат)

Хинальдин плохо растворяется в воде, поэтому его необходимо сначала растворить в ацетоне или спирте, а затем забуферить бикарбонатом. Эффективность хинальдина зависит от вида, температуры и pH воды, а также от содержания минералов в воде. Хинальдин угнетает чувствительные центры ЦНС.

Преимущества

1. Хинальдин можно использовать в одноэтапном методе погружения для эвтаназии рыб.
2. Хинальдин не является контролируемым веществом.

Недостатки

Воздействие остатков хинальдина в умерщвленной рыбе на окружающую среду или виды падальщиков не установлено.

Общие рекомендации

Использование хинальдина является допустимым методом эвтаназии рыб при определенных обстоятельствах. Хинальдин не является подходящим средством эвтаназии сельскохозяйственных животных, предназначенных для употребления в пищу.

Метомидат

Метомидат является хорошо растворимым в воде снотворным средством, не содержащим барбитураты, которое действует, вызывая угнетение ЦНС. Это быстродействующее средство для эвтаназии, при использовании в 10 раз превышающее верхний предел рекомендуемой дозы анестетика. Некоторым видам рыб для достижения анестезии требуются более высокие концентрации метомидата. Рыбу следует держать в растворе не менее 10 мин после прекращения движения глазных яблок. Метомидат не является приемлемым средством эвтаназии животных, предназначенных для потребления человеком.

Преимущества

1. Метомидат можно использовать в одноэтапном методе погружения для эвтаназии рыб.
2. Метомидат не является контролируемым веществом.

Недостатки

1. Некоторым видам рыб требуются более высокие концентрации метомидата для анестезии, что делает его неудачным средством для эвтаназии этих видов.
2. Рыба, подвергнутая эвтаназии с использованием метомидата, неприемлема для употребления в пищу.
3. Воздействие остатков метомидата в умерщвленной рыбе на окружающую среду или виды падальщиков не установлено.

Общие рекомендации

Метомидат является допустимым методом для эвтаназии некоторых видов рыб при определенных обстоятельствах. Метомидат не является подходящим средством эвтаназии животных, предназначенных для употребления в пищу.

Гипохлорит натрия

Гипохлорит натрия и растворы, приготовленные из гранул гипохлорита кальция, действуют как растворители и окислители в тканях, что приводит к омылению жирных кислот, денатурации белков и нарушению клеточных процессов. Гипохлорит использовался для эвтаназии невылупившихся и вылупившихся рыбок данио в течение 7 дней после оплодотворения, после чего считается, что детеныши вышли за пределы эмбриональной формы и способны испытывать дистресс или боль. Гипохлорит также использовался для уничтожения эмбрионов в различных исследовательских учреждениях.

Преимущества

1. Гипохлорит натрия и гипохлорит кальция недороги, легкодоступны и в концентрациях, используемых для уничтожения эмбриональной и личиночной стадий (от 1% до 10%), представляют минимальную опасность для персонала.
2. Эти продукты не являются контролируруемыми веществами.

Недостатки

Концентрированные растворы гипохлорита вызывают коррозию и при неправильном обращении представляют риск повреждения кожи, глаз и дыхательных путей у персонала.

Общие рекомендации

При использовании на ранних эмбриональных и личиночных стадиях до развития ноцицептивных способностей применение гипохлоритов является приемлемым средством эвтаназии. Гипохлориты не могут быть использованы в качестве единственного средства эвтаназии организмов за пределами этих эмбриональных и личиночных стадий.

Формальдегид

Формальдегид вызывает повреждение клеток за счет окислительного повреждения, а также образования поперечных связей с ДНК, РНК и белками. Формальдегид можно использовать для эвтаназии и консервации *Porifera* (губок), поскольку у этих беспозвоночных отсутствует нервная ткань.

Преимущества

1. Формальдегид недорог, легкодоступен и не является контролируемым веществом.
2. Вещество быстро фиксирует ткани, сохраняя структуру для последующего изучения.

Недостатки

Формальдегид представляет значительный риск для здоровья персонала, включая раздражение дыхательных путей, кожи и глаз, а также является известным канцерогеном для человека.

Общие рекомендации

Использование формальдегида является приемлемым методом эвтаназии для видов *Porifera*. Формальдегид применяется в качестве дополнительного средства для эвтаназии кишечнорастных (медузы, кораллы, анемоны) и брюхоногих моллюсков (улитки, слизни) только после того, как эти животные были переведены в невосприимчивое состояние с помощью других методов (например, хлорида магния). Формальдегид неприемлем в качестве первого шага или дополнительного метода эвтаназии для других видов животных.

Лидокаина гидрохлорид

Лидокаина гидрохлорид является местным анестетиком, который действует на ионные каналы нервов, блокируя движение натрия в клетку и приводя к нарушению нервной проводимости из-за неспособности генерировать потенциалы действия. Дополнительное изменение нервной передачи происходит из-за вызванного лидокаином ингибирования рецепторов, связанных с G-белком, и N-метил-D-аспаратных рецепторов. Местные анестетики иногда включали в растворы для эвтаназии на основе барбитуратов или эмбутрамидов, вводимых внутривенно, в первую очередь из-за их кардиодепрессивного действия.

Преимущества

1. Лидокаин недорогой, доступный анестетик, не является контролируемым веществом.
2. Лидокаин вызывает относительно быструю потерю функции коры головного мозга (смерть мозга) при интратекальном введении животным, находящимся под наркозом.
3. Это вещество оставляет относительно небольшое количество остатков в тканях и ожидается, что оно не будет представлять опасности для животных-падальщиков.

Недостатки

1. Для выполнения анестезии и интратекального введения требуется квалифицированный персонал с соответствующими техническими навыками.
2. Необходимо учитывать риск поедания животными остатков анестетика.
3. Рефлекторное (агональное) дыхание возникает иногда после потери электрической активности мозга.
4. Возможно заражение персонала энцефалитными заболеваниями (например, бешенством) из-за ликвора, взятого у животных с неизвестной болезнью.

Рекомендации

2% раствор лидокаина гидрохлорида при интратекальном пути введения является приемлемым вторичным веществом для эвтаназии животных под анестезией в ситуациях, когда другие методы эвтаназии недоступны или слишком дороги, или невозможно обеспечить надлежащую утилизацию тел.

Неприемлемые средства

Стрихнин, никотин, инсулин, кофеин, чистящие средства, растворители, пестициды, дезинфицирующие средства и другие токсичные вещества, не предназначенные специально для терапевтического применения или эвтаназии, неприемлемы для использования в качестве средств эвтаназии ни при каких обстоятельствах.

Сульфат магния, хлорид калия и нервно-мышечные блокаторы неприемлемы для использования в качестве средств эвтаназии у находящихся в сознании позво-

ночных животных. Эти вещества могут быть использованы для эвтаназии животных под наркозом или без сознания, как описано ранее.

Физические методы эвтаназии

Общие положения

Физические методы эвтаназии включают выпадающий болт-пистолет, выстрел из огнестрельного оружия, смещение шейного отдела позвоночника, обезглавливание, поражение электрическим током, микроволновое облучение сфокусированным лучом, обескровливание, мацерацию (мгновенное механическое уничтожение), оглушение и прокол (введения иглы или металлического стержня в мозг). При правильном использовании квалифицированным персоналом с исправным оборудованием физические методы эвтаназии могут вызывать меньше страха и беспокойства и быть более быстрыми, безболезненными, гуманными и практичными, чем другие формы эвтаназии. Обескровливание, оглушение и прокалывание не рекомендуются в качестве единственного средства эвтаназии, но могут рассматриваться как дополнение к другим способам или методам.

Некоторые специалисты считают, что физические методы эвтаназии могут вызывать эмоции, основанные на неприятных субъективных переживаниях. Однако бывают случаи, когда то, что воспринимается как «эмоционально неприятное», и то, что кажется более гуманным, вступают в противоречие. Несмотря на субъективные эмоции персонала, в определенных ситуациях физические методы могут быть наиболее подходящими для эвтаназии и быстрого облегчения боли и страданий. Персонал, использующий физические методы эвтаназии, должен быть хорошо обучен применяемому методу, чтобы обеспечить корректное проведение процедуры.

Поскольку большинство физических методов связано с травмами, существует неотъемлемый риск для животных и специалиста, проводящего процедуру. Если метод выполняется неправильно, персонал может получить травмы, или животное не будет подвергнуто эвтаназии; навыки и опыт сотрудников имеют первостепенное значение. После применения метода смерть должна быть подтверждена до утилизации останков.

Проникающие болт-пистолеты

Проникающие болт-пистолеты (ПБП) использовались для эвтаназии жвачных животных, лошадей, свиней, лабораторных кроликов, собак и альпак. Стандартные болт-пистолеты могут оказаться неприемлемыми для эвтаназии водяного буйвола. Механизм их действия — сотрясение мозга и травма полушария и ствола головного мозга. Более поздние исследования, проведенные с использованием крупного рогатого скота показывают, что изменение места, куда должен быть проведен выстрел, вверх увеличивает вероятность разрушения ствола мозга. Для обеспечения правильного расположения крепежных болтов важно обеспечить надлежащее закрепление. Полушарие и ствол головного мозга должны быть достаточно повреждены снарядами, чтобы вызвать внезапную потерю сознания и последующую смерть. Молодые быч-

ки и телки были успешно переведены в бессознательное состояние без нарушения ствола мозга с помощью мощного пневматического невыпадающего болт-пистолета.

Описаны соответствующие точки попадания болтов для различных видов. Признаками эффективного проникновения болта и смерти являются немедленный коллапс и несколько секунд тетанического спазма, за которыми следуют медленные движения задних конечностей с возрастающей частотой. Роговичный рефлекс должен отсутствовать, при этом глаза остаются открытыми.

Существует 2 типа ПБП: обычный ПБП и ПБП с нагнетанием воздуха. В обоих случаях болты проникают в мозг. В ПБП с нагнетанием воздуха последний под высоким давлением впрыскивается через болт в мозг, чтобы увеличить степень разрушения тканей. Пистолеты с пороховым приводом, в которых используется традиционный болт, доступны в размерах 9, 22 и 25-го калибра. Болт-пистолеты, работающие от сжатого воздуха (пневматические), также доступны в обычном исполнении и с нагнетанием воздуха. Все пистолеты с болтами требуют тщательного обслуживания и очистки после каждого дня использования. Отсутствие технического обслуживания является основной причиной выхода из строя как пороховых, так и пневматических пистолетов. Многократное срабатывание в течение длительного времени может снизить эффективность. Это связано с перегревом оружия.

Преимущества

1. Как обычные ПБП, так и ПБП с нагнетанием воздуха могут эффективно использоваться для эвтаназии животных в исследовательских учреждениях и на фермах, когда использование лекарств для этой цели нецелесообразно или опасно.
2. Отсутствует контаминация тканей животного химическими веществами.

Недостатки

1. Эвтаназия с помощью болта может быть эмоционально неприятной.
2. Смерть может не наступить, если оборудование не обслуживается и не используется должным образом.
3. Запрещается использовать проникающий болт для эвтаназии жвачных животных, которые будут использоваться в пищу, из-за опасений, связанных с контаминацией мяса прионами.
4. Поскольку ПБП является деструктивным методом, ткань головного мозга может оказаться непригодной для исследования. Сокращение конечностей, возникающие после выстрела в животное проникающим болтом, представляют собой спинальные рефлексы.

Общие рекомендации

Использование ПБП приемлемо при определенных условиях и является практическим методом эвтаназии лошадей, жвачных животных, свиней, кроликов и домашней птицы. Чтобы гарантировать смерть, рекомендуется, чтобы животные были немедленно подвергнуты второму этапу эвтаназии (например, обескровлены или у них проколот мозг), если только не используется мощное ружье с проникающим болтом, предназначенное для эвтаназии. Эти пистолеты стали доступны недавно и уменьшили необходимость применения дополнительного метода эвтаназии.

Жвачных животных, используемых в пищу, не следует разделять на части, чтобы избежать загрязнения туши прионами. Пистолеты с проникающим болтом, используемые для более крупных видов, должны иметь удлиненный затвор.

Непроникающие болты (НПБП)

Исследования показали, что НПБП менее эффективны для крупного рогатого скота, чем проникающие болты (ПБП). НПБП имеет широкую грибовидную головку, которая не проникает в мозг крупных млекопитающих, таких как взрослый крупный рогатый скот, свиньи убойного веса, свиноматки и взрослые овцы. Как правило, пистолеты НПБП только оглушают животных и не должны использоваться в качестве единственного метода эвтаназии. Правильное попадание в нужную точку имеет решающее значение для эффективного оглушения взрослой коровы. НПБП неэффективны для оглушения быков, взрослых свиней или крупного рогатого скота с длинной шерстью.

Недавно были разработаны специальные или пороховые пневматические пистолеты НПБП, которые успешно используются для эвтаназии поросят-сосунков массой до 9 кг.

Преимущество

Происходит меньшее повреждение головного мозга.

Недостатки

1. Пистолеты с НПБП только оглушают животных и поэтому, как правило, неэффективны в качестве единственного средства эвтаназии. Исключением являются непроникающие пневматические пистолеты с болтом, которые были специально созданы для эвтаназии поросят-сосунков, новорожденных жвачных животных и индюков.
2. В зависимости от степени разрушения черепа и мозга использование НПБП может препятствовать посмертной диагностике заболеваний головного мозга, включая губчатую и трансмиссивную губчатую энцефалопатию.

Общие рекомендации

В целом, пистолеты НПБП не следует использовать в качестве единственного метода эвтаназии. Однако специальные пневматические пистолеты с НПБП успешно использовались для эвтаназии поросят-сосунков, новорожденных жвачных животных и индюков.

Нанесенная вручную травма головы тупым предметом

Эвтаназию путем нанесения травмы головы тупым предметом вручную следует оценивать с точки зрения анатомических особенностей вида, в отношении которого она должна быть проведена, навыков тех, кто ее выполняет, количества животных, подлежащих эвтаназии, и среды, в которой это предстоит провести. Нанесенная вручную тупая травма головы может быть гуманным методом эвтаназии новорожденных животных с тонким черепом, если однократный резкий удар достаточной силы по центральным костям черепа может вызвать немедленное угнетение ЦНС

и разрушение мозговой ткани. При правильном выполнении потеря сознания наступает быстро. Персонал, наносящий ручную травму головы тупым предметом, должен быть надлежащим образом обучен и находиться под наблюдением на предмет владения этим методом эвтаназии.

Травма головы тупым предметом вручную использовалась в основном для эвтаназии мелких лабораторных животных с тонким черепом. Этот способ применялся для эвтаназии молодых поросят. При этом анатомические особенности новорожденных телят не позволяют использовать описанный метод для эвтаназии.

Персонал, которому приходится выполнять травму головы тупым предметом вручную, часто находит это эмоционально неприятным и быстро выгорает. Выгорание может привести к неверному выполнению, вызывая опасения по поводу его эффективности для большого количества животных. По этой причине Американская ветеринарная медицинская ассоциация призывает тех, кто использует травму головы тупым предметом вручную в качестве метода эвтаназии, активно искать альтернативные подходы.

Преимущества

1. Способ нанесения травмы головы тупым предметом вручную недорог и эффективен при правильном выполнении.
2. Травма тупым предметом не вызывает химического загрязнения тканей.

Недостатки

1. Травма тупым предметом, нанесенная вручную, вызывает недовольство персонала, которому приходится ее выполнять.
2. Многократное проведение процедуры может привести к выгоранию персонала, потере эффективности или проблемам в отношении гуманного обращения с животными.
3. Травма черепа может повредить ткани и помешать диагностике заболеваний головного мозга.

Общие рекомендации

Заменить, насколько это возможно, ручную тупую травму головы альтернативными методами. Травмирование тупым предметом вручную неприемлемо для новорожденных телят из-за их анатомических особенностей.

Выстрел

Правильно сделанный выстрел может вызвать немедленную анестезию и гуманную смерть. В некоторых случаях выстрел из огнестрельного оружия может быть единственным практическим методом эвтаназии. Стрельба должна производиться только высококвалифицированным персоналом, обученным обращению с огнестрельным оружием, и только в юрисдикциях, разрешающих законное использование огнестрельного оружия. Следует учитывать безопасность персонала, общественности и других животных, находящихся поблизости. Процедуру следует проводить на открытом воздухе и в местах, доступ к которым ограничен.

Во время выстрела в голову, если выбран именно такой метод эвтаназии содержащихся в неволе животных, огнестрельное оружие должно быть направлено так, чтобы пуля попала в мозг, вызывая мгновенную потерю сознания. При этом необходимо учитывать различия в расположении мозга и строении черепа у разных видов, а также энергетические потребности для проникновения в череп и пазухи. Описано точное место прицеливания для выстрела в голову у разных видов. Для диких животных и других свободно бродящих животных предпочтительной целевой областью должна быть голова. Однако целиться в голову может быть невозможно или нецелесообразно при попытке убийства с большого расстояния, когда для диагностики заболеваний необходимы диагностические образцы мозговой ткани (например, губчатые энцефалопатии), при этом пропущенные выстрелы могут привести к переломам челюсти или другим несмертельным травмам. В зависимости от ситуации следует выбрать соответствующее огнестрельное оружие с целью проникновения и разрушения мозговой ткани без выхода с противоположной стороны головы. Выстрел из огнестрельного оружия в сердце или шею не сразу приводит животных в бессознательное состояние.

Цервикальная дислокация

Вывих шейных позвонков используется в течение многих лет для эвтаназии, и когда его проводят хорошо обученные люди на соответствующих животных, представляется гуманным. Есть несколько научных исследований, подтверждающих это наблюдение. Этот метод использовался для эвтаназии мелких птиц, домашней птицы, мышей, неполовозрелых крыс (менее 200 г) и кроликов. Для мышей и крыс большой и указательный пальцы помещают по обеим сторонам шеи у основания черепа или, альтернативно, к основанию черепа прижимают стержень. Другой рукой быстро тянут основание хвоста или задние конечности, вызывая отделение шейных позвонков от черепа. Неполовозрелых кроликов держат в одной руке за голову, а в другой за задние конечности. Домашнюю и другую птицу следует держать за ноги (или за крылья, если взять за основание) и вытянуть шею, потянув за голову, прикладывая вентродорсальное вращательное движение к черепу. Раздавливание шейных позвонков и спинного мозга недопустимо, если только птица не потеряет сознание. Персонал должен пройти обучение на анестезированных и/или мертвых животных, чтобы продемонстрировать свои навыки.

Электрическая активность в головном мозге сохраняется в течение 13 с после смещения шейных позвонков у крыс. Имеются данные, что для некоторых классов домашней птицы смещение шейных позвонков может не вызывать немедленную потерю сознания.

Преимущества

1. Вывих шейных позвонков — это метод, который может вызвать быструю потерю сознания.
2. Химически не загрязняет ткани.
3. Метод очень быстрый.

Недостатки

1. Этот способ (вывих шейных позвонков) может быть эмоционально неприятен персоналу, выполняющему или наблюдающему данный метод.
2. Для выполнения метода требуется овладение техническими навыками, чтобы обеспечить быструю потерю сознания животного (птицы).
3. Его использование для эвтаназии ограничено мелкими птицами, домашней птицей, мышами, неполовозрелыми крысами (менее 200 г) и кроликами.

Общие рекомендации

Ручное смещение шейных позвонков допустимо в условиях эвтаназии мелких птиц, домашних птиц, мышей, крыс массой менее 200 г и кроликов, если оно выполняется лицами, продемонстрировавшими высокую степень технического мастерства. Если нет уверенности, что процедура будет выполнена надлежащим образом, то животные должны быть предварительно наркотизированы. У крыс массой более 200 г и кроликов большая мышечная масса шейного отдела, что делает ручное смещение шейного отдела физически трудным. Вывих шейных позвонков при выполнении на птице должен приводить к вывиху шейных позвонков без первичного разможнения позвонков и спинного мозга. Имеются данные, что у некоторых классов домашней птицы смещение шейных позвонков может не вызывать немедленной потери сознания. В этих случаях другие физические методы, такие как травма тупым предметом или обезглавливание, могут быть более гуманными и должны использоваться, когда они доступны или практически осуществимы.

Лица, ответственные за использование этого метода, должны убедиться, что персонал, выполняющий эвтаназию таким способом, прошел надлежащую подготовку и последовательно, гуманно и эффективно применяет его.

Обезглавливание

Обезглавливание может быть использовано для эвтаназии грызунов и мелких кроликов в испытательных центрах. Метод обеспечивает возможность получения анатомически неповрежденной ткани головного мозга для дальнейшего исследования.

Хотя было продемонстрировано, что электрическая активность в головном мозге сохраняется в течение 13–14 с после обезглавливания, однако доказано, что в этот период боль отсутствует.

В продаже имеются гильотины, предназначенные для мгновенного обезглавливания половозрелых грызунов и мелких кроликов. Для новорожденных грызунов можно использовать острые лезвия.

Преимущества

1. Обезглавливание — является быстрым методом эвтаназии.
2. Отсутствует контаминация тканей химическими веществами.

Недостатки

1. Фиксация, необходимая для выполнения обезглавливания, может быть болезненной для животных.

2. Интерпретация наличия электрической активности в мозге после обезглавливания до сих пор вызывает споры о гуманности процедуры.
3. Персонал, выполняющий этот метод, должен осознавать неотъемлемую опасность гильотины и принимать меры предосторожности для предотвращения травм.
4. Обезглавливание может быть эмоционально неприятным для персонала, выполняющего или наблюдающего за этим методом.

Общие рекомендации

Этот метод приемлем при определенных условиях, если он выполняется правильно и его можно использовать в исследовательских условиях, когда его выполнение входит в план эксперимента. Обезглавливание оправдано для исследований, где требуется неповрежденная и незагрязненная мозговая ткань. Оборудование, используемое для обезглавливания, должно поддерживаться в хорошем рабочем состоянии и регулярно обслуживаться для обеспечения остроты лезвий. Использование пластиковых конусов для сдерживания животных, по-видимому, снижает стресс от обращения с ними, сводит к минимуму вероятность травм персонала и улучшает положение животного. Лица, ответственные за использование этого метода, должны убедиться, что персонал, выполняющий обезглавливание, прошел надлежащую подготовку для этого и контролируется на предмет компетентности.

Поражение электрическим током

Переменный ток использовался для эвтаназии собак, крупного рогатого скота, овец, коз, свиней, кур, лисиц, норок и рыб. Электрический ток с частотой 50 или 60 Гц более эффективен, чем более высокие частоты. Поражение электрическим током вызывает смерть от фибрилляции сердца, которая вызывает церебральную гипоксию. Однако животные не теряют сознания в течение 10–30 с и более после начала фибрилляции сердца. Крайне важно, чтобы животные были без сознания и нечувствительны к боли, прежде чем их ударят током. Потеря сознания может быть вызвана любым методом, приемлемым или допустимым при определенных условиях, включая пропускание тока через мозг.

Параметры использования электричества для того, чтобы вызвать бессознательное состояние, легкодоступны. Когда электричество используется для эвтаназии, через мозг проходит ток, который вызывает большой эпилептический припадок. Признаками эффективной индукции припадка являются разгибание конечностей, опистотонус, ротация глазных яблок вниз и тонический (ригидный) спазм, переходящий в клонический спазм с возможной вялостью мышц.

Существует 3 метода использования электричества для эвтаназии: 1) это только голова; 2) 1-этапный: от головы к телу; 3) 2-этапный: голова и тело. Чтобы быть эффективными при эвтаназии, все эти 3 метода должны вызывать сильный эпилептический припадок.

При процедуре только для головы (метод 1), через голову пропускают электрический ток, чтобы спровоцировать припадок. Это вызывает временную потерю сознания продолжительностью от 15 до 30 с, но не мерцательную аритмию. По этой при-

чине при воздействии только на голову должна немедленно следовать вторичная процедура, вызывающая смерть. Для достижения смерти можно использовать электрически индуцированную сердечную фибрилляцию, обескровливание или другие подходящие дополнительные методы, которые следует проводить в течение 15 с после того, как животное потеряет сознание.

При одноэтапном подходе «голова к телу» (метод 2) электрический ток одно- моментно пропускают и через мозг, и через сердце. Это одновременно вызывает большой судорожный припадок и гибель животного вследствие остановки сердца. Поскольку электричество проходит через позвоночник, клинические признаки большого эпилептического припадка могут быть замаскированы; однако обычно можно увидеть слабую тоническую и клоническую фазу после 3-секундного применения. При подаче тока более чем на 3 с возможно блокирование тонических и клонических спазмов. Одноэтапный подход должен использоваться с настройками силы тока, которые научно подтверждены, чтобы вызвать припадок. Рекомендуемая сила тока: 1,25 А для свиней, 1 А для овец и 1,25 А для крупного рогатого скота. Сообщается, что 110 В при 60 Гц, подаваемые в течение 3 с, были эффективны для свиней массой до 125 кг.

В двухэтапном способе (метод 3) электрический ток пропускают через голову, чтобы вызвать потерю сознания, затем второй разряд — либо через бок тела, либо через грудную клетку, чтобы вызвать остановку сердца. Сообщается, что второй разряд тока, подаваемый через электрод, расположенный сбоку тела за передней конечностью, является эффективным.

Распространенная причина неспособности вызвать потерю сознания — неправильное размещение электродов. Эксперименты на собаках показали, что расположение электродов в обход мозга не приводит к мгновенной потере сознания. Когда электричество проходит только между передними и задними конечностями или шеей и ступнями, это вызывает фибрилляцию сердца, но не внезапную потерю сознания. Животное будет поражено электрическим током, но останется в сознании до тех пор, пока не умрет от фибрилляции сердца.

Для правильного размещения электрода при методе 1 (процедура только для головы) доступны три варианта, в том числе с обеих сторон головы между глазом и ухом, у основания уха с обеих сторон головы и по диагонали под одним ухом и над глазом на противоположной стороне головы. Для одноэтапного метода (метод 2) («голова к телу») головной электрод может быть размещен на лбу или непосредственно за ухом. Головной электрод нельзя помещать на шею, так как разряд тока пройдет, минуя головной мозг. Диагональное перемещение электрического тока по телу может быть достигнуто путем размещения головного электрода за одним ухом, а электрода тела — с противоположной стороны. При использовании двухэтапной процедуры (метод 3) эффективно размещение электрода на теле за передней конечностью.

Электроды, состоящие из металлической ленты или цепочки вокруг носа и ленты или цепочки вокруг грудной клетки, по-видимому, эффективны для свиней массой до 125 кг.

При использовании электрических методов эвтаназии должны отсутствовать следующие признаки возвращения к сознанию: ритмичное дыхание, рефлекс вы-

прямления, вокализация, моргание глазами и отслеживание движущегося объекта. У животных, лишенных сознания с помощью электричества, могут наблюдаться удушье и нистагм. Затрудненное дыхание не следует путать с ритмичным дыханием, а нистагм (быстрая вибрация или трепетание глаз) не следует путать с морганием (полное закрытие, а затем и полное открытие глаз, которое происходит произвольно, без стимуляции).

Преимущества

1. Умерщвление электрическим током является гуманным, если животное сначала потеряло сознание.
2. Химически не загрязняет ткани.
3. Экономично.

Недостатки

1. Поражение электрическим током может быть опасным для персонала.
2. Метод бесполезен для агрессивных животных, которых трудно зафиксировать.
3. Такой способ неприемлем с эмоциональной точки зрения из-за сильного разгибания и ригидности конечностей, головы и шеи.
4. Воздействие электрическим током может не привести к смерти мелких животных (менее 5 кг), потому что фибрилляция желудочков и циркуляторный коллапс не всегда сохраняются после прекращения действия тока.
5. Иногда метод неэффективен у обезвоженных животных.
6. Персонал должен быть знаком с надлежащим размещением электродов и использованием оборудования.
7. Необходимо использовать специальное оборудование.

Общие рекомендации

Эвтаназия электричеством допустима при определенных условиях. Это требует специальных навыков и оборудования, которые обеспечат прохождение через мозг тока достаточной силы, чтобы вызвать потерю сознания и тонические и клонические эпилептические спазмы. Потеря сознания должна наступить до мерцательной аритмии или одновременно. Мерцательная аритмия никогда не должна возникать до того, как животное потеряет сознание. Недопустимы методы подачи электрического тока в направлении от головы до хвоста, от головы на конечности или от головы на смоченные металлические пластины, на которых стоит животное. Двухэтапный метод следует использовать в ситуациях, когда могут возникать вопросы о достаточной силе тока, чтобы вызвать большой эпилептический припадок с тоническими и клоническими спазмами. Этот подход позволяет наблюдать тонические и клонические спазмы до того, как будет применен второй разряд тока, чтобы вызвать остановку сердца. Несмотря на то, что он приемлем при соблюдении вышеупомянутых требований, недостатки метода перевешивают его преимущества в большинстве случаев. Электроиммобилизация, парализующая животное без предварительной седации крайне неприятна и неприемлема.

Мацерация

Мацерация (мгновенное механическое уничтожение) с использованием специально разработанного механического аппарата с вращающимися лопастями или выступами вызывает немедленное дробление и гибель домашней птицы в возрасте до 72 ч и яиц с эмбрионами. Обзор использования коммерчески доступных мацераторов для эвтаназии цыплят, индюшат и яиц без скорлупы показывает, что смерть от мацерации у домашней птицы в возрасте до 72 ч наступает немедленно с минимальной болью и дистрессом. Мацерация является альтернативой использованию CO₂ для эвтаназии домашней птицы в возрасте до 72 ч. Мацерация считается эквивалентной смещению шейного отдела позвоночника и сдавлению черепа и считается приемлемым средством эвтаназии для недавно вылупившихся домашних птиц.

Преимущества

1. Смерть наступает почти мгновенно.
2. Метод безопасен для персонала.
3. Можно быстро подвергнуть эвтаназии большое количество животных.

Недостатки

1. Требуется специальное оборудование, причем оно должно содержаться в отличном рабочем состоянии.
2. Персонал должен пройти обучение для обеспечения надлежащей эксплуатации оборудования.
3. Мацерированные ткани могут представлять угрозу биобезопасности.

Общие рекомендации

Для мацерации требуется специальное оборудование, которое необходимо поддерживать в рабочем состоянии. Цыплята должны быть доставлены в измельчитель таким образом, чтобы они не задерживались в точке входа в измельчитель, и это не смогло бы причинить им страданий: травм, удушья или предотвратимого стресса перед мацерацией.

Микроволновое облучение сфокусированным лучом

Нагрев сфокусированным пучком микроволнового излучения используется в основном нейробиологами для фиксации метаболитов мозга *in vivo* при сохранении анатомической целостности мозга. Микроволновые приборы были специально разработаны для эвтаназии лабораторных мышей и крыс. Приборы отличаются конструкцией от кухонных микроволновых печей, и их максимальная выходная мощность составляет от 1,3 до 10 кВт. Микроволновая энергия устройств направлена на голову животного. Мощность, необходимая для быстрого прекращения активности ферментов мозга, зависит от эффективности устройства, способности настраивать резонансную полость, и размера головы грызуна. Устройства существенно различаются по времени воздействия, которое необходимо, чтобы животное было

эвтаназируются. С помощью прибора мощностью 10 кВт, 2450 МГц, работающего с мощностью 9 кВт, можно повысить температуру мозга мышей массой 18–28 г до 79 °С за 330 мс, а крыс массой 250–420 г до 94 °С за 800 мс.

Преимущества

1. Потеря сознания достигается менее чем за 100 мс, а смерть — менее чем за 1 с.
2. Это наиболее эффективный метод фиксации ткани головного мозга *in vivo* для последующего анализа ферментативно лабильных химических веществ.

Недостатки

1. Устройства дорогие.
2. Только животные размером с мышь и крысу могут быть подвергнуты эвтаназии с помощью доступных в настоящее время коммерческих инструментов.

Общие рекомендации

Микроволновое облучение сфокусированным пучком — гуманный метод эвтаназии мелких лабораторных грызунов, если используются инструменты, вызывающие быструю потерю сознания. Можно использовать только те устройства, которые предназначены для этого и имеют соответствующую мощность и распределение микроволн. Микроволновые печи, предназначенные для бытовых целей, недопустимы для эвтаназии.

Вспомогательные методы

Обескровливание

Обескровливание можно использовать для эвтаназии у животных после оглушения или находящихся без сознания, поскольку из-за выраженной гиповолемии, обескровливание нельзя применять как единственный способ эвтаназии. Животных можно обескровливать для получения продуктов крови, но только в том случае, если они находятся под действием седативных средств, оглушены или анестезированы.

Прокол (введение иглы или металлического стержня в мозг)

Как правило, прокалывание используется в качестве дополнительной процедуры для обеспечения эвтаназии животного, которое было приведено в бессознательное состояние другими способами. Для некоторых видов, таких как лягушки, с анатомическими особенностями, облегчающими легкий доступ к ЦНС, прокол может использоваться в качестве единственного средства эвтаназии, но более подходящей является передозировка анестетика.

Прокол у жвачных животных осуществляется путем введения стержня или инструмента для прокола через отверстие, образованное в черепе с помощью ПБП или посредством свободной пули. Персонал манипулирует инструментом для прокола, чтобы существенно разрушить ткань ствола головного и спинного мозга. Мышечная активность во время прокола может быть значительной, но за ней следует затишье, что облегчает обескровливание или другие процедуры. Прокол иногда ис-

пользуется перед обескровливанием, чтобы уменьшить непроизвольные движения оглушенных животных. Этот метод не следует использовать у жвачных животных, предназначенных для употребления в пищу, из-за возможного загрязнения мяса прионами.

В продаже есть одноразовые стержни. Стержень должен быть жестким, но гибким и иметь достаточную длину, чтобы достичь головного и позвоночного столба через точку доступа в черепе.

Методы эвтаназии в зависимости от вида и окружающей среды

Животные-компаньоны

Методы, приемлемые при определенных условиях, эквивалентны приемлемым методам, когда могут быть соблюдены все критерии применения метода.

Общие положения

Животные-компаньоны, эвтаназия которых признана необходимой, обычно встречаются в 4 основных средах: находящиеся в индивидуальном владении; племенные (от маток, производителей и единичных пометов до колоний племенных животных); популяции животных, содержащиеся в учреждениях по контролю за животными и приютах, а также в зоомагазинах; и животные, содержащиеся в исследовательских лабораториях. Примеры менее распространенных мест, где могут быть подвергнуты эвтаназии домашние животные, включают карантинные станции и ипподромы для борзых. Отношения между животными-компаньонами и их владельцами или опекунами различны, поэтому их следует тщательно учитывать и уважать при выборе подхода к эвтаназии для этих видов.

Эвтаназию животных-компаньонов лучше всего проводить в тихой, знакомой обстановке, когда это целесообразно. Виды, подлежащие эвтаназии, причина эвтаназии, а также наличие оборудования и персонала будут способствовать принятию решений о наиболее подходящем месте. Профессиональное суждение ветеринара, проводящего эвтаназию или обеспечивающего надзор за ней, имеет первостепенное значение при принятии надлежащих решений об эвтаназии (например, о месте, средстве, способе введения) видов, содержащихся в качестве компаньонов, и в конкретных условиях, где они встречаются. Персонал, проводящий эвтаназию, должен иметь полное представление об используемом методе эвтаназии и хорошо владеть им.

Для животных-компаньонов, находящихся в индивидуальном владении, эвтаназия часто проводится в отдельной комнате в ветеринарной клинике или дома, чтобы свести к минимуму страдания животного и владельца. Факторы, приведшие к решению об эвтаназии, должны обсуждаться открыто, и владельцу животного должно быть разрешено присутствовать во время эвтаназии, когда это возможно. Владельцы должны быть полностью информированы о процессе, который они со-

бираются наблюдать, в том числе о возможном возбуждении во время анестезии и других осложнениях. Если один метод эвтаназии оказывается трудным, следует немедленно попробовать другой. Попытки эвтаназии следует предпринимать только при наличии необходимых лекарств и расходных материалов для обеспечения беспрепятственной процедуры, а после подтверждения смерти владельцы должны быть уведолены устно.

В системах контроля за животными, приютах и спасательных операциях, исследовательских лабораториях и других учреждениях эвтаназию часто проводит обученный технический персонал, а не ветеринары. Обучение и мониторинг этих людей на предмет их квалификации в США варьируют в зависимости от конкретного штата. Постоянное проведение эвтаназии большого количества животных может вызвать стресс и привести к симптомам профессионального выгорания от сострадания. Чтобы свести к минимуму стресс и требования, связанные с этой обязанностью, обученный персонал должен быть уверен, что он проводит процедуру максимально гуманным способом. Это требует от организации приверженности обеспечению постоянного профессионального обучения новейшим методам и материалам, доступным для эвтаназии, и эффективного избавления персонала от симптома выгорания, связанного с состраданием. Кроме того, персонал должен быть знаком с методами фиксации и эвтаназии в отношении всех видов, которые могут встретиться в их учреждении.

Места, где проводится эвтаназия в учреждениях, должны быть по возможности изолированы от других видов деятельности, чтобы свести к минимуму стресс для животных и предоставить персоналу профессиональное и специальное рабочее место. Надлежаще спроектированное помещение для эвтаназии обеспечивает хорошее освещение и возможность приглушения или увеличения яркости света при необходимости, вентиляцию, адаптируемые приспособления и достаточное пространство, по крайней мере, для двух человек, которые могут свободно передвигаться при хэндлинговании или фиксации животных. Следует предпринять попытки свести к минимуму запахи и звуки, которые могут вызвать стресс у животных, подлежащих эвтаназии. Базовое оборудование для обработки и фиксации, весы, машинки для стрижки, жгуты, стетоскоп, средства для дезинфекции, различные иглы и шприцы, а также мешки для трупов должны быть легкодоступны. Кроме того, должна быть доступна аптечка для оказания первой помощи при незначительных травмах персонала, причем сотрудникам всегда следует обращаться за медицинской помощью при укусах и более серьезных травмах.

Приемлемые методы

Неингаляционные средства

Барбитураты и производные барбитуровой кислоты — внутривенная инъекция производного барбитуровой кислоты является предпочтительным методом эвтаназии собак, кошек и других мелких домашних животных. Барбитураты, вводимые внутривенно, могут применяться отдельно в качестве единственного средства эвтаназии или второго шага после седации или общей анестезии. Рекомендуемые дозы указаны на этикетке продукта.

Когда доступ к внутривенному введению может быть трудным, опасным или нецелесообразным (например, у животных небольшого размера, таких как щенки, котята, маленькие собаки и кошки, грызуны и некоторые другие домашние виды), или возникают поведенческие соображения (некоторые мелкие экзотические млекопитающие и дикие животные), барбитураты и производные барбитуровой кислоты можно вводить внутрибрюшинно. Из-за потенциального раздражения брюшины и боли (наблюдается у крыс) лидокаин с некоторым успехом применялся у крыс для облегчения дискомфорта. Лидокаин также использовался в сочетании с пентобарбиталом натрия при лабораторном сравнении путей интраперитонеального и внутривенного введения у кошек из приютов для животных. Необходимы дополнительные исследования, чтобы определить применимость и дозу для других видов.

Передозировка небарбитурных анестетиков — передозировка инъекционного анестетика (например, комбинация кетамина и ксилазина, вводимых внутривенно, внутрибрюшинно или внутримышечно, или пропофол, вводимый внутривенно) приемлема для эвтаназии, если размер животного, требования по ограничению свободы или другие обстоятельства указывают на то, что эти препараты являются лучшим вариантом для эвтаназии. Гарантия быстрой смерти имеет первостепенное значение и может потребовать второго шага, то есть использования барбитуратов или дополнительных доз анестетика.

Трибутам — хотя в настоящее время препарат не производится, он является приемлемым для эвтаназии собак при условии, что он вводится внутривенно должным образом обученным человеком в рекомендуемых дозах и с надлежащей скоростью. Если барбитураты недоступны, также допустимо их применение у кошек с дополнительной маркировкой. Способы введения, отличные от внутривенных инъекций, неприемлемы. Эстетически неприемлемое агональное дыхание может возникать у животных без сознания, поэтому использование трибутама для эвтаназии, в случае когда присутствует владелец, не рекомендуется. Хотя это и сбивает с толку наблюдателей, поскольку животное находится без сознания, предсмертное дыхание оказывает ограниченное влияние на его благополучие.

T-61 приемлем в качестве средства эвтаназии при условии, что он вводится должным образом обученным персоналом. Необходима медленная внутривенная инъекция, чтобы избежать мышечного паралича до потери сознания. Другие способы введения неприемлемы.

Методы приемлемые с учетом условий

Неингаляционные средства

Барбитураты и производные барбитуровой кислоты (альтернативные пути введения) — внутрибрюшинный путь нецелесообразен для средних и крупных собак из-за объема препарата, который необходимо ввести, и длительного времени до смерти. Лучшим выбором для этих животных, когда внутривенный доступ недостижим с использованием ручной фиксации, является общая анестезия с последующей внутриорганный инъекцией. У животных без сознания или под наркозом внутриорганные инъекции [например, внутрикостные (рис. 3), внутри-

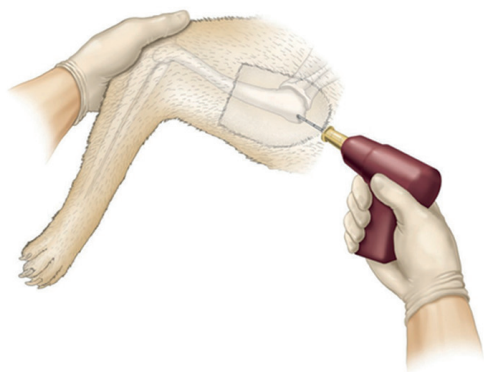


Рис. 3. Рекомендуемое место (большой бугорок плечевой кости) для внутрикостной инъекции взрослым собакам с использованием пистолета для костных инъекций. Альтернативой является использование иглы Джамшиди для костного мозга или у очень молодых собак иглы для подкожных инъекций

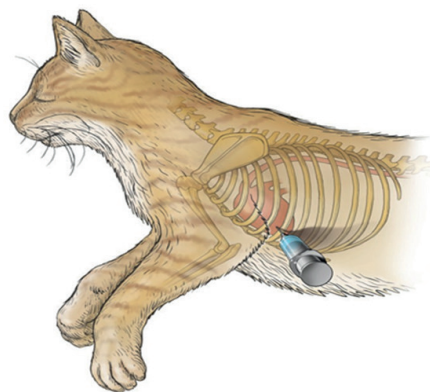


Рис. 4. Место для введения внутрисердечных инъекций у кошки. Внутрисердечная инъекция уместна только у животных, находящихся в бессознательном состоянии или под наркозом

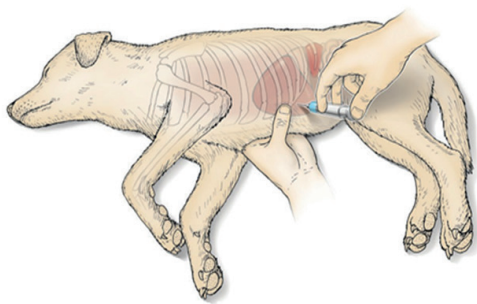


Рис. 5. Место для введения собаке внутривисцеральных и интраселезеночных инъекций. На этом рисунке инъецируется печень; селезенка изображена красным каудальнее печени и желудка. Внутривисцеральные и интраселезеночные инъекции подходят только животным без сознания или под наркозом, за исключением внутривисцеральных инъекций у кошек, как описано в тексте

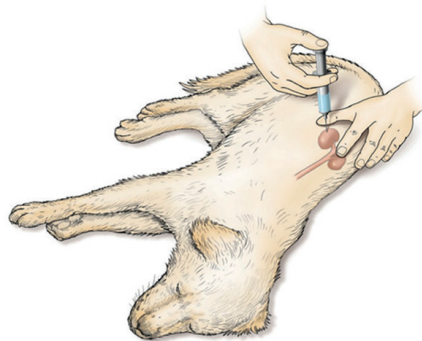


Рис. 6. Место для введения внутривисцеральной инъекции собаке. Внутривисцеральная инъекция подходит только животным без сознания или под наркозом

сердечные (рис. 4), внутривенные (рис. 5) и внутривенные (рис. 6)] можно использовать в качестве альтернативы внутривенному или внутривенному введению барбитуратов, когда внутривенный доступ затруднен. Внутривенные инъекции могут увеличить скорость поглощения барбитуратов по сравнению со стандартными внутривенными инъекциями, поэтому в присутствии владельца этот подход может быть предпочтительнее внутривенного введения. Внутривенная инъекция комбинации пентобарбитала натрия и лидокаина бодрствующим кошкам из приютов для животных вызывала быструю потерю сознания и была проведена более точно, чем интраперитонеальные инъекции. Таким образом, внутривенная инъекция бодрствующим кошкам может иметь ограниченное применение в контролируемых условиях, если ее проводит обученный персонал. Однако положение бодрствующих кошек во время внутривенных инъекций должно быть вертикальное с приподнятыми передними конечностями, а не лежа на боку.

Ингаляционные вещества

Ингаляционные анестетики — передозировки ингаляционных анестетиков, вводимых через камеру (например, изофлурана, севофлурана), допустимы при условиях эвтаназии мелких млекопитающих и некоторых других видов массой менее 7 кг, поскольку большинство позвоночных проявляют неприязнь к ингаляционным анестетикам. Из-за потенциальной возможности восстановления необходимо позаботиться о том, чтобы убедиться, смерть наступила до утилизации останков животного. Ингаляционные анестетики также могут быть использованы для обезболивания мелких капризных животных перед введением инъекционного средства для эвтаназии.

Моноксид углерода можно эффективно использовать для эвтаназии при соблюдении необходимых условий для введения. Эти условия могут быть сложными и дорогостоящими на практике, при этом может существовать значительный риск для персонала (гипоксия), если меры безопасности не соблюдаются. Следовательно, угарный газ приемлем в условиях для использования в учреждениях, где имеется надлежащим образом спроектированное и обслуживаемое оборудование, а также обученный и контролируемый персонал для его введения, но он не рекомендуется для обычной эвтаназии кошек и собак. Его можно рассматривать в необычных или редких обстоятельствах, таких как стихийные бедствия и крупномасштабные вспышки заболеваний. По возможности для животных-компаньонов рекомендуются альтернативные методы с меньшим количеством условий и недостатков.

Диоксид углерода может эффективно использоваться для эвтаназии при соблюдении необходимых условий для введения. Однако, как и в случае использования CO, это может быть сложным и дорогостоящим на практике. Углекислый газ допустим при соблюдении условий для использования в учреждениях, где имеются надлежащим образом спроектированное и обслуживаемое оборудование, а также обученный персонал, осуществляющий мониторинг, для его применения, но он не рекомендуется для обычной эвтаназии кошек и собак. Этот метод можно рассматривать в необычных или редких обстоятельствах, включая, но не ограничива-

ьясь ими, стихийные бедствия и крупномасштабные вспышки заболеваний. Там, где возможно, для животных-компаньонов рекомендуются альтернативные методы с меньшим количеством условий и недостатков.

Физические методы

Выстрел — стрельба из огнестрельного оружия должна производиться только высококвалифицированным персоналом, обученным обращению с огнестрельным оружием и только в юрисдикциях, разрешающих законное использование огнестрельного оружия. Метод, приемлемый с учетом условий, может быть уместным в отдаленных районах или чрезвычайных ситуациях, когда ограничение огнестрельного оружия приведет к длительной, невыносимой боли и страданиям животного или к непосредственной опасности для жизни человека. Описаны протоколы обеспечения гуманной смерти от огнестрельного оружия и предпочтительные анатомические места для использования огнестрельного оружия у собак и кошек (рис. 7 и 8). Седация перед эвтаназией (например, лекарство, добавленное в пищу) рекомендуется, когда это возможно, для кошек, поскольку их может быть трудно гуманно застрелить. Выстрел из огнестрельного оружия не рекомендуется в качестве рутинного метода эвтаназии собак, кошек или других мелких животных-компаньонов, его не следует использовать, когда доступны и осуществимы другие методы.

ПБП — использование ПБП обученным персоналом в контролируемых лабораторных условиях было описано как эффективный и гуманный метод эвтаназии кроликов и собак. Болт должен располагаться прямо напротив черепа, следовательно, безопасному и эффективному применению этого метода может способствовать седация или анестезия перед эвтаназией. Проникающий болт не рекомендуется в качестве рутинного способа эвтаназии собак, кошек или других мелких домаш-

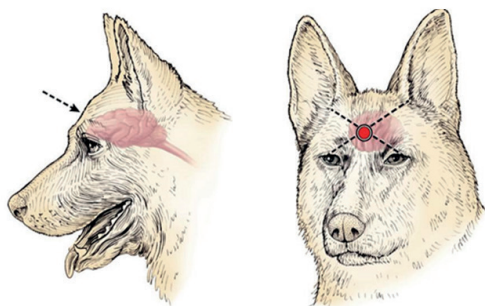


Рис. 7. Анатомическое место выстрела для собак расположено посередине между уровнем глаз и основанием ушей, немного отклоняясь от средней линии, с прицелом, направленным вдоль туловища собаки по направлению к позвоночнику

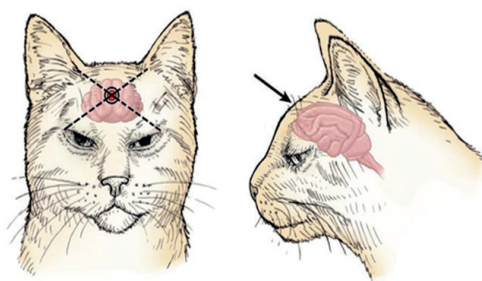


Рис. 8. Анатомическим местом выстрела для кошек является точка, расположенная немного вентральнее линии, проведенной между медиальными основаниями ушей, или пересечения линий, расположенных между латеральными уголками глаз и медиальными основаниями ушей, как показано на рисунке

них животных и не должен использоваться, когда доступны и осуществимы другие методы.

Вспомогательные методы

Хлорид калия (75–150 мг/кг), вводимый внутривенно или внутрисердечно, может быть использован для эвтаназии животных-компаньонов, когда они находятся без сознания (не реагируют на вредные раздражители) или под общей анестезией. Применение хлорида калия у бодрствующих животных недопустимо.

Азот или *аргон* — методы постепенного замещения воздуха с использованием азота или аргона отдельно или с другими газами у бодрствующих собак и кошек может привести к гипоксии до потери сознания. Таким образом, введение азота или аргона (менее 2% O₂) следует использовать только в качестве дополнительного метода эвтаназии собак и кошек без сознания или под наркозом. По мере возможности рекомендуются альтернативные методы с меньшим количеством условий и недостатков.

Электрошок — для эвтаназии может применяться переменный электрический ток у собак, находящихся без сознания (например, под общей анестезией). Недостатки поражения электрическим током перевешивают его преимущества, поэтому такой способ не рекомендуется для обычного применения у животных-компаньонов. По возможности следует использовать альтернативные методы с меньшим количеством условий и недостатков.

Неприемлемые методы

За исключением внутримышечного введения некоторых инъекционных анестетиков, подкожный, внутримышечный, внутрилегочный и интратекальный пути введения неприемлемы для введения инъекционных средств для эвтаназии из-за ограниченной доступной информации об их эффективности и высокой вероятности боли, связанной с инъекцией в бодрствующем состоянии животных.

Бытовая химия, дезинфицирующие и чистящие средства, пестициды не допускаются к применению в качестве средств эвтаназии.

Другие неприемлемые подходы к эвтаназии включают переохлаждение и утопление.

Особые примечания

Агрессивные и непокорные животные

Животные, которых невозможно безопасно и гуманно обездвигнуть, должны быть подвергнуты седации с помощью лекарств, поступивших перорально (например, желатиновых капсул для доставки лекарств с пищей, жидких составов, впрыскиваемых в рот) или дистанционно (например, дротрики, шприцы с шестом), до введения средств эвтаназии. Это поможет уменьшить тревогу и боль животного, а также снизит риски безопасности для персонала. Существует множество препаратов для предварительной эвтаназии, которые можно вводить перорально, подкожно

или внутримышечно, отдельно или в комбинации, чтобы привести животных в бессознательное состояние при минимальном контакте при подготовке к эвтаназии.

Утилизация останков животных

Остатки средств, используемых для эвтаназии (пентобарбитал) животных компаньонов, могут контаминировать в их останках и при ненадлежащей утилизации трупов, могут возникать ситуации поедания трупов дикими животными, что может привести к их смерти.

Плоды и новорожденные

Научные данные указывают на то, что эмбрионы и плоды млекопитающих находятся в бессознательном состоянии на протяжении всей беременности и родов. У собак и кошек это отчасти связано с умеренной неврологической незрелостью, когда чувствительность достигается через несколько дней после рождения. Плоды морских свинок, имеющие патологические изменения, в течение 75–80% срока беременности до рождения находятся без сознания из-за влияния различных веществ (например, аденозина, аллопрегнанолона, прегнанолона, простагландина D₂, нейроингибитора плацентарного пептида) и гипоксического торможения цереброкортикальной активности. Считается, что в связи с выше описанным, эмбрионы и плоды не могут сознательно испытывать удушье а или боль, а значит они не испытывают страдания при гибели родительского организма, вне зависимости от причины смерти.

Эвтаназию собак, кошек и других млекопитающих на среднем или позднем сроке беременности следует проводить с помощью инъекции барбитурата или производного барбитуровой кислоты (например, пентобарбитала натрия), как описано ранее. Плоды следует оставить в матке в покое на 15–20 мин после подтверждения смерти матери. По возможности следует избегать внутрибрюшинных инъекций пентобарбитала на более поздних сроках беременности из-за вероятности непреднамеренного попадания в матку, что сделает инъекцию неэффективной.

Новорожденные млекопитающие и млекопитающие перед отъемом относительно устойчивы к методам эвтаназии, которые основаны на гипоксии как способе действия. Также трудно, если вообще возможно, получить венозный доступ. Таким образом, внутрибрюшинная инъекция пентобарбитала является рекомендуемым методом эвтаназии у собак, кошек и мелких млекопитающих перед отъемом. Внутрикостная инъекция также может быть использована, если применяется стратегия минимизации дискомфорта от инъекции с использованием внутрикостных катетеров.

При овариогистерэктомии у беременных собак и кошек и мелких млекопитающих с недоношенными новорожденными перевязка маточных сосудов с задержкой плода внутри матки приводит к гибели плодов. Устойчивость недоношенных новорожденных (например, кошек, собак, мышей, крыс) к методам эвтаназии, механизмы которых основаны на гипоксии, предполагает, что матку не следует вскрывать 1 ч или дольше. В случае кесарева сечения на поздних сроках беременности интраперитонеальная инъекция пентобарбитала рекомендуется для плодов с патологическими изменениями, которые подлежат эвтаназии.

Условия для разведения

Протоколы эвтаназии в крупных питомниках могут отличаться от протоколов, используемых в условиях клинической практики. Показаниями к эвтаназии в племенных учреждениях являются новорожденные с врожденными дефектами, приобретенными аномалиями или заболеваниями в любой части популяции или другими состояниями, делающими животных непригодными для разведения или продажи. Эвтаназию можно проводить индивидуально или в группе животных. Метод эвтаназии определяется видом животных, размером, возрастом и количеством особей, подлежащих эвтаназии. Барбитураты обычно вводят внутривенно или внутривентриально для индивидуальной эвтаназии любого вида, а также для всех возрастов собак и кошек. Углекислый газ обычно используется для индивидуальной или групповой эвтаназии мелких животных, включая хорьков, грызунов и кроликов. Независимо от метода и количества животных, подлежащих эвтаназии, процедуры должны выполняться профессионально и с состраданием, обученными людьми под ветеринарным надзором. Соответствующие методы обеспечения эвтаназии должны применяться индивидуально, независимо от количества животных, подвергаемых этой процедуре.

Лабораторные животные

Эвтаназия животных в научных учреждениях должна быть одобрена комиссией. Комиссия рассматривает благополучие животных, требования к образцам тканей и влияние средств/методов эвтаназии на результаты исследования. Научные сотрудники и ветеринарные специалисты могут «привязываться» к животным, испытывать эмпатию, что может привести к профессиональному выгоранию.

Общие положения

Общая информация о домашних и сельскохозяйственных животных, пойкилотермах и птицах приведены в других разделах руководства и обычно применимы к этим видам и в лабораторных условиях. Наиболее часто используемые виды лабораторных животных (мелкие грызуны) рассматриваются далее.

В дополнение к гуманным соображениям важным фактором при выборе метода эвтаназии лабораторных животных являются цели исследования на животных, подлежащих эвтаназии. Методы эвтаназии могут оказать влияние на результаты исследований, приводя к искажению данных биохимического, гематологического или гистологического анализа. Например, изофлуран может повышать концентрацию глюкозы в крови, в то время как внутривентриальное введение барбитуратов приводит к патологическим изменениям в ткани кишечника, а эвтаназия с использованием CO₂ может повысить концентрацию калия в сыворотке. Время, прошедшее между эвтаназией и забором тканей, также может быть решающим фактором, влияющим на выбор метода эвтаназии. Исследовательские потребности могут вызвать необходимость использования дополнительного метода (например, двусторонней торакотомии, обескровливания, перфузии фиксирующими средствами, инъекции хлорида калия). Применение таких дополнительных методов допустимо, когда животное полностью анестезировано. Животные, используемые в исследованиях инфекционных заболе-

ваний, могут требовать особого обращения с точки зрения влияния, оказываемого на здоровье и безопасность участвующих в эксперименте животных и человека.

Мелкие лабораторные и пойманные в дикой природе грызуны (мыши, крысы, хомяки, морские свинки, песчанки, дегу, хлопковые крысы и т.д.)

Все действия, связанные с эвтаназией грызунов, заслуживают рассмотрения, эквивалентного самому методу эвтаназии, и могут учитываться при его выборе. Действия, которые способствуют дистрессу у грызунов, включают транспортировку, хэндлинг (у непривычных к этому животных), разрушение социальных групп и устранение установленных запаховых меток. Поскольку устранение всех источников дистресса может оказаться нецелесообразным или невозможным, выбранный метод эвтаназии грызунов должен свести к минимуму эти источники потенциального дистресса. Методы эвтаназии, вызывающие вокализацию или выделение феромонов, которые другие животные в комнате могли бы соответственно услышать или учуять, лучше всего проводить в другом месте, если стресс при транспортировке можно свести к минимуму. Точно также следует обращаться с пойманными в дикой природе животными и подвергать их эвтаназии так, чтобы это вызывало наименьший стресс. Летальный исход должен быть подтвержден физическим осмотром, при необходимости могут быть использованы дополнительные методы констатации смерти.

Приемлемые методы

Барбитураты и производные барбитуровой кислоты — инъекционные барбитураты и комбинации барбитуратов обычно действуют быстро и плавно, вызывая бессознательное состояние грызунов. Доза для эвтаназии обычно в 3 раза превышает таковую для анестезии. Пентобарбитал является наиболее часто используемым барбитуратом для лабораторных грызунов из-за его длительного срока годности и быстроты действия. Имеются сообщения о том, что при внутрибрюшинном введении барбитуратов может развиваться болевой синдром, но степень боли и подходящий метод ее контроля еще предстоит определить. Одновременное применение местных анестетиков и противосудорожных средств может помочь в предотвращении боли, однако следует учитывать, что эти соединения также могут вызывать боль при внутрибрюшинном введении.

Комбинации диссоциирующих средств — у грызунов, находящихся в сознании, кетамин и аналогичные диссоциирующие средства следует применять в комбинации с агонистом α_2 -адренорецепторов, таким как ксилазин, или бензодиазепинами, например, диазепамом.

Методы, приемлемые с учетом особых условий

Ингаляционные средства

Галогенированные анестетики — галотан, изофлуран, севофлуран или десфлуран с закисью азота или без нее приемлемы в условиях эвтаназии лабораторных грызунов. Эти средства могут быть полезны в случаях, когда физическое сдержи-

вание затруднено или непрактично. При использовании в качестве единственного средства для эвтаназии, доставляемого через испаритель для введения анестетика и передозировки, на животных может потребоваться длительное воздействие, чтобы обеспечить эвтаназию. Смертельный исход может наступить быстро при использовании метода нанесения жидкого анестетика на вату или марлю, если животному не разрешается непосредственно контактировать с анестезирующей жидкостью.

Углекислый газ с премедикацией галогенсодержащими анестетиками или без нее допустим в условиях эвтаназии мелких грызунов. Сжатый CO_2 в баллонах является рекомендуемым источником CO_2 , потому что приток газа в камеру можно точно регулировать.

Поступивший CO_2 в систему для эвтаназии должен заполнять от 30% до 70% объема камеры или клетки в минуту, при этом следует учитывать, что существует вероятность усиления дистресса из-за одышки при более низких скоростях потока или боли в слизистой оболочке, связанной со скоростями потока на верхних границах этого диапазона. Однако, поскольку нет четких доказательств скорости потока, которая оптимально сводит к минимуму как боль, так и дистресс для всех видов, полов и генетического фона, ветеринары должны использовать свое профессиональное суждение, чтобы определить, какая скорость потока предпочтительнее для тех или иных обстоятельств. Не рекомендуется помещать животных в предварительно заполненные камеры из-за возможности появления сильной боли при вдыхании газа. Если эвтаназия проводится не в домашней клетке, камеры для эвтаназии следует обрабатывать перед каждым использованием. Добавление O_2 в CO_2 продлит время до смерти и может затруднить определение сознания.

Монооксид углерода — несмотря на то, что CO (угарный газ) обычно не используется в исследованиях на лабораторных животных, он приемлем для эвтаназии грызунов, когда могут быть соблюдены условия для эффективного и безопасного использования.

Закись азота — это слабый анестетик, при использовании которого проходит длительное время до потери сознания, и его не следует использовать отдельно. Закись азота можно применять в сочетании с другими газами, чтобы сократить время до потери сознания.

Неингаляционные средства

Трибромэтанол недоступен в качестве продукта коммерческого или фармацевтического качества, несмотря на это, он является широко используемым анестезирующим средством для грызунов. Его применение вызывает споры из-за сообщений о побочных эффектах (перитонит и смерть). Однако многие комиссии по благополучию животных одобрили его использование у грызунов. Поскольку нет сообщений о применении трибромэтанола в качестве единственного средства для эвтаназии, его рекомендуется использовать только как анестетик перед применением утвержденного вторичного метода. Трибромэтанол необходимо правильно готовить и хранить, а также вводить в соответствующей дозе.

Спирт этиловый — внутривенные инъекции 70–100% этанола могут быть подходящим методом эвтаназии для взрослых мышей, когда физические методы нежелательны, или другие средства эвтаназии недоступны. Мыши, которым вво-

дили 0,5 мл 70% или 100% этанола, демонстрировали постепенную потерю мышечного контроля, восстанавливающего рефлекса, остановку дыхания и сердца и смерть в течение 2–4 мин. Использование этанола у мышей в возрасте до 35 дней сомнительно из-за длительного латентного периода до гибели. Введение этанола не рекомендуется более крупным видам, таким как крысы, из-за необходимости использования большого объема, чтобы вызвать смертельный исход.

Ингаляционные средства

Вывих шейных позвонков (цервикальная дислокация) используется в лабораторных условиях. Цервикальная дислокация не требует ни специального оборудования, ни транспортировки животного, а ткани остаются незагрязненными химическими средствами. Потеря корковой функции после шейного вывиха происходит быстро, в течение 5–10 с, что подтверждает значительное снижение амплитуды ЭЭГ.

Вывих шейных позвонков может быть использован для эвтаназии мышей и крыс массой менее 200 г. Персонал должен пройти обучение на анестезированных и/или мертвых животных, чтобы продемонстрировать свои навыки.

Обезглавливание используется в лабораторных условиях, поскольку в результате получают ткани, незагрязненные химическими веществами. Потеря корковой функции после обезглавливания происходит быстро, в течение 5–30 с, что измеряется значительным снижением амплитуды ЭЭГ. Доступны специальные гильотины для грызунов, которые должны содержаться в чистоте, хорошем состоянии с острыми лезвиями.

При правильном обращении у крыс и мышей не проявляются признаки активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси в результате обезглавливания или присутствия при обезглавливании других крыс или мышей.

Обезглавливание допустимо для мышей и крыс. Персонал должен пройти обучение на анестезированных или мертвых животных, чтобы продемонстрировать свое мастерство.

Микроволновое облучение сфокусированным пучком с помощью аппарата, профессионально разработанного для эвтаназии животных, допустимо в условиях эвтаназии мышей и крыс. Это предпочтительный метод, когда для исследовательских целей требуется немедленная фиксация метаболитов головного мозга.

Неприемлемые методы

Ингаляционные средства

Азот и аргон — их введение допустимо только у млекопитающих, находящихся под наркозом, поскольку для потери сознания и смерти необходима сопутствующая концентрация O_2 менее 2%. Достичь этого состояния непросто. Кроме того, было показано, что аргон вызывает сильную неприязнь у крыс. Хотя азот и аргон могут умерщвлять животных, предпочтительны другие методы эвтаназии.

Неингаляционные средства

Хлорид калия — внутривенное или внутрисердечное введение хлорида калия неприемлемо в качестве единственного метода эвтаназии.

Средства, блокирующие нервно-мышечную систему, — это паралитические средства, которые неприемлемы для использования в качестве единственных для эвтаназии.

Инъекционные барбитураты и миорелаксанты — их сочетание в одном шприце для введения неприемлемо, потому что миорелаксанты могут подействовать до того, как животное будет анестезировано.

Опиоиды неприемлемы для эвтаназии лабораторных животных, поскольку они не действуют быстро, требуют больших доз и не являются истинными анестетиками.

Уретан — это человеческий канцероген, используемый в качестве анестезирующего средства для лабораторных грызунов при определенных условиях. У него медленное начало действия, однако большая продолжительность анестезии. Поскольку нет сообщений об использовании уретана в качестве единственного средства для эвтаназии, его рекомендуется использовать только как анестетик перед применением дополнительного метода.

α -Хлоралоза неприемлема в качестве единственного средства эвтаназии, является снотворным средством с плохими обезболивающими свойствами и рекомендуется только в качестве анестетика перед применением дополнительного метода.

Плоды и новорожденные

Мыши и крысы рождаются неврологически незрелыми, и их афферентные болевые пути плохо развиты до 5–7-го дня после рождения, а развитие коры головного мозга происходит еще позже. Любых лабораторных грызунов с незрелым потомством, таких как мыши и крысы, необходимо дифференцировать от грызунов со зрелым потомством, например, морских свинок.

Приемлемые методы

Эвтаназия матери и плодов — плоды грызунов, как и других млекопитающих, внутриутробно находятся в бессознательном состоянии, и гипоксия не вызывает у них ответной реакции. Поэтому нет необходимости отдельно извлекать зародыши для эвтаназии после эвтаназии матери.

Неингаляционные средства

Барбитураты для инъекций отдельно и в комбинации с местными анестетиками и противосудорожными средствами; диссоциативные средства в сочетании с агонистами α_2 -адренорецепторов или бензодиазепинами — эти средства приемлемы для применения у плодов или новорожденных.

Методы, приемлемые с определенными условиями

Ингаляционные средства

Ингаляционные анестетики — негорючие летучие анестетики, эффективные во время внутриутробного развития плода. Чтобы умереть от воздействия CO_2 , неонатальным мышам может потребоваться до 50 мин, а неонатальным крысам —

до 35 мин. Следует обеспечить адекватное время воздействия или применить дополнительный метод (например, вывих шейных позвонков или обезглавливание) после того, как новорожденный перестанет реагировать на болевые раздражители. При применении галогенированных анестетиков к новорожденным грызунам необходимо использовать дополнительный метод (например, вывих шейных позвонков, обезглавливание), чтобы избежать возможности восстановления.

Физические методы

Гипотермия — постепенное охлаждение плодов и бесплодных новорожденных (мышей и крыс) допустимо при определенных условиях. Нет данных, подтверждающих использование гипотермии в качестве единственного метода, за ней следует применять вторичный метод после потери подвижности.

Поскольку холодные поверхности могут вызвать повреждение тканей и предположительно боль, животные не должны вступать в прямой контакт со льдом или предварительно охлажденными поверхностями. Гипотермия для анестезии не рекомендуется после 10-дневного возраста. Следовательно, это также неприемлемый метод эвтаназии у животных старше этого возраста.

Быстрое замораживание — плоды мышей и крыс, а также новорожденные в возрасте до 5 дней могут быть эвтаназированы жидким азотом.

Обезглавливание ножницами или острыми лезвиями допустимо только новорожденных. Перед проведением требуется определить массу тела животного и при необходимости использовать иной более подходящий способ эвтаназии.

Вывих шейных позвонков путем защемления и разрыва спинного мозга в верхней шейной области приемлем для эмбрионов и новорожденных мышей и крыс.

Лабораторные сельскохозяйственные животные, собаки, кошки, хорьки и нечеловекообразные приматы

Общие положения

Цели исследования часто влияют на выбор метода эвтаназии сельскохозяйственных животных, собак, кошек и хорьков. Как правило, предпочтительным методом является седация (при необходимости) с последующим внутривенным введением барбитуратов. Трибутам, вводимый внутривенно обученным персоналом, может быть подходящей заменой для собак, если инъекционные барбитураты недоступны. Для получения дополнительной информации о других методах эвтаназии сельскохозяйственных и домашних животных обратитесь к соответствующим разделам руководства.

Для нечеловекообразных приматов и других диких или неодомашненных животных, используемых в лаборатории, применяются некоторые общие принципы. При этом проводимое исследование может повлиять на выбор метода эвтаназии и, если сотрудники программы по уходу и использованию животных не знакомы с каким-либо видом, исследователи, работающие с ним, могут дать ценные рекомендации. Всегда необходимо применять соответствующие ограничения для данного вида. Страдания животных, незнакомых с манипуляциями, должны быть сведены к минимуму. Следует обеспечить венозный доступ или использовать для седации

внутримышечные препараты (при необходимости доставляемые с помощью оборудования для дистанционных инъекций). Этих животных предпочтительно усыпляют с помощью инъекционного барбитурата.

Особые случаи

Когда животные, подлежащие эвтаназии, находятся под полным наркозом, допустимы дополнительные методы, такие как двусторонняя торакотомия, обескровливание, перфузия и внутривенное или внутрисердечное введение хлорида калия.

Лабораторные кролики

Общие положения

Рекомендуемые методы эвтаназии кроликов зависят от помещений и условий, в которых содержатся животные. В контролируемых условиях, таких как биомедицинский исследовательский центр, где исследователи имеют доступ к фиксирующим устройствам и контролируемым препаратам, обычно используется внутривенная инъекция барбитуратов. Для эвтаназии всегда необходимо выбирать способ/метод, который не принесет животному дополнительного стресса и страданий. Смерть всегда должна быть подтверждена. Отсутствие дыхания и сердцебиения, а также неподвижный расширенный зрачок являются признаками смерти, которые проще всего оценить.

Приемлемые методы

Неингаляционные средства

Барбитураты и производные барбитуровой кислоты — если кролики приучены к процедурам или имеются фиксирующие устройства, для введения препаратов может быть использована вена уха. В случае, если кролик демонстрирует агрессию, может потребоваться предварительное введение седативных средств. Барбитураты также можно вводить внутрибрюшинно. Одновременное применение местных анестетиков и противосудорожных средств может помочь в предотвращении боли, но следует учитывать, что эти соединения также способны вызывать боль при внутрибрюшинном введении. Эти подходы приемлемы и для кроликов-компаньонов.

Методы, приемлемые с учетом условий

Ингаляционные средства

Галогенированные анестетики — ингаляционные анестетики, как правило, доступны только в контролируемых условиях, таких как биомедицинские исследовательские центры или поставщики ветеринарных услуг. В таких ситуациях можно предварительно ввести седативное средство, после чего вынимать его из домашней клетки и перемещать к устройствам для ограничения подвижности и аппарату для газовой анестезии. Такой способ уменьшит естественную склонность животных к задержке дыхания при столкновении с неприятными запахами. Животные, уже

находящиеся под наркозом, могут быть эвтаназированы при помощи передозировки анестетика.

Углекислый газ — рекомендуемая скорость вытеснения CO_2 для кроликов составляет от 50% до 60% от объема камеры или клетки в минуту. Как роющие животные кролики, по-видимому, обладают более высокой переносимостью повышенных уровней CO_2 , поэтому его использование в качестве единственного средства для эвтаназии может вызвать дистресс в высоких концентрациях (70%, 80%, 90%, 98%) в течение 15 с перед потерей сознания. Сообщается, что при введении CO_2 с более низкой скоростью потока, составляющей приблизительно 28% и 58% замещения объема камеры в минуту, у кроликов не наблюдалось дистресса. Для эвтаназии рекомендуется использовать быструю подачу CO_2 , поскольку это приводит к значительно более ранней потере чувствительности (40 с) и смерти, чем постепенное заполнение (99 с). Премедикация седативными средствами может уменьшить потенциальную реакцию неприязни.

Физические методы

Вывих шейных позвонков допустим в условиях для кроликов, если его выполнят люди с продемонстрированной высокой степенью технического мастерства. Потребность в технической компетентности персонала особенно велика при эвтаназии этим способом тяжелых или взрослых кроликов, у которых большая мышечная масса в шейном отделе затрудняет мануальное смещение шейного отдела позвоночника. Механические устройства, предназначенные для надежного удержания головы кролика и облегчения применения персоналом усилия, направленного вниз к бедрам и задним ногам, уменьшают силу, необходимую оператору для эвтаназии кроликов. Было доказано, что эти устройства высокоэффективны (96%) для детенышей, предварительно отнятых от груди, и взрослых особей. Предварительное обучение персонала проводится на трупах животных.

ПБП — использование проникающих болтов для умерщвления кроликов в лабораторных или производственных условиях допустимо при соблюдении определенных условий. Болт должен содержаться в чистом рабочем состоянии, правильно располагаться (слегка прижимая болт к лобной кости, как можно ближе к ушам) и безопасно эксплуатироваться обученным персоналом. Очень важно стабилизировать головку болта, чтобы предотвратить промахи. Животные должны находиться на нескользком полу, предпочтительно в контейнере с открытым верхом, чтобы задняя часть кролика была прижата к стенке контейнера. Используя недоминирующую руку, персонал должен удерживать кролика, нажимая на лопатки, при этом большой и указательный пальцы следует осторожно положить на шею кролика. Персонал должен быть обучен, предпочтительно на трупах.

НПБП — использование непроникающих болтов для умерщвления кроликов в лабораторных или производственных условиях допустимо при соблюдении определенных условий. Было показано, что НПБП приводит к немедленной потере чувствительности в 100% случаев. Животных следует удерживать на нескользком полу, предпочтительно в контейнере с открытым верхом, чтобы задняя часть кролика была прижата к стенке контейнера. Используя недоминирующую руку, персонал должен удерживать кролика, нажимая на лопатки, а большой и указательный паль-

цы следует осторожно положить на шею кролика. Устройство должно содержаться в чистом рабочем состоянии, располагаться правильно (в центре лба, ствол расположен перед ушами и за глазами) и быстро разряжаться два раза подряд при давлении, рекомендованном для возраста и размера кролика (рис. 9). Для обучения персонала используют трупы животных.

Специальные методы

Когда кролики, подлежащие эвтаназии, находятся под хирургическим наркозом, приемлемы дополнительные методы, такие как введение хлорида калия, обескровливание или двусторонняя торакотомия.

Было показано, что нанесение травмы головы тупым предметом вручную является сложным и эмоционально неприятным процессом, приводящим к нежелательному повреждению тканей, а также менее эффективным, чем другие средства. Травма тупым предметом должна применяться только в чрезвычайных ситуациях при смягчающих обстоятельствах, таких как раненый кролик, слишком крупный для персонала, чтобы вывихнуть шейные позвонки, и работник не имеет каких-либо вспомогательных средств.

Лабораторные рыбы, амфибии и рептилии

Рекомендация методов эвтаназии для рыб, водных беспозвоночных, земноводных и рептилий, используемых в биомедицинских исследованиях, является сложной задачей из-за огромного количества используемых видов и различий в их биологических и физиологических характеристиках. В этом разделе будут обсуждаться только наиболее часто применяемые методы для основных используемых видов. Другие редко используемые для эвтаназии виды, которые участвуют в исследованиях, подробно обсуждаются в соответствующих разделах руководства.

Препаратов для эвтаназии водных животных, одобренных к применению, не существует. Трикаина метансульфат — одобренный препарат для временной иммобилизации (успокоения, анестезии) рыб, амфибий и других водных хладнокровных животных. Ранее рекомендовалось погружение взрослых рыбок данио в MS 222 на 10 мин после потери ритмичного оперкулярного дыхания. Однако поскольку было доказано, что рыба восстанавливается после воздействия в течение этого времени, рекомендуется использовать 30 мин в качестве меры предосторожности

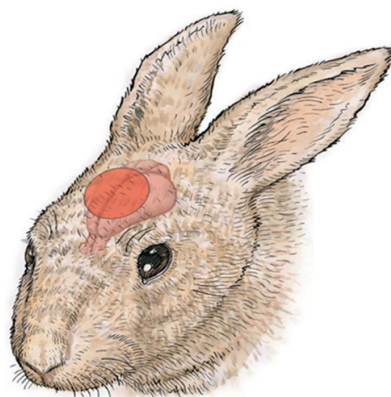


Рис. 9. Анатомическое место для установки невыпадающего болта у кроликов. Устройство следует расположить в центре лба так, чтобы дуло находилось перед ушами и за глазами. Устройство следует быстро разрядить дважды подряд при давлении, рекомендованном для возраста и размера кролика

до тех пор, пока не будут получены результаты исследований, подтверждающие продолжительность погружения, необходимую для достоверной необратимой гибели рыбок данио. Рыбки данио проявляют некоторые признаки стресса при погружении в MS 222, поэтому для их эвтаназии рекомендуется вторичный (физический) метод воздействия. MS 222 в качестве монопрепарата не эффективен для эвтаназии яиц, эмбрионов или личинок рыбок данио (возраст менее 14 дней), при этих жизненных ситуациях следует использовать другие методы.

Допустимо умерщвление рыбок данио (*Danio rerio*) путем быстрого охлаждения (2–4 °С) до потери ориентации и прекращения движений конечностей. Последующее дополнительное выдерживание рыбы в охлажденной воде в течение времени, соответствующего размеру и возрасту рыбы, должно быть использовано для обеспечения эвтаназии. Быстрое охлаждение взрослых рыбок данио приводило к прекращению жизнедеятельности (10,6±3,28 с) в 20 раз быстрее, чем в случае передозировки MS 222 (216,3±62 с). Взрослых рыбок данио следует подвергать воздействию в течение как минимум 10 дополнительных минут после потери двигательной активности. Мальки рыбок данио через 4–7 дней после оплодотворения должны находиться на открытом воздухе еще по крайней мере 20 мин после потери оперкулярного дыхания. Быстрое охлаждение (а также MS 222), как было показано, является ненадежным методом эвтаназии для эмбрионов менее 3 дней после оплодотворения. Погружение в разбавленный раствор гипохлорита натрия или кальция допустимо для эмбрионов в возрасте до 7 дней. Если необходимо обеспечить эвтаназию на других стадиях жизни, за быстрым охлаждением может последовать либо одобренный метод дополнительной эвтаназии, либо гуманный метод умерщвления. Пока не будут проведены дальнейшие исследования, быстрое охлаждение приемлемо для мелких тропических и субтропических стенотермических видов.

Виды амфибий, обычно используемые в исследованиях, включают африканскую и западную когтистую лягушку (*Xenopus laevis*, *X. tropicalis*), леопардовую и бычью лягушки (*Rana* spp.), а также аксолотлей (*Ambystoma mexicanum*). Этих животных лучше всего подвергать эвтаназии физическим методом под полным наркозом. Хотя внутривенное введение пентобарбитала натрия интрацеломально или в лимфатические узлы является приемлемым методом эвтаназии этих видов, часто требуются высокие дозы, и после использования этого препарата может пройти разное время до потери сознания.

Мелкие жвачные животные

Эвтаназия мелких жвачных может быть необходима по самым разным причинам: в связи с возникшими травмами, неизлечимыми заболеваниями и др. Методы включают передозировку барбитуратов, выстрел из огнестрельного оружия или использование непроникающего болта с последующим дополнительным методом, таким как обескровливание, внутривенное введение хлорида калия или сульфата магния или прокалывание. Электрошок — еще один вариант, но для этого метода требуется специальное оборудование, чтобы сдерживать животное и правильно размещать электроды. Поскольку маловероятно, что электричество и необходи-

мое оборудование для эвтаназии в полевых условиях будут доступны, умерщвление разрядом электрического тока не считается практичным для повседневного использования.

Приемлемые методы

Неингаляционные средства

Барбитураты и производные барбитуровой кислоты — барбитураты действуют путем угнетения ЦНС, которое прогрессирует от сознания до бессознательного состояния, глубокой анестезии и в конечном итоге смерти. Хотя использование этих средств требует фиксации и вызывает легкий дискомфорт, связанный с самой инъекцией, наблюдатели обычно считают этот метод эвтаназии более приемлемым, поскольку смерть наступает более быстро. Для животного-компаньона это особенно важно. В производственных условиях опасения по поводу стоимости и утилизации трупов животных делают этот метод эвтаназии менее используемым.

Методы, приемлемые с учетом условий

Ингаляционные средства

Вдыхание углекислого газа как форма эвтаназии было оценено у козлят младше 3 нед. Тестирование реакции восприятия запаха показывает, что концентрации CO_2 ниже 70% не вызывают отвращения у козлят, поскольку животные были готовы входить в тестовую камеру с концентрацией CO_2 до 70%, чтобы получить молочную муку. Козлята, попавшие в камеру с 70% содержанием CO_2 , потеряли сознание во время кормления. Основываясь на этих данных и клиническом опыте, рекомендуется, чтобы после помещения детенышей в камеру для эвтаназии она заполнялась со скоростью, достаточной для достижения концентрации CO_2 более 70% к 5-й минуте, при этом для обеспечения эвтаназии время выдержки составляет 10 мин. Эвтаназия путем вдыхания CO_2 не оценивалась у пожилых коз или овец. Учитывая, что неприязнь к CO_2 варьирует в зависимости от вида, и физиологические различия в возрасте и массе могут повлиять на успех, пригодность этой формы эвтаназии у других видов жвачных животных требует дальнейшего изучения, но в настоящее время не может быть рекомендована из-за недостатка знаний.

Физические методы

Выстрел — огнестрельное оружие, рекомендованное для эвтаназии взрослых мелких жвачных животных, как правило, калибра 22 LR; 38 Special, 357 Magnum и 9 мм или эквивалентные пистолеты, а также дробовики. Некоторые пользователи предпочитают пули с полым наконечником, чтобы увеличить фатальное повреждение головного мозга и уменьшить вероятность рикошета. Однако фрагментация пули может существенно снизить вероятность разрушения головного мозга из-за меньшей проникающей способности, особенно при использовании у взрослых большерогих баранов. В этих условиях предпочтение отдается дробовикам или крупнокалиберному огнестрельному оружию, заряженному пулями с твердым

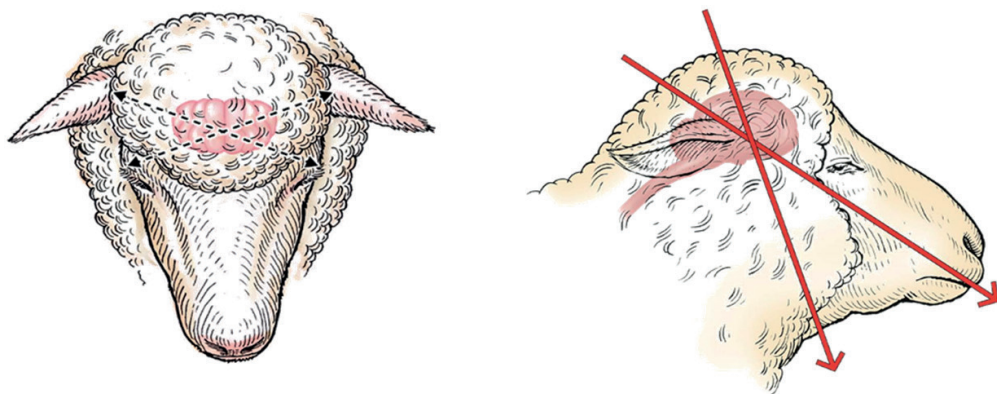


Рис. 10. Для комолых овец или коз поместите болт перпендикулярно черепу над анатомическим участком, определенным как слегка каудальный по отношению к затылку (макушка или самая высокая точка на голове), на пересечении двух линий, проведенных от внешнего угла каждого глаза к середине основания противоположного уха. В качестве альтернативы может быть использован участок, расположенный на дорсальной средней линии головы, который соответствует внешнему затылочному выступу черепа. При использовании места, связанного с наружным затылочным выступом, поместите невыпадающий болт на одном уровне с черепом на наружном затылочном выступе, наклонив или направив дуло болта ко рту

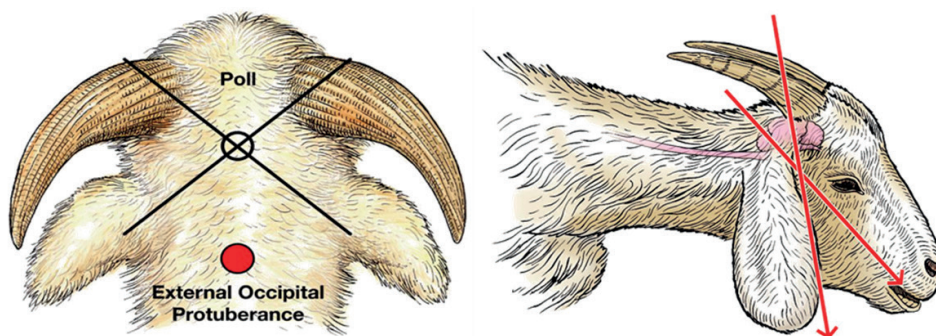


Рис. 11. Для рогатых овец или коз поместите болт перпендикулярно черепу над анатомическим участком, расположенным немного каудальнее затылка (также известным как макушка или самая высокая точка на голове), на пересечении двух линий, проведенных от внешнего угла каждого глаза к середине основания противоположного уха. В качестве альтернативы может быть использован участок, расположенный на дорсальной средней линии головы, который соответствует внешнему затылочному выступу черепа. При использовании места, связанного с внешним затылочным выступом, поместите невыпадающий болт на одном уровне с черепом на наружном затылочном выступе, наклонив или направив дуло болта ко рту

наконечником. Когда огнестрельное оружие используется для эвтаназии, важно, чтобы оно никогда не было на одном уровне с черепом. Вместо этого дуло ружья должно быть направлено в нужном направлении и удерживаться на расстоянии не ближе 15–30 см от цели.

ПБП и НПБП — эффективность применения болта у овец и коз проявляется немедленной потерей сознания, продолжающейся до смерти в результате обескровливания или другого вспомогательного метода. Хотя предполагается, что проникновение болта вызывает потерю чувствительности, исследования факторов, определяющих эффективное использование непроникающего болта, показывают, что воздействие болта на череп — основная причина потери сознания. Было определено, что применение методов сотрясения мозга (НПБП) является эффективным средством индуцирования потери чувствительности у новорожденных козлят, которая сохраняется до смерти от обескровливания.

Анатомические ориентиры для огнестрельных и невыпадающих болтов — место для размещения невыпадающего болта, или входа свободной пули для эвтаназии, одинаково для овец и коз. Оптимальное место находится на пересечении двух линий, каждая из которых проводится от латерального угла глазной щели одного глаза к середине основания противоположного уха (рис. 10, 11).

Альтернативные ориентиры, обеспечивающие очень похожее расположение, — это средняя линия спины на уровне внешнего затылочного бугра, направленная вниз, к большей части черепа в межжнечелюстном пространстве. Фронтальные выстрелы, направленные в большое затылочное отверстие, должны быть зарезервированы для использования только при выстреле из огнестрельного оружия и обеспечивают альтернативный подход для овец и коз с длинными рогами, у которых верхняя часть черепа может быть слишком труднодоступной из-за рогов. Большая и изменчивая полость пазухи у овец и коз делает фронтальные выстрелы болтом более ненадежными.

Дополнительные методы

Неингаляционные средства

Хлорид калия и сульфат магния — хотя применение этих веществ неприемлемо в качестве единственного средства эвтаназии, быстрое внутривенное введение хлорида калия является эффективным методом эвтаназии овец и коз, ранее потерявших сознание в результате воздействия ПБП или НПБП, огнестрельного оружия или введения анестетиков. При проведении эвтаназии овец и коз, которая может потребовать последующего введения хлорида калия, персоналу следует заранее приготовить не менее 1–2 шприцев по 30 мл раствора (оснащенных иглой 18-го размера). Это облегчит быстрое введение и гарантирует, что животное не придет в сознание. Можно использовать любую доступную вену; однако важно находиться вне досягаемости конечностей и копыт, которыми животные могут нанести травму в период произвольных движений. Как только игла окажется в вене, инъекцию следует провести быстро.

Сульфат магния можно вводить аналогично хлориду калия. Смерть может наступить не так быстро.

Физические методы

Второй выстрел — обычно один меткий выстрел приводит к немедленной эвтаназии с малой вероятностью осечки, но всегда нужно быть готовыми произвести второй или даже третий выстрел, если это необходимо. Дополнительное повреждение ткани головного мозга наряду с кровоизлиянием и отеком создают достаточное внутричерепное давление, чтобы в большинстве случаев вызвать смерть, но повреждение ствола головного мозга всегда должно быть целью эвтаназии.

Обескровливание может быть выполнено в качестве дополнительного шага, чтобы гарантировать смерть мелких жвачных животных, когда это необходимо. Это может быть выполнено через разрез вентральной части горла или шеи, пересечением кожи, мышцы, трахеи, пищевода, сонных артерий и яремных вен.

Обескровливание следует проводить остроконечным ножом с жестким лезвием длиной не менее 15 см, процедура может быть неприятна для персонала из-за большого объема кровопотери, что также вызывает опасения с точки зрения биобезопасности. Когда перерезаются только сонные артерии и яремные вены, кровотечение может длиться в течение нескольких минут с разной интенсивностью.

Прокол — это метод предназначен для эвтаназии путем увеличения разрушения тканей головного и спинного мозга, выполненный протыкающим стержнем, введенным через входное отверстие, образованное в черепе пулей или ПБП. Персонал манипулирует инструментом для прокалывания, чтобы разрушить ткани ствола головного и спинного мозга и вызвать смертельный исход. Мышечная активность во время прокола часто довольно бурная, но затем наступает затишье, что облегчает обескровливание или другие процедуры.

Неприемлемые методы

Для эвтаназии мелкого рогатого скота недопустимы следующие методы: ручная тупая травма головы; введение химических средств, находящихся в сознании животным (например, дезинфицирующих средств, электролитов, таких как хлорид калия и сульфат магния, неанестезирующих фармацевтических средств); введение ксилазина или любого другого агониста α_2 -адренергических рецепторов с последующим внутривенным введением хлорида калия или сульфата магния (хотя большие дозы α_2 -адренорецепторов могут вызывать состояние, напоминающее общую анестезию, они признаны ненадежными для этой цели), утопление или воздушная эмболия (то есть введение воздуха в сосудистую сеть); поражение электрическим током с напряжением 120 В, утопление и обескровливание животных в сознании.

Новорожденные

Новорожденные ягнята и козлята. Ягнятам и козлятам тупую травму наносят рукой: животное раскачивают, затем производят удар головой о твердую поверхность или бьют его по голове твердым предметом, например, молотком. Оба метода трудно, если вообще возможно, применять последовательно, и поэтому они перечислены как неприемлемые.

Использование проникающего или специально разработанного НПБП (контролируемая травма тупым предметом) допустимо для ягнят и козлят. Контролируемая травма тупым предметом отличается от травмы, нанесенной тупым пред-

метом вручную тем, что болты создают соответствующее и одинаковое усилие при каждом выстреле, а структурные повреждения головного мозга являются более последовательными. Исследования с использованием методов контролируемой травмы тупым предметом показали, что очаговые, а также диффузные повреждения, вызванные проникающим оружием и пистолетами с ПБП, были схожи и достаточны для того, чтобы оба рассматривались как эффективные для эвтаназии ягнят. Основываясь на электрофизиологических данных, было определено, что основным фактором, определяющим эффективность стрельбы, является воздействие болта, а не проникновение его в ткани мозга. Повреждения, прилегающие к раневому следу, и возникающие в периферических тканях головного мозга, мозжечка и ствола головного мозга, рассматриваются как преобладающие факторы, влияющие на потерю дыхательной функции и сознания.

Контролируемая травма тупым предметом с использованием ПБП требует постоянной силы и, как было установлено, вызывает немедленную потерю чувствительности у новорожденных ягнят и козлят. Предпочтительным положением для стрельбы у новорожденных ягнят и козлят является положение дула ПБП по средней линии позади головы (то есть между ушами), при этом подбородок прижат к шее (рис. 12).

Передозировка барбитуратов может быть также использована для эвтаназии новорожденных телят, ягнят и козлят. В ряде случаев этот метод предпочтительнее физических способов. Недостатки включают временное беспокойство животного, связанное с ограничением свободы и введением иглы, проблемы, связанные с удалением останков и ограничение обращения наркотических и психотропных средств. Если предположить, что эти условия могут быть соблюдены, передозировка барбитуратов, как правило, предпочтительнее, чем другие методы.

Плоды и новорожденные

Поведенческие данные и данные ЭЭГ указывают, что зародыши млекопитающих бессознательны и нечувствительны в течение первых 75–80% срока беременности. По мере того, как нейронные пути между корой головного мозга и таламусом становятся более развитыми, у плода развивается способность чувствовать. Однако, находясь в защищенной среде матки животного, он остается в бессознательном состоянии из-за присутствия 8 или более нейроингибиторов, которые действуют

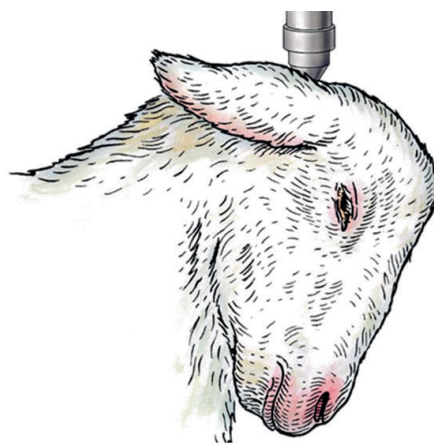


Рис. 12. Анатомическое место для установки невыпадающего болта у новорожденных ягнят и козлят младшего возраста. Предпочтительная позиция для стрельбы — дуло невыпадающего болта находится на средней линии за затылком (то есть между ушами), а подбородок прижат к шее

на кору головного мозга плода, поддерживая его в бессознательном состоянии, похожем на сон. При рождении комбинированные эффекты снижения нейроторможения и начала нейроактивации способствуют постепенному пробуждению новорожденных млекопитающих в состояние сознания, которое происходит в течение нескольких минут и даже часов после рождения.

Эти наблюдения указывают, что плод не страдает, когда мать подвергается эвтаназии; также маловероятно, что он будет испытывать боль, связанную с другими видами инвазивных процедур внутриутробно. Эти исследования также подтверждают обоснованность международных рекомендаций по обращению с плодами, предполагающих, что плод не следует извлекать из матки до того, как ЭЭГ станет изоэлектрической. Например, когда животных подвергают эвтаназии физическими методами, включающими обескровливание, задержка извлечения плода из матки минимум на 5 мин после прекращения кровотечения, как правило, обеспечивает значительное повреждение коры головного мозга, вызванное кислородным голоданием, которое обычно предотвращает возвращение чувствительности. Если есть какие-либо сомнения относительно уровня сознания плода, его следует немедленно подвергнуть эвтаназии с помощью невыпадающего болта и при необходимости дополнительных методов. Это также касается забора тканей у живых плодов непосредственно в период после убоя. Хотя сердце может продолжать биться (что необходимо для успешного забора крови плода), при отсутствии дыхания вероятность возвращения в состояние сознания невелика. Дыхание можно прервать, пережав трахею плода или отложив его извлечение из матки на 15–20-й минуте после смерти матери.

Барбитураты и производные барбитуровой кислоты — пентобарбитал легко проникает через плаценту, вызывая угнетение плода у беременных животных. Однако смерть матери обычно предшествует гибели плода. В одном исследовании остановка сердца у ягнят задерживалась на целых 25 мин после гибели самки. Аналогичные наблюдения на мышах показали, что смерть плода может быть достигнута только при использовании доз, значительно превышающих те, которые обычно требуются для эвтаназии взрослых животных. Основываясь на этих наблюдениях, можно рекомендовать, как и в отношении смерти в результате обескровливания, плод удерживать в матке в течение как минимум 15–20 мин после смерти матери, чтобы предотвратить рождение жизнеспособного плода.

Свиньи

Методы эвтаназии, обычно применяемые к свиньям, включают использование CO_2 , выстрела, непроникающего болта, передозировку анестетика, поражение электрическим током и травму тупым предметом (только для поросят-сосунков). Газовые смеси N_2O , Ar, N_2 и CO_2 также могут использоваться, но в настоящее время широко не применяются. Выбор наиболее подходящего метода для каждой ситуации зависит от размера и массы животного, наличия оборудования и помещений, навыков и опыта персонала, гуманных соображений, безопасности человека и вариантов утилизации останков. Некоторые физические методы эвтаназии могут потребовать дополнительных методов, таких как обескровливание или прокол,

чтобы гарантировать смертельный исход. Дано краткое описание каждого метода и соответствующих кандидатов для него.

Свиноматки, хряки и свиньи на откорме

Методы, обычно используемые для эвтаназии свиноматок, хряков и свиней на откорме, включают применение огнестрельного оружия, ПБП, поражение электрическим током и передозировку барбитуратов.

Использование физических методов эвтаназии требует прямого контакта с животным, поэтому необходима его фиксация. Силки являются наиболее распространенным инструментом для ограничения двигательной активности свиней. Исследования показывают разную степень стресса, связанного с фиксацией при совместном использовании методов. Поэтому чтобы свести к минимуму стресс, связанный с процедурой, персоналу, проводящему эвтаназию свиней, рекомендуется заранее подготовиться (например, подготовить площадку, зарядить ружье или затвор для ПБП), тем самым сводя к минимуму время, в течение которого животное должно быть обездвижено.

Приемлемые методы

Неингаляционные средства

Барбитураты и производные барбитуровой кислоты — взрослые свиноматки, хряки и свиньи на откорме могут быть подвергнуты эвтаназии путем внутривенного введения растворов, содержащих барбитураты. Этот метод может не привести к смерти, если препараты не вводить внутривенно. Другие анестетики (газовые и/или инъекционные) могут использоваться для того, чтобы вызвать потерю сознания, после чего применить дополнительный метод, такой как обескровливание. Они обычно не используются в полевых условиях, но могут быть применимы в некоторых ситуациях. Поскольку эти препараты являются контролируруемыми веществами, требуется их строгий учет.

Ряд специалистов считает, что эвтаназия путем внутривенного введения анестетика более гуманна, чем выстрел из огнестрельного оружия, использование ПБП или поражение электрическим током. Варианты утилизации животных, подвергнутых эвтаназии с помощью барбитуратов, осложняются опасениями по поводу остатков, которые создают риск для падальщиков и других животных, которые могут потреблять части останков животных в пищу.

Методы, приемлемые с учетом условий

Ингаляционные средства

Углекислый газ, азот, закись азота и аргон — исследуемые газовые смеси включают N_2 с CO_2 , Ar отдельно и с CO_2 , а также CO. Ингаляционные средства чаще всего используются при эвтаназии на мясоперерабатывающих предприятиях и считаются приемлемыми при определенных условиях. Однако они, как правило, непрактичны при использовании на фермах и в большей степени применимы для свиней массой 31,8 кг или меньше, а не для свиней, предназначенных для откорма,

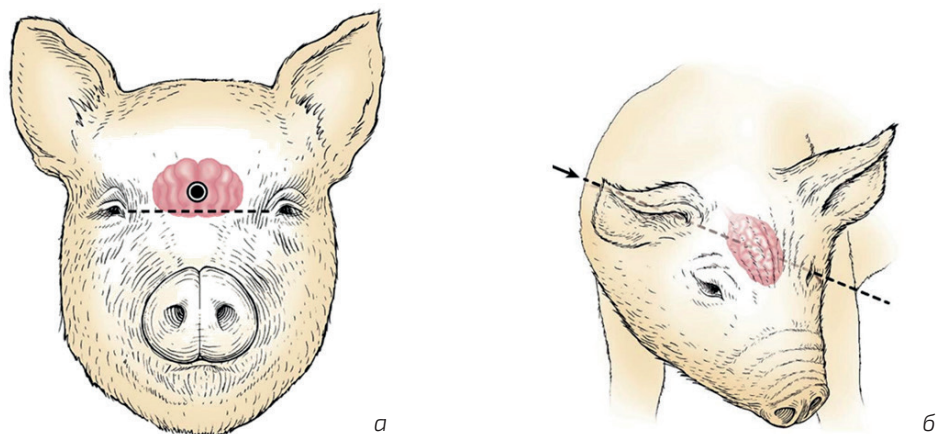


Рис. 13. Показано одно возможное анатомическое место для ПБП и два возможных анатомических места для огнестрельного применения у свиней. Лобное место может использоваться как для ПБП, так и для огнестрельного оружия (а) и расположено в центре лба, немного выше линии, проведенной между глазами. Болт или пуля должны быть направлены в сторону позвоночного канала. Место за ухом (б) следует использовать только при выстреле, и пуля должна быть направлена в противоположный глаз. Идеальное местоположение мишени и направление прицеливания могут незначительно отличаться в зависимости от породы и возраста животного (из-за роста лобных пазух)

свиноматок и хряков. Комбинация газов (например, Ar и CO₂, N₂O и CO₂) оказалась эффективной альтернативой CO₂. Когда концентрация CO₂ высока, адекватная продолжительность воздействия обеспечивает потерю сознания, за которой следует смерть. Эти методы более подробно описаны для эвтаназии поросят-сосунков и в разделе, посвященном ингаляционным агентам.

Физические методы

Выстрел — огнестрельное оружие обычно используется для эвтаназии растущих и взрослых свиней. При правильном проведении эвтаназии с использованием соответствующего огнестрельного оружия данный метод приводит к немедленной потере сознания и быстрой смерти. На рисунке 13 показаны анатомические места для проведения эвтаназии с использованием ПБП или огнестрельного оружия. Лобное место находится в центре лба, немного выше линии, проведенной между глазами. Выстрел должен быть направлен в спинно-мозговой канал. Височная область расположена немного спереди и ниже уха. Конкретные участки могут незначительно отличаться в зависимости от породы.

Из-за толщины черепа свиньи для эвтаназии взрослых свиноматок, хряков и свиней на откорме требуется дульная энергия 400 N-m (300 ft-lb) или более. Когда выбрано альтернативное место за ухом, может использоваться огнестрельное оружие калибра 22, заряженное пулей с твердым наконечником. Вадкаттеры (пуля с плоской передней частью) и осколочные пули не должны использоваться для эвтаназии свиней. Вероятность рикошета снижается, если эвтаназию при помощи ог-

нестрельного оружия проводить на открытом воздухе, где пули, прошедшие сквозь животное, могут застрять в земле. Дробовики можно использовать на коротких дистанциях, и их преимущество заключается в меньшем потенциале рикошета пули. Для взрослых свиней рекомендуются ружья 12, 16 или 20-го калибра. Дуло никогда не должно находиться на одном уровне с мордой. При правильном выполнении свинья сразу же падает. Для подтверждения гибели животного проводится осмотр с оценкой рефлексов.

Выстрел из огнестрельного оружия является эффективным и недорогим методом эвтаназии при правильном выполнении. Безопасность человека является главной задачей при использовании огнестрельного оружия для эвтаназии. Необходима надлежащая подготовка по технике безопасности и использованию огнестрельного оружия, и стрельба из огнестрельного оружия должна производиться только персоналом, прошедшим соответствующую подготовку.

ПБП — использование исправных пистолетов для ПБП с боеприпасами, соответствующим образом подобранными в соответствии с размером животного, допустимо при определенных условиях в качестве метода эвтаназии для растущих и взрослых свиней. Правильное применение ПБП требует фиксации животного, потому что устройство должно быть крепко прижато ко лбу над местом, указанным для выстрела (см. рис. 13). При правильном выполнении свинья сразу же падает. Смерть животного должна быть подтверждена после проведения осмотра.

Использование ПБП для эвтаназии взрослых свиноматок и хряков может потребовать вторичного этапа эвтаназии, например, повторное применение ПБП, обескровливания, прокол. Важно отметить, что свиньи могут различаться формой черепа, что затрудняет определение наилучшего анатомического участка для проведения эвтаназии у взрослых свиноматок и хряков.

Проникающие болты обеспечивают преимущества в плане безопасности по сравнению с огнестрельным оружием. При правильном применении метод очень эффективен, а затраты, связанные с его применением, минимальны. Тем не менее важно, чтобы пистолеты с ПБП регулярно подвергались техническому осмотру (очистка и замена изношенных деталей), и заряды хранились должным образом для обеспечения соответствующей скорости выстрела. Требования к длине болта и боеприпасам для эффективной одномоментной эвтаназии варьируют в зависимости от размера и срока созревания свиней. Использование болта недостаточной длины или недостаточного заряда снижает эффективность. Персонал должен быть обучен правильному использованию ПБП для обеспечения эффективной эвтаназии.

Электрошок — эвтаназия электрическим током как единственный метод может привести к смерти посредством двухэтапного или одноэтапного процесса. Заряд электрического тока должен пройти через головной мозг, чтобы вызвать потерю сознания, затем — через сердце, что спровоцирует фибрилляцию и остановку сердца. В качестве двухэтапного процесса размещение электродов происходит от головы к боку.

Поражение током только головы животного вызывает большой судорожный припадок и немедленную потерю сознания, но смерть не наступает, если за ним не следует удар током «голова к сердцу» или применение дополнительного метода для эвтаназии, такого как обескровливание. Второй этап эвтаназии, будь то удар то-

ком от головы к сердцу или другой метод, должен быть выполнен в течение 15 с после потери сознания; в противном случае животное может прийти в себя. Поражение головы электрическим током осуществляется путем размещения электродов в 1 из 3 положений: во-первых, между глазами и основанием ушей по обеим сторонам головы; во-вторых, ниже основания ушей по обеим сторонам головы; в-третьих, по диагонали, ниже уха и выше противоположного глаза. Электроды для поражения электрическим током «голова к сердцу» размещаются на голове, можно использовать основание уха, а вторичный электрод прикрепляется к телу позади сердца на противоположной стороне. Это обеспечивает диагональное движение тока через тело животного. При определенном расположении электродов режима 110 В с минимальной частотой 60 Гц, подаваемого в течение минимум 3 с, достаточно для эвтаназии свиней массой до 125 кг.

Поражение электрическим током эффективно в виде одноэтапного процесса при соответствующем размещении клемм или зажимов. Однако для обеспечения адекватной и безопасной эвтаназии необходимо использовать надлежащую подготовку персонала и специальное оборудование. В то время как поражение электрическим током обычно используется для того, чтобы эвтаназировать животных на мясоперерабатывающих заводах, и меры предосторожности в этой среде являются обычными, для внедрения на ферме, где использование метода менее распространено, могут потребоваться дополнительные меры предосторожности для обеспечения безопасности человека. Предсмертное удушье может быть заметно после прекращения подачи тока и эмоционально неприемлемо для наблюдателей и персонала.

Дополнительные методы

Обескровливание — хотя обескровливание не подходит в качестве единственного метода эвтаназии, оно может быть выполнено в качестве второго этапа, чтобы гарантировать смертельный исход, когда это необходимо.

Прокол — хотя этот метод и не подходит в качестве единственного метода эвтаназии, прокол может быть выполнен в качестве вторичного шага, чтобы гарантировать смерть, когда это необходимо.

Поросята из питомника (менее 30 кг)

Эвтаназию поросят-сосунков можно проводить с помощью вдыхаемых газов (например, CO, CO₂, N₂O, Ar, N₂), огнестрельного оружия, ПБП, НПБП, посредством поражения электрическим током или использования передозировки анестетика. Ниже приведено описание использования CO₂ и ПБП для эвтаназии молодых свиней.

Приемлемые методы

Неингаляционные средства

Барбитураты и производные барбитуровой кислоты — поросята-сосунки могут быть подвергнуты эвтаназии путем внутривенного введения растворов, содержащих барбитураты. Поскольку эти препараты являются контролируруемыми веществами, требуется строгий учет их использования.

Многие находят эвтаназию путем внутривенного введения анестетика более гуманной мерой, чем воздействие CO_2 , ПБП или поражение электрическим током.

Варианты утилизации животных, подвергнутых эвтаназии с помощью барбитуратов, осложняются опасениями по поводу остатков, которые создают риск для падальщиков и других животных, которые могут потреблять в пищу части останков животных.

Методы, приемлемые с учетом условий

Ингаляционные средства

Углекислый газ отдельно или в сочетании с N_2O или Ar успешно используется для эвтаназии. При правильном применении вдыхание CO_2 является эффективным методом эвтаназии. С другой стороны, если интенсивность воздухообмена тщательно не контролируется, животные могут испытывать значительный стресс от удушья до потери сознания и смерти.

Для проведения этой процедуры на маленьких свиньях требуется контейнер, достаточно большой, чтобы соответствовать размеру и количеству свиней, подлежащих эвтаназии. Свиньи могут подвергаться воздействию CO_2 путем постепенного вытеснения окружающих газов (введения CO_2 в контейнер) или помещения животных в предварительно заполненную среду. Во время постепенного заполнения CO_2 свиней помещают в закрытый контейнер и запускают подачу газа с такой скоростью и на такое время, чтобы достичь уровня, достаточного для проведения эвтаназии. В случае подхода с предварительным заполнением создается концентрированная среда CO_2 , свиньи помещаются в эту среду, и подача газа возобновляется для поддержания эффективных концентраций при эвтаназии. При обоих методах для эффективной эвтаназии необходимо подвергать свиней постоянному воздействию 80–90% CO_2 в течение как минимум 5 мин.

Углекислый газ, используемый для эвтаназии, обладает рядом преимуществ, он относительно недорогой, негорючий и невзрывоопасный. Недостатками использования CO_2 является то, что для эффективного и безопасного применения требуется специальное оборудование и обученный персонал. Системы должны обеспечивать определенный уровень анестезии, не вызывая при этом гипотермии. Необходим соответствующий регулятор снижения давления с расходомером или без него, способный обеспечивать рекомендуемую скорость перемещения для используемого контейнера соответствующего размера. Как и в случае с другими методами, смерть должна быть подтверждена для каждого животного после воздействия CO_2 .

Для молодых свиней движение во время фазы индукции заставило некоторых усомниться в степени стресса, который можно вызвать с помощью этого метода. Некоторые интерпретируют эти движения как признаки неприязни. Имеются данные, что такие реакции могут быть нормальными для свиней в бессознательном состоянии. Маленькие или нежизнеспособные поросята имеют низкий дыхательный объем и не умирают так быстро, как более крупные и жизнеспособные свиньи. Эвтаназия углекислым газом в условиях камеры для крупных свиней подробно не изучалась. Рекомендуют увеличить объем камеры не менее чем 2,5 раза, чтобы обеспечить соблюдение принципа заполнения—вымывание независимо от размера свиней,

подлежащих эвтаназии. Мониторинг оборудования и газа должен быть рутинным и последовательным, чтобы гарантировать наличие достаточного количества газа для достижения эвтаназии. Контейнеры с углекислым газом никогда не следует размещать в непроветриваемом помещении из-за рисков, связанных с передозировкой газообразного CO_2 для людей.

Физические методы

НПБП — для эвтаназии молодых свиней можно использовать специально построенный НПБП. Сотрясение от болта вызывает немедленную потерю сознания, за которой следует смерть, отвечающая принципам гуманной эвтаназии. НПБП лучше всего использовать у молодых свиней до того, как лобные кости полностью разовьются и затвердеют.

Использование правильно функционирующего НПБП с соответствующими зарядами дает преимущество в обеспечении равномерной ударной силы по черепу (контролируемая травма тупым предметом). Это снижает вероятность неэффективного оглушения и эвтаназии, которые могут чаще происходить при использовании тупой травмы, нанесенной рукой. Однако этот метод требует немедленного применения дополнительного метода для обеспечения эвтаназии.

ПБП — использование исправных пистолетов для ПБП с боеприпасами, соответствующим образом подобранными согласно размерам животного, допустимо при определенных условиях в качестве метода эвтаназии для растущих и взрослых свиней. Правильное применение ПБП требует фиксации животного, потому что устройство должно быть плотно прижато ко лбу над местом, описанным для огнестрельного оружия (см. рис. 13). При правильном выполнении свинья сразу же падает на пол, демонстрируя различное количество тонических и клонических движений мышц. Подтверждение того, что животное находится в бессознательном состоянии, включает зафиксированную остановку ритмичного дыхания, отсутствие пальпебрального рефлекса, вокализации, а также роговичных рефлексов или ответа на раздражители. За всеми свиньями следует наблюдать на предмет наличия таких реакций до тех пор, пока не будет подтверждена гибель.

Электрошок — поражение электрическим током допустимо для свиней старше 3-дневного возраста.

Молочные поросята

Варианты эвтаназии поросят-сосунков включают CO_2 ; смеси CO_2 с Ar , N_2 или N_2O ; CO ; ингаляционные анестетики; специальные НПБП; поражение электрическим током (для поросят старше 3-дневного возраста); передозировку анестетика и травму тупым предметом. Подробно описаны использование ПБП, нанесение травмы тупым предметом вручную и CO_2 .

Приемлемые методы

Инъекционные средства

Барбитураты и производные барбитуровой кислоты — поросята-сосунки могут быть подвергнуты эвтаназии путем внутривенного введения растворов

для эвтаназии, содержащих барбитураты. Поскольку эти препараты являются контролируруемыми веществами, требуется строгий учет их использования.

Многие находят эвтаназию путем внутривенного введения анестетика более гуманной, чем введение CO_2 , применение ПБП, удар тупым предметом рукой или поражение электрическим током. Утилизация животных, подвергнутых эвтаназии с помощью барбитуратов, осложняется опасениями в отношении контаминации трупов химическими веществами, которые создают риск для падальщиков и других животных, которые могут потреблять в пищу части останков животных.

Методы, приемлемые с учетом условий

Ингаляционные средства

Углекислый газ может быть эффективным методом эвтаназии для небольших групп новорожденных поросят, однако параметры метода необходимо продолжать оптимизировать и публиковать, чтобы обеспечить согласованность и повторяемость.

Физические методы

НПБП может быть эффективным методом эвтаназии для молодых поросят. Потеря сознания и смерть вызваны сильным непроникающим сотрясением мозга. Применение НПБП сосредоточено на уникальном состоянии поросят-сосунков и молодняка свиней, когда лобные кости развиты не полностью, что делает мозг восприимчивым к тупому удару с высокой скоростью.

При использовании у свиней соответствующего размера и возраста нет необходимости во вторичном шаге для обеспечения умерщвления. НПБП может приводиться в действие пневматически или за счет использования соответствующих боеприпасов. Некоторые марки ружей с болтом стали универсальными за счет использования разных головок (разной длины затвора и проникающего или непроникающего конца), а также боеприпасов для свиней разного размера, что позволяет использовать одно и то же ружье в разных ситуациях. Текущие исследования показывают, что эвтаназия с использованием НПБП эффективна и повторяема при достаточной мощности, боеприпасах и последовательности в конструкции оружия.

Травма тупым предметом, нанесенная рукой — при правильном выполнении такая травма соответствует принципам гуманной эвтаназии, а именно вызывает минимальные страдания с быстрой потерей сознания, ведущей к смерти. Как и в случае с НПБП, эффективность удара рукой тупым предметом связана с тем, что у поросят-сосунков лобные кости не полностью развиты. Этот метод может быть менее эмоционально приемлемым, чем другие альтернативные, но при правильном обучении и правильном применении техники смерть наступает быстро. Неуверенность в успехе часто становится причиной повторного применения или выбора альтернативного метода эвтаназии. Американская ветеринарная медицинская ассоциация призывает тех, кто использует такой способ для нанесения травмы головы в качестве метода эвтаназии, активно искать альтернативные пути, чтобы гарантировать постоянное соблюдение критериев эвтаназии.

Домашняя птица

Методы эвтаназии домашней птицы [одомашненных птиц, используемых для производства яиц, мяса или пера (например, цыплят, индеек, перепелов, фазанов, уток, гусей)] включают вдыхание газа, нанесение тупой травмы рукой, смещение шейного отдела позвоночника, обезглавливание, поражение электрическим током, огнестрельное ранение, болт и инъекционные средства. Там, где это уместно, включены дополнительные комментарии, касающиеся физиологических различий между видами птиц, различий в окружающей среде, а также размера или возраста птиц.

Приемлемые методы

Неингаляционные средства

Передозировка инъекционных анестетиков, включая барбитураты и производные барбитуровой кислоты, — домашняя птица может быть подвергнута эвтаназии путем передозировки анестетиков, введенных внутривенно, включая барбитураты и производные барбитуровой кислоты. Поскольку эти препараты являются контролируемыми веществами, требуется их строгий учет.

Многие находят введение анестетика более гуманным, чем использование CO₂, СО, болта, нанесение травмы тупым предметом рукой или поражение электрическим током. Поэтому в некоторых случаях применение анестетика может быть предпочтительнее. Недостатком этого метода является то, что ткани животных, подвергнутых эвтаназии с помощью барбитуратов, нельзя использовать в пищу, кроме того, они могут быть непригодны для диагностической оценки. Помимо прочего, варианты утилизации животных, подвергнутых эвтаназии с помощью барбитуратов, связаны с опасениями контаминации трупов химическими веществами, которые создают риск для падальщиков и других животных, которые могут потреблять в пищу части останков животных.

Методы, приемлемые с учетом условий

Вдыхаемые газы

Газы тоже находят свое применение для эвтаназии домашней птицы. Вожно проводить осмотр для подтверждения смерти, поскольку птицы могут приходить в сознание, если время воздействия или концентрация используемого средства недостаточны. Газы должны подаваться в очищенной форме без примесей, как правило, из имеющихся в продаже баллонов или резервуаров. Газораспределительная система должна иметь достаточную мощность и контроль для поддержания необходимой концентрации газа в используемом контейнере, а сам контейнер должен быть достаточно герметичным, чтобы удерживать газ на соответствующем уровне.

Углекислый газ наиболее распространенный среди используемых для эвтаназии домашней птицы, его применение было тщательно изучено на курах, индейках и утках, причем доступна информация о поведенческих реакциях, времени до коллапса, потери сознания и смерти, также описаны изменения ЭЭГ и ЭКГ. В настоящее время

нет требований к скорости потока для использования двуокиси углерода в птицеводстве. Углекислый газ успешно применяется для эвтаназии эмбрионов птиц, только что вылупившейся домашней птицы и взрослых птиц (включая плановую эвтаназию большого количества кур-несушек на фермах и в организациях, содержащих птиц для исследований или селекции). Птенцы первых дней жизни могут быть более устойчивы к высоким концентрациям CO_2 (среда инкубации обычно включает больше CO_2), при этом концентрации, необходимые для быстрой эвтаназии эмбрионов или только что вылупившихся цыплят, могут быть значительно выше (до 80–90%), чем для взрослых особей того же вида. Было показано, что концентрацию CO_2 необходимо поддерживать на уровне 75% или выше в течение 5 мин, чтобы обеспечить эвтаназию цыплят в день вылупления.

Углекислый газ может вызвать у птиц непроизвольную (бессознательную) двигательную активность, такую как взмахи крыльями или другие движения конечностями, которые могут повредить ткани и сбить с толку наблюдателей. Более медленная индукция эвтаназии в гиперкапнической атмосфере снижает тяжесть судорог после потери сознания. Смерть обычно наступает в течение нескольких минут в зависимости от вида и концентрации CO_2 , присутствующего в закрытой камере.

Монооксид углерода — угарный газ также может использоваться для эвтаназии домашней птицы. В присутствии CO может наблюдаться больше конвульсий, чем обычно возникает при использовании CO_2 для эвтаназии. Скорость потока CO должна быть достаточной для быстрого достижения однородной концентрации не менее 6% после помещения птиц в камеру. Следует использовать только чистый, имеющийся в продаже CO . Необходимо принимать соответствующие меры предосторожности для обеспечения безопасности человека.

Азот или аргон, используемые отдельно или в смеси примерно с 30% CO_2 , приемлемы для эвтаназии домашней птицы при условии, что остаточный уровень O_2 в атмосфере может быть снижен и поддерживаться на достаточно низком уровне (например, 2–3%). Эти средства, как правило, вызывают больше конвульсий (например, взмахи крыльями), чем CO_2 .

Снижение атмосферного давления путем создания вакуума в камере приводит к эвтаназии цыплят и взрослой домашней птицы способом, сравнимым с методами, основанными на аноксии, с использованием инертных газов, таких как азот или аргон. Интенсивность судорог после потери позы (то есть после потери сознания) аналогична наблюдаемой при методах, основанных на аноксии. Этот метод широко известен как LAPS (low-atmospheric-pressure stunning, оглушение при низком атмосферном давлении).

Физические методы

Следующие методы допустимы при соблюдении условий эвтаназии домашней птицы. Методы эвтаназии следует выбирать с учетом благополучия птицы, безопасности человека, квалификации и подготовки персонала, наличия оборудования и способности адекватно удерживать птицу.

Вывих шейных позвонков — при выполнении на находящейся в сознании птице, смещение шейных позвонков должно приводить к вывиху шейных позвонков без первичного размозжения позвонков и спинного мозга. Ручное или механиче-

ское смещение шейных позвонков можно использовать для птицы соответствующего размера и вида, если оно выполняется компетентным персоналом, который правильно применяет эту технику. Имеются данные, что у некоторых классов домашней птицы смещение шейных позвонков может не вызывать немедленной потери сознания. Техники смещения шейных позвонков, вызывающие вывих позвонков на черепе или рядом с ним, могут повысить эффективность эвтаназии и добиться более быстрого снижения рефлексов. При выполнении процедуры вручную следует схватить птицу за голени (или крылья, если захватывать за основание) и вытянуть шею, потянув за голову, применяя вентродорсальную вращательную силу к черепу до тех пор, пока очевидное, обычно внезапное, снижение сопротивления не укажет на разделение шейных позвонков. Разделение позвонков должно быть подтверждено пальпаторно. Раздавливание шейных позвонков и спинного мозга недопустимо до потери сознания.

Обезглавливание допустимо при соблюдении условий для эвтаназии домашней птицы, если оно выполняется компетентным персоналом. Обезглавливание должно выполняться острым инструментом, обеспечивающим быстрое и беспрепятственное отделение головы от шеи.

Травма тупым предметом, нанесенная рукой, — эвтаназия путем нанесения травмы головы тупым предметом рукой приемлема в условиях содержания домашних птиц особенно таких, как индейки или цыплята-бройлеры, которые слишком велики для этого способа эвтаназии. Такую травму должен наносить компетентный сотрудник. Тупая травма, нанесенная в лобно-теменную область головы одним достаточно сильным ударом, приводит к потере слуховых потенциалов у бройлеров, племенных бройлеров и индеек массой до 16 кг. Использование этого метода эвтаназии приводит к эмоциональному выгоранию персонала и может вызывать сомнения в гуманности применения к большому количеству птиц. По этой причине Американская ветеринарная медицинская ассоциация призывает в качестве метода эвтаназии искать альтернативные пути.

Электрошок — умерщвление электрическим током допустимо с условиями эвтаназии отдельных птиц. За птицами, подвергшимися поражению электрическим током, следует наблюдать, чтобы подтвердить смерть, или сразу же после этого применить дополнительные методы, такие как обескровливание или смещение шейных позвонков, чтобы гарантировать смертельный исход. У небольшого процента птиц фибрилляция желудочков не развивается даже при воздействии тока высокой силы.

Выстрел — огнестрельное оружие допустимо в условиях содержания домашней птицы и бескилевых птиц, находящихся на свободном выгуле, когда поимка или фиксация потенциально может вызвать сильный стресс для животного или быть опасным для человека. Стрельба из огнестрельного оружия не рекомендуется для содержащихся в неволе домашних птиц, где возможно ограничение свободы.

ПБП и НПБП — болты (проникающие или непроникающие) допустимы при эвтаназии домашней птицы (например, индеек, цыплят-бройлеров, бескилевых и водоплавающих птиц), ее должны проводить компетентные сотрудники (рис. 14–16). Устройство с болтом должно быть спроектировано и сконфигурировано в соответствии и с учетом вида и размера птицы, обеспечивать достаточную энергию удара и правильно применяться. Птицу необходимо надлежащим образом зафиксировать,

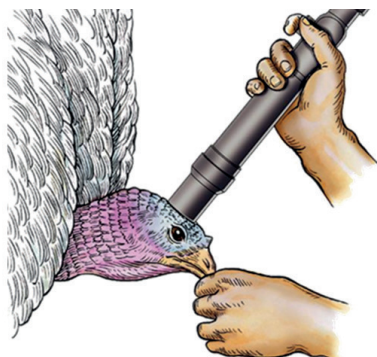


Рис. 14. Анатомическое место для установки болта у индеек (и домашней птицы с недостаточным развитием гребня). Устройство должно располагаться непосредственно на средней линии черепа и в самой высокой/широкой точке головы, при этом болт должен быть направлен прямо вниз, к мозгу. Чтобы обеспечить точное размещение болта и повысить безопасность персонала, птица должна быть правильно закреплена. Требуется дополнительный человек для удержания крыльев и/или лап птицы (в идеале грудка птицы должна лежать на твердой поверхности, чтобы птица оставалась спокойной) во время и после применения болта

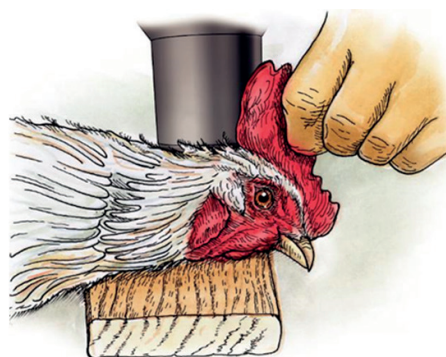


Рис. 15. Анатомическое место для установки болта у кур (и домашней птицы с развитым гребнем). Место установки должно находиться непосредственно за гребнем и по средней линии черепа, а болт должен быть направлен прямо вниз. Чтобы обеспечить точное размещение болта и повысить безопасность персонала, птица должна быть правильно закреплена. Необходимы дополнительные усилия, помогающие удерживать и оказывать противодействие удару фиксирующего болта, для этого вентральную часть головы птицы следует поместить на плоскую поверхность (например, на пол или доску), чтобы гарантировать оптимальное сотрясение от устройства



Рис. 16. Анатомическое расположение для размещения болта и желаемой траектории полета снаряда. К верхней части головы в средней точке воображаемой линии между наружными отверстиями «уша» следует приложить устройство с ПБП либо НПБП, либо с коротким проникающим болтом и наименьшим зарядом, подходящим для домашней птицы или кроликов

чтобы избежать травм персонала. Следует наблюдать за птицами после применения устройств, чтобы убедиться в их гибели. Если у птицы отмечаются признаки восстановления сознания, то необходимо вторичное воздействие ПБП или НПБП или проведение эвтаназии каким-либо другим способом, приемлемым для птицы, находящейся в сознании.

Дополнительные методы

Хлорид калия или сульфат магния — хотя внутривенное или внутрисердечное введение этих препаратов находящейся в сознании птице в качестве единственного метода эвтаназии неприемлемо, допускается их применение у птицы, находящейся под наркозом в качестве средства для эвтаназии.

Обескровливание — хотя этот метод эвтаназии и является неприемлемым для находящейся в сознании птицы, все же допускается обескровливание птиц, пребывающих под полным наркозом или без сознания по иным причинам, в качестве средства достижения смертельного исхода. Меры предосторожности в отношении биобезопасности во время и после обескровливания должны соблюдаться как часть надлежащего реагирования на заболевание.

Эмбрионы и новорожденные

В дополнение к методам с использованием ингаляционных средств, упомянутых ранее, следующие методы приемлемы при эвтаназии эмбрионов или новорожденных.

Оплодотворенные яйца могут быть разрушены при длительном воздействии CO_2 (20 мин), охлаждении (4 ч при 4 °C) или замораживании. В некоторых случаях ингаляционные анестетики могут вводиться через воздушную камеру яйца. Эмбрионы, подвергшиеся воздействию, могут быть обезглавлены.

Мацерация с использованием специально разработанного механического устройства с вращающимися лопастями или выступами вызывает немедленное дробление и гибель только что вылупившейся домашней птицы и яиц с эмбрионами. Проведенный Американской ассоциацией патологоанатомов птиц обзор использования имеющихся в продаже мацераторов для эвтаназии цыплят, индюшат и яиц показывает, что смерть от мацерации у домашней птицы в возрасте до 72 ч наступает немедленно с минимальной болью и дистрессом. Мацерация является альтернативой использованию CO_2 для эвтаназии домашней птицы в возрасте до 72 ч. В Федерации обществ зоотехников, Министерстве сельского хозяйства Канады, во Всемирной организации охраны здоровья животных и в Европейском совете считают, что мацерация эквивалентна вывиху шейных позвонков и сдавливанию черепа с точки зрения времени, поэтому является приемлемым средством эвтаназии для недавно вылупившихся домашних птиц.

Для мацерации требуется специальное оборудование, которое должно содержаться в отличном рабочем состоянии. Только что вылупившаяся домашняя птица должна быть доставлена в измельчитель таким образом и со скоростью, которые предотвращают задержку в точке входа в измельчитель и не вызывают травм, удушья или стресса перед мацерацией.

Птицы

В научной литературе имеется несколько рецензируемых отчетов об эвтаназии отдельных или небольших групп птиц. Существуют научные исследования, в которых сравниваются различные методы сокращения численности коммерческой домашней птицы, но они могут соответствовать или не соответствовать критериям эвтаназии, а также применяться или нет у отдельных или небольших групп птиц.

Поскольку этот таксон включает более 8000 видов, выбор метода эвтаназии для конкретной птицы будет в значительной степени зависеть от ее вида, размера, анатомических и физиологических характеристик, окружающей среды, от степени одомашнивания, клинического состояния, а также ожидаемой и фактической реакции на ограничение свободы. Персонал, выполняющий эвтаназию, должен быть знаком с видами, подлежащими эвтаназии, уметь интерпретировать поведение птиц, указывающее на стресс, и использовать свои знания и опыт для выбора вариантов фиксации и эвтаназии, которые облегчают или минимизируют страдания и приводят к быстрой смерти. Юридические требования могут применяться в случаях, связанных с исчезающими или мигрирующими видами.

Анатомия и физиология

Птицы анатомически и физиологически отличаются от млекопитающих, и эти различия будут влиять на то, можно ли и каким образом применять конкретные методы эвтаназии. Поскольку у птиц нет диафрагмы, у них единая целомическая полость, а не отдельные грудная и брюшная полости. При интрацеломических инъекциях необходимо следить за тем, чтобы вводимое вещество не попало в дыхательные мешки птицы, что потенциально может вызвать состояние удушья или подвергнуть ее дыхательную систему воздействию раздражающих веществ. Воздушные мешки действуют как мембрана для вентиляции маленьких нерасширяющихся легких птиц. Поскольку диафрагмы нет, птицы, чтобы дышать, должны иметь возможность перемещать грудину вентрально и краниально. У птиц также имеются полые пневматические кости (плечевая и бедренная), которые непосредственно сообщаются с дыхательной системой. Препараты, применяемые для эвтаназии, не следует вводить внутрикостным путем в плечевую или бедренную кость, поскольку это может привести к удушью или раздражению дыхательной системы. Однако внутрикостные катетеры можно безопасно устанавливать птицам, предпочтительно в дистальный или проксимальный отдел соответственно локтевой или большеберцовой кости.

Дыхательная система птицы обладает большей способностью перерабатывать воздух, чем у млекопитающего, благодаря уникальному однонаправленному потоку воздуха через легкие (который предотвращает смешивание вдыхаемого и выдыхаемого воздуха), более эффективному газообмену и большей площади поверхности, по которой может осуществляться обмен O_2 [больше по количеству и меньше по размеру воздушных капилляров (3 мкм), чем самые маленькие альвеолы млекопитающих (35 мкм)]. Из-за их метаболических особенностей птицы более чувствительны, чем млекопитающие, к ингаляционным токсикантам (например, канарейка в угольной шахте погибла раньше, чем работники обнаружили метан в воздухе).

Фиксация

Многие виды птиц можно фиксировать рукой для введения препаратов для эвтаназии. Сетки или другое оборудование могут потребоваться или улучшить условия как для птиц, так и для людей при работе с птицами, менее приспособленными к контакту с человеком (например, в зоопарках, дикие птицы). Для безопасного обращения с более крупными видами, такими как бескилевые птицы, может потребоваться несколько сотрудников, причем, по крайней мере, один дополнительный человек должен быть доступен для оказания помощи в случае чрезвычайной ситуации. Определенные фармакологические препараты могут быть использованы для хищных птиц, когда безопасность человека может быть поставлена под угрозу попытками ручной фиксации. Препараты, используемые для этой цели, вводятся в высоких дозах и могут служить первым этапом двухэтапного процесса эвтаназии.

Методы

Отдельных птиц в клинических или исследовательских условиях лучше всего привести в бессознательное состояние с помощью ингаляционного средства (например, изофлурана, севофлурана или галотана) перед внутривенным введением определенного инъекционного препарата для эвтаназии (например, пентобарбитала натрия). Следующие методы считаются допустимыми с учетом условий, характерных для некоторых видов птиц.

Приемлемые методы

Неингаляционные средства

Внутривенное введение средства при эвтаназии является самым быстрым и надежным способом для птиц, когда манипуляцию можно провести, не вызывая страха или беспокойства. Диким, напуганным или возбужденным птицам может потребоваться седативное средство или анестезия, прежде чем можно будет выполнить такую инъекцию. Когда внутривенная инъекция невозможна, предназначенные для эвтаназии препараты можно вводить интрацеломическим, внутрисердечным или внутрикостным путем, только если птица находится без сознания или под наркозом. Если для птиц используется интрацеломический путь введения, следует избегать инъекции в воздушные мешки из-за потенциального нарушения дыхания, раздражения дыхательной системы и замедленного всасывания через воздушные мешки. Средства для эвтаназии также не следует вводить внутрикостным путем в плечевую или бедренную кость из-за возможного раздражения дыхательной системы. Независимо от пути введения инъекционные средства могут осаждаться в тканях и индуцировать дефекты при вскрытии и гистопатологическом исследовании. Барбитураты и производные барбитуровой кислоты можно вводить внутривенно для эвтаназии анестезированных или должным образом обездвиженных неанестезированных птиц. Барбитураты, обычно используемые для инъекций, доступны в виде натриевых солей, которые являются щелочными и могут вызывать раздражение и болезненность при непосредственном введении в ткани, а не внутривенно. Следовательно, когда

внутривенная инъекция невозможна, инъекционные препараты для эвтаназии можно вводить внутрицеломическим, внутрисердечным или внутрикостным путем, только если птица находится без сознания или под наркозом. Концепция применения барбитуратов у млекопитающих в целом применима и к птицам.

Методы, применяемые с учетом условий

Ингаляционные средства

Ингаляционные анестетики могут использоваться в высоких концентрациях в качестве единственного метода эвтаназии или для приведения птиц в бессознательное состояние перед применением других методов эвтаназии. Воздействие высоких концентраций ингаляционных анестетиков (например, галотана, изофлурана и т.д.) допускается при эвтаназии птиц. Птицы, подвергшиеся воздействию высоких концентраций вдыхаемых анестезирующих газов, быстро теряют сознание. Эвтаназия с помощью вдыхаемых газов может быть более практичной, чем использование инъекционного средства, если необходимо усыпить большое количество птиц, например, в стаях или в вольерах. Эвтаназия путем воздействия газовых анестетиков также вызывает минимальное повреждение тканей и приводит к наименьшему количеству тканевых дефектов при вскрытии.

Углекислый газ — высокие (более 40%) концентрации CO_2 вначале вызывают анестезию, за которой следует потеря сознания. Эвтаназия путем воздействия CO_2 была описана для отдельных птиц и небольших групп, и применение этого способа для эвтаназии кур, индеек и уток было достаточно полно изучено, благодаря чему получена информация о времени до коллапса и смерти, также описаны изменения ЭЭГ и ЭКГ. Скорость введения CO_2 должна быть сбалансирована с ситуационными потребностями, поскольку быстрое повышение концентрации углекислого газа сокращает время до потери сознания, в то время как более медленное повышение концентрации может быть более гуманным, но при этом увеличивается время воздействия. В недавнем исследовании большинство индеек добровольно входили в камеру для кормления, заполненную аргоном (90%) или смесью аргона (60%) и CO_2 (30%) по сравнению только с 50% индеек, которые добровольно входили в камеру с высокой концентрацией CO_2 (72%).

Концепции использования CO_2 у млекопитающих, как правило, также применимы и к птицам. Воздействие CO_2 может вызвать непроизвольную (бессознательную) двигательную активность, такую как взмахи крыльями, которые могут повредить ткани и создать ложное впечатление о состоянии птицы и, кроме того, потенциально опасны для наблюдателей.

Есть некоторые особые соображения по использованию CO_2 для эвтаназии птиц. Новорожденные птицы могут быть более адаптированы к высоким концентрациям CO_2 , потому что окружающая среда невылупившейся птицы обычно имеет высокое содержание углекислого газа (до 14% у эмбриональных цыплят). Следовательно, концентрации CO_2 , необходимые для эвтаназии только что вылупившихся цыплят, могут быть намного выше (до 80–90%), чем для взрослых особей того же вида. Ныряющие птицы также имеют физиологическую адаптацию к гиперкапнии, и для них может потребоваться более высокий уровень концентрации CO_2 для эвтаназии.

Моноксид углерода — представления об использовании угарного газа для эвтаназии млекопитающих применимы и к птицам.

Азот и аргон, а также газовые смеси с участием этих газов (в том числе смеси с CO_2) используются для эвтаназии домашней птицы, но не рекомендуются для эвтаназии птиц-компаньонов.

Поведенческие реакции цыплят-бройлеров исследовали при кратковременном (10 с) воздействии 100% аргона, 100% азота или смеси (80% аргона : 20% азота и 80% азота : 20% аргона). Не наблюдалось каких-либо реакций на запах. У птиц, по-видимому, нет внутрилегочных хеморецепторов для азота и аргона, и это может объяснить отсутствие отвращения во время их первоначального воздействия и гипоксию от этих газов. Было показано, что в качестве средства для эвтаназии аргон, смешанный менее чем с 2% O_2 , вызывает быструю потерю позы (в среднем через 11 с), судороги (в среднем через 22 с), потерю сознания и смерть (изоэлектрическая ЭЭГ через 1 мин). Судороги могут возникать во время эвтаназии с использованием этих инертных газов, но поскольку эти признаки появились после коллапса и потери сознания, их применение считается гуманным для эвтаназии птиц.

Физические методы

Физические методы эвтаназии могут быть необходимы в некоторых полевых ситуациях, если другие методы эвтаназии нецелесообразны или неосуществимы. При этом имеется мало научной информации о влиянии различных физических методов на электрическую активность мозга птиц, что затрудняет оценку гуманности этих процедур.

Вывих шейных позвонков обычно используется для мелких птиц (менее 200 г), когда нет другого метода, но эта процедура проводилась и на птицах массой до 2,3 кг. Это следует выполнять только хорошо обученному персоналу. Существует ограниченное количество исследований, посвященных птицам, касающихся электрической активности головного мозга после смещения шейного отдела позвоночника. Вывих шейных позвонков у цыплят (средняя масса 2,3 кг) не приводил к потере реакций на визуальный стимул в 90% случаев по сравнению с использованием ПБП или НПБП, это свидетельствует, что менее чем в 10% случаев при вывихе шеи происходит сотрясение мозга. У 3-недельных индюков (средняя масса 1,6 кг) время до потери чувствительности (на основе движения мигательной перепонки) было больше, но время до наступления смерти (на основании прекращения движений) было меньше после смещения шейного отдела позвоночника по сравнению с использованием НПБП и тупой травмы, нанесенной рукой. Воспринимается ли боль, неизвестно. Сознание и восприятие боли не обязательно совпадают.

Обезглавливание на основании имеющейся в настоящее время информации считается приемлемым способом для эвтаназии мелких (менее 200 г) птиц. Руководство Американской ассоциации ветеринарных зоопарков по эвтаназии не домашних животных также перечисляет обезглавливание как приемлемое в определенных условиях и предполагает, что этот метод может быть предпочтительнее, чем вывих шейных позвонков, в определенных полевых условиях из-за явных доказательств успешной процедуры.

Выстрел как метод эвтаназии из огнестрельного оружия не рекомендуется для содержащихся в неволе птиц, если это возможно.

Дополнительные методы

Хлорид калия — хотя его введение находящейся в сознании птице без анестезии считается неприемлемым методом эвтаназии, хлорид калия можно вводить внутривенно или внутрисердечно, если птица находится без сознания или под наркозом перед инъекцией.

Обескровливание находящейся в сознании птицы без анестезии является неприемлемым подходом к эвтаназии, однако может использоваться для эвтаназии птиц, пребывающих без сознания или под наркозом. Этот подход может быть уместным, если образцы крови необходимы для диагностических или исследовательских целей.

Торакальная компрессия — хотя компрессия грудной клетки находящейся в сознании птицы без анестезии является неприемлемым подходом к эвтаназии, ее можно использовать в качестве дополнительного метода для животных, находящихся без сознания.

Неприемлемые методы

Торакальная компрессия (также известная как сердечно-легочная или сердечная компрессия) — это метод, который использовался биологами для прекращения жизни диких мелких млекопитающих и птиц в основном в полевых условиях. Однако данные, подтверждающие его применение, такие как степень вызванного дистресса и время до потери сознания или смерти, ограничены. Учитывая современные знания о физиологии мелких млекопитающих и птиц, нельзя предполагать, что сдавливание грудной клетки не приводит к боли или дистрессу до того, как животные теряют сознание. Следовательно, компрессия грудной клетки является неприемлемым методом эвтаназии животных, которые не находятся под глубоким наркозом, но подходит в качестве вторичного метода для животных, которые пребывают в бессознательном состоянии.

Яйца, эмбрионы и новорожденные

В позднем периоде эмбриогенеза птиц считается, что зародыши способны воспринимать боль, поэтому они должны быть подвергнуты эвтаназии методами, аналогичными тем, которые используются для новорожденных птиц, такими как передозировка анестетиков, обезглавливание или длительное (более 20 мин) воздействие CO_2 . Яйца на раннем этапе эмбриогенеза (менее 80%) могут быть уничтожены при длительном воздействии (более 20 мин) CO_2 , охлаждении (менее 4 °C в течение 4 ч) или замораживании. Поскольку исследования все еще продолжаются и касаются существующих видовых различий в развитии, эвтаназию эмбрионов следует проводить на основе доступных данных и с особым вниманием относиться к тому, чтобы, насколько это возможно, не возникало сознательных страданий.

Рыбы и водные беспозвоночные

Общие положения

Рыбы и водные беспозвоночные играют важную роль в качестве пищи, домашних питомцев, объектов исследования, выставочных животных и ключевых компонентов экосистем. В каждой из этих ситуаций может возникнуть необходимость эвтаназии особей. Накапливаются значительные данные, свидетельствующие о целесообразности рассмотрения восприятия боли у этих видов. Цель состоит в том, чтобы быстро провести эвтаназию с минимально возможным количеством боли и страданий.

Поскольку окружающая среда, связанная с рыбой и водными беспозвоночными, в каждом случае различна, а знания об эволюционном и социальном статусе поймолотермных животных (низших позвоночных и беспозвоночных) ограничены, определение и применение соответствующих критериев эвтаназии могут быть затруднены.

Соображения, касающиеся человека и животных

Из-за разнообразия физиологических и анатомических характеристик наблюдаемых видов рыб и водных беспозвоночных оптимальные методы эвтаназии будут различаться. Выбор эвтаназии для рыб и водных беспозвоночных должен учитывать реакцию животных на стресс и проблемы безопасности для человека, а также различия в метаболизме, дыхании и устойчивости к церебральной гипоксии. Практически все методы требуют, чтобы персонал был тщательно обучен, а его действия контролировались. Погружение рыбы или водного беспозвоночного в соответствующий раствор для эвтаназии часто является более простым методом, чем использование инъекционных форм эвтаназии. Интрацеломические инъекции сопряжены с неотъемлемым риском повреждения органов, и время реакции может варьировать. Внутривенные инъекции требуют осторожного обращения с рыбой, а также наличия обученного и опытного персонала. Внутримышечные инъекции кетамина, агонистов α_2 -адренорецепторов или телазола можно вводить с помощью шприца или пистолета для дротинок более крупной рыбе, чтобы облегчить фиксацию рыбы и снизить стресс при обращении с ней, но хирургическая анестезия у костистых рыб достигается редко. Во всех случаях следует проконсультироваться с ветеринарами и другими специалистами, имеющими опыт работы с интересующими видами; при окончательном выборе наилучшего метода следует принимать во внимание профессиональное суждение и соответствующий опыт. Кроме того, зачастую труднее установить, когда мертва рыба или водное беспозвоночное, чем ответить на тот же вопрос в случае с птицами и млекопитающими.

Подготовка и окружающая среда

В целом подготовка к эвтаназии рыб должна быть очень похожа на подготовку к анестезии. Если возможно, отказ от еды на 12–24 ч перед эвтаназией уменьшит срыгивание, дефекацию и образование азотистых отходов. Окружающая среда должна быть как можно более тихой и нестимулирующей, учитывая обстоятельства.

Интенсивность света следует уменьшить, если возможно, но оставить достаточное освещение для персонала. Этого также можно добиться, используя темный или непрозрачный контейнер и крышку или менее интенсивное освещение (например, использовать красный свет, так как он плохо проникает в воду).

Качество воды должно быть таким же, как в среде, в которой ранее находилась рыба, или адаптировано для данного вида и ситуации на время проведения эвтаназии. Если качество воды приемлемо для здоровья рыб, следует использовать воду, в которой они содержались или были пойманы, при этом могут потребоваться дополнительная аэрация и контроль температуры. Либо раствор для иммерсионной эвтаназии готовят с использованием воды из системы содержания рыб и помещают в него рыбу, либо концентрированную форму анестезирующего средства в виде раствора (при необходимости содержащего буферное средство) вводят непосредственно в контейнер с рыбой, чтобы свести к минимуму стрессовые факторы. При усыплении большой популяции рыб важно следить за качеством воды в ванне для анестезии (в частности, за температурой, содержанием растворенного O_2 , аммиака и органических веществ). Возможно, потребуется периодически добавлять или заменять средство для эвтаназии, поскольку оно будет удаляться при попадании в кровоток рыбы через жабры. Методы эвтаназии должны быть протестированы на одном животном или небольшой группе перед использованием в большой популяции для незнакомых видов, чтобы обеспечить их эффективность. Если требуется контакт с рыбой, следует использовать соответствующее оборудование (сети, перчатки), чтобы свести к минимуму факторы стресса.

Показатели гибели рыб и водных беспозвоночных

Поскольку тысячи видов рыб и водных беспозвоночных сильно различаются по анатомическим и физиологическим характеристикам, для некоторых могут отсутствовать надежные индикаторы смерти. Однако есть несколько стандартных подходов, которые могут быть полезны для многих наиболее часто встречающихся видов. Потеря движения, реакции на любой раздражитель и начальная вялость (до трупного окоченения) могут служить показателями гибели рыб и некоторых водных беспозвоночных. Более полезными индикаторами для многих рыб являются остановка дыхания (прекращение ритмической оперкулярной активности) минимум на 30 мин и неспособность закатывать глаза (вестибулоокулярный рефлекс, движение глаз при раскачивании рыбы из стороны в сторону). Последнее качество отсутствует у рыб, подвергшихся глубокой анестезии или эвтаназии. Сердце может продолжать сокращаться даже после смерти мозга или извлечения его из тела рыб, поэтому наличие сердцебиения не является надежным показателем жизни, но устойчивое отсутствие сердцебиения свидетельствует о смерти. Для менее активных организмов или организмов со специфическими анатомическими или физиологическими адаптациями, препятствующими использованию этих индикаторов, может быть труднее оценить потерю сознания и смерть, поэтому рекомендуется консультация со специалистами, знакомыми с этими видами. Вторичные методы эвтаназии рекомендуются, когда это уместно, после наркоза рыбы или водного беспозвоночного, чтобы вызвать гибель.

Утилизация усыпленных животных

Любая усыпленная рыба или беспозвоночное должны быть немедленно удалены из аквариума, пруда или другого сосуда и утилизировано в соответствии со всеми применимыми государственными и местными нормами таким образом, чтобы снизить риск распространения болезней, предотвратить появление вредителей и других нецелевых видов, а также обеспечить безопасность человека и окружающей среды. Предотвращение загрязнения окружающей среды рыбой на любой стадии жизни является важным фактором при подтверждении смерти и утилизации останков животного.

Рыба и водные беспозвоночные, предназначенные для употребления в пищу человеком

Как указывалось, термин «убой» используется главным образом для обозначения умерщвления животных, используемых для потребления человеком, и настоящее руководство не рассматривает эти случаи. Однако, когда требуется эвтаназия животных, используемых для употребления в пищу человеком, остатки тканей от применения лекарств и других химических веществ делают многие методы неприемлемыми. Использование любых неутвержденных химических веществ для эвтаназии запрещает попадание рыбы в пищевую цепочку либо путем переработки в рыбную муку, либо путем распространения в качестве продукта потребления. С учетом сказанного, в настоящее время не существует одобренных препаратов для эвтаназии рыб или водных беспозвоночных. Диоксид углерода является препаратом выбора для эвтаназии водных организмов, которые предполагается использовать в пищу. Физические методы, приемлемые при определенных условиях, включают нанесение травмы головы тупым предметом рукой, обезглавливание, поражение электрическим током и прокол.

Плавниковые рыбы

Распространенные методы, используемые для усыпления рыбы, включают неингаляционные (например, погружение и инъекции) и физические методы. Из-за общих различий в анатомии и применении, наблюдаемых между рыбами и наземными животными (особенно в отношении первичных органов дыхания в водной среде по сравнению с воздушной), методы, включающие добавление лекарств в среду обитания рыбы (то есть в воду), для целей настоящего документа считаются неингаляционными.

Ниже приведены описания методов, используемых для умерщвления рыбы, которые включают одноэтапные и двухэтапные процедуры. Каждый метод дополнительно классифицируется как приемлемый при определенных условиях или неприемлемый с учетом характеристик методов и условий, в которых проводится эвтаназия, включая частную ветеринарную практику (например, для домашних и декоративных рыбок), предприятия оптовой и розничной торговли декоративными (аквариумными) рыбами, исследовательские лаборатории и рыбное хозяйство.

хозяйство на открытом воздухе и в рыболовстве. Приемлемый способ надежно соответствует требованиям гуманной эвтаназии. Методы, подходящие при определенных условиях, надлежащим образом удовлетворяют требованиям эвтаназии при их соблюдении, в свою очередь неприемлемый метод — нет. Поскольку анатомические и физиологические характеристики рыб сильно отличаются от таковых млекопитающих и птиц, следовательно, и классификация методов может различаться от той, которая была рекомендована для других видов.

Неингаляционные средства

Погружение (1 этап) — преднамеренная передозировка путем погружения в анестезирующие растворы — распространенный метод эвтаназии рыб. Некоторые виды испытывают отвращение к определенным анестетикам, а другие виды — нет. С помощью тестирования предпочтения и избегания многие анестетики, используемые в настоящее время для эвтаназии, были идентифицированы как вызывающие неприятие в той или иной степени. Несмотря на некоторые свидетельства дистресса и отвращения, иммерсивные анестетики продолжают вводить рыбам, потому что преимущества, связанные с их использованием, перевешивают любые страдания и неприянь, которые они могут вызвать, подобно использованию вдыхаемых средств для дышащих воздухом животных. Рыбу следует оставить в растворе анестетика не менее чем на 30 мин после прекращения оперкулярного дыхания. Было показано, что использование забуференного MS 222 в технике одноэтапного погружения было недостаточным для эвтаназии золотых рыбок (*Carassius auratus*), вида, устойчивого к гипоксии. Результаты этого исследования показывают, что для эвтаназии устойчивых к гипоксии видов может потребоваться двухэтапный метод: этап 1 — погружение, для приведения рыбы в бессознательное состояние; этап 2 — вторичный, дополнительный метод для завершения эвтаназии (например, обезглавливание, прокол или замораживание).

Варианты иммерсионных средств включают следующие.

1. Бензокаин или гидрохлорид бензокаина, забуференный. Растворы для погружения следует готовить в концентрациях 250 мг/л и более, и они должны быть забуферены.
2. Углекислый газ. Погружение в насыщенную CO₂ воду вызывает наркоз и потерю сознания через несколько минут. Некоторые виды могут проявлять гиперактивность до потери сознания. Чистота и концентрация CO₂ важны для обеспечения эффективности. Допустим только CO₂ из источника, который позволяет тщательно регулировать концентрацию, например, из баллона. При использовании CO₂ необходимо соблюдать осторожность, чтобы предотвратить воздействие на персонал (эвтаназия должна проводиться в хорошо проветриваемых помещениях).
3. Этанол. Этанол был предложен в качестве приемлемого альтернативного метода эвтаназии рыб. Угнетающее действие этанола на ЦНС хорошо описано, и воздействие на рыбок данио посредством погружения стало хорошей моделью для оценки поведенческих и молекулярных реакций на алкоголь в концентрациях от 10 до 30 мл 95% этанола/л. В этой дозе алкоголь вызывает

анестезию, а длительное погружение приводит к смерти вследствие угнетения дыхания, вызывающего аноксию. Это не эквивалентно погружению рыбы непосредственно в консервирующий раствор этанола (70%), что неприемлемо в качестве метода эвтаназии.

4. Эвгенол, изоэвгенол и гвоздичное масло. По возможности следует использовать продукты со стандартизированными известными концентрациями эфирных масел, чтобы можно было точно дозировать. Концентрации, необходимые для анестезии, будут варьировать в зависимости от вида и других факторов, но для некоторых видов могут составлять всего 17 мг/л. Для эвтаназии потребуются более высокие концентрации (в 10 раз превышающие верхний предел для анестезии). Эти масла плохо растворяются в воде; введение раствора шприцем с тонкой иглой в воду в контейнере, используемом для эвтаназии, помогает обеспечить рассеивание в воде. Рыбу следует оставить в растворе анестетика как минимум на 10 мин после прекращения оперкулярного дыхания. Некоторые исследования на грызунах показывают, что эта группа анестетиков может вызывать паралич в дополнение к анестезирующим эффектам, а обезболивающие свойства неизвестны. Запрещено использование гвоздичного масла и эвгенола в качестве анестетиков для рыб, которые могут попасть в пищевую цепочку. Изоэвгенол является потенциальным канцерогеном, поэтому безопасность человека при применении этого средства вызывает беспокойство.
5. Изофлуран, севофлуран. Эти концентрированные жидкие анестетики можно добавлять в воду, хотя обычно они плохо растворяются в ней. Введение раствора шприцем с тонкой иглой в воду в контейнере, используемом для эвтаназии, способствует рассеиванию средства в воде. Можно использовать дозы от более 5 до 20 мл/л (в 10 раз выше верхнего предела для анестезии). Однако, поскольку оба анестетика очень летучи, безопасность человека вызывает тревогу, и использование в хорошо проветриваемом помещении является обязательным.
6. Хинальдина сульфат. Растворы для погружения следует готовить в концентрациях 100 мг/л и более. Сульфат хинальдина подкисляет воду, следовательно, требуется буферизация, чтобы предотвратить дистресс от резкого падения pH.
7. Трикаина метансульфонат, забуференный (MS 222, TMC). Отрицательная реакция на MS 222 была продемонстрирована у рыбок данио и медака, в то время как у карпа, толстоголового гольяна и радужной форели неприязни не было. Несмотря на признаки дистресса и отвращения, иммерсивные анестетики продолжают вводить рыбам, потому что преимущества, связанные с их использованием, перевешивают любые страдания и неприятие, которые они могут вызвать. Растворы должны быть забуферены, и концентрации, необходимые для эвтаназии, могут варьировать в зависимости от вида, стадии жизни и химических параметров воды. Концентрация от 250 до 500 мг/л, или в 5–10 раз превышающая дозу анестетика, эффективна для большинства видов. Было показано, что MS 222 в дозе 400 мг/л неэффективен для некоторых видов (например, осетровых в Мексиканском заливе). Было продемон-

стрировано, что использование забуференного MS 222 в одноступенчатой иммерсионной методике было неадекватным для эвтаназии золотых рыбок. Результаты этого исследования подтверждают рекомендацию по использованию двухэтапного метода эвтаназии золотых рыбок и некоторых других видов, устойчивых к гипоксии, например, применение цихлида, во время первого этапа происходит погружение рыбы в бессознательное состояние, а при втором используются дополнительные средства и методы (в том числе обезглавливание, прокалывание или замораживание) для полной эвтаназии. Рыбу, которая слишком велика для практического или рентабельного погружения в смертельные дозы забуференного MS 222, можно усыпить, нанеся концентрированный забуференный раствор непосредственно на жабры.

8. 2-Феноксизтанол. Растворы для погружения следует готовить в концентрациях от 0,5 до 0,6 мл/л, или от 0,3 до 0,4 мг/л.
9. Лидокаин. Буферный раствор с концентрацией 400 мг/л эффективен для эвтаназии взрослых рыбок данио, но реакция на лидокаин путем погружения значительно различается у разных видов.

Инъекция — инъекционные препараты вводят для эвтаназии внутривенно, внутрицеломически, внутримышечно и внутрисердечно.

1. Пентобарбитал (1 этап). Пентобарбитал натрия (от 60 до 100 мг/кг) можно вводить внутривенно, внутрисердечно или внутрицеломически для эвтаназии. Пентобарбитал также можно вводить внутрисердечно анестезированным животным в качестве второго этапа двухэтапной процедуры эвтаназии. Смерть обычно наступает в течение 30 мин.
2. Кетамин (2 этапа). Кетамин можно вводить в дозе от 66 до 88 мг/кг посредством внутримышечной инъекции с последующим использованием летальной дозы пентобарбитала. Наблюдатели должны быть проинформированы о возможности мышечных спазмов, вызванных кетамином, во время индукции.
3. Кетамин-медетомидин (2 этапа). Кетамин в дозе от 1 до 2 мг/кг совместно с медетомидином в дозе от 0,05 до 0,1 мг/кг может вводиться внутримышечно, в последующем применяется летальная доза пентобарбитала.
4. Пропофол (2 этапа). Дозу от 1,5 до 2,5 мг/кг можно вводить внутривенно с последующей инъекцией смертельной дозы пентобарбитала.

Физические методы

Для эвтаназии могут быть применены следующие методы при условии, что они выполняются с использованием надлежащего оборудования обученным персоналом.

1. Обезглавливание с последующим проколом (2-й этап). Быстрое отделение головы и головного мозга от спинного с последующим проколом головного мозга приведет к быстрой смерти и потере сознания. Обезглавливание само по себе не считается гуманным подходом эвтаназии, особенно для видов, которые могут быть особенно устойчивы к низкому содержанию O_2 . Прокалывание помогает обеспечить быструю потерю функции мозга и смерть для этих видов.

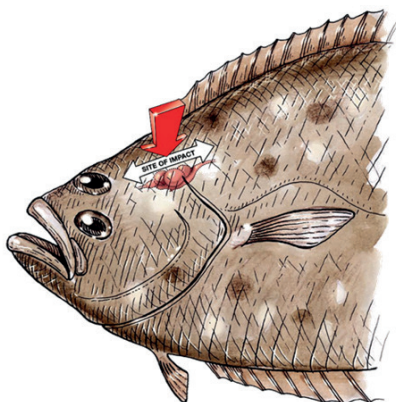


Рис. 17. Анатомическое место для нанесения травмы тупым предметом, нанесенной рукой у рыбы. Размер, вид и анатомия рыбы, а также характеристики удара (включая его точность, скорость и массу дубинки) будут определять эффективность травмы. Место удара должно быть нацелено на область, где мозг находится ближе всего к поверхности головы, и где череп наиболее тонкий

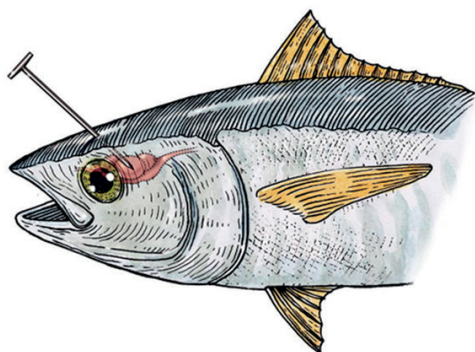


Рис. 18. Анатомические места для содержащихся в неволе крупных видов рыб. Пистолет с НПБП имеет либо широкую грибовидную головку, либо плоскую, которая не проникает в мозг. При использовании устройств с невыпадающим болтом (в том числе с шипами) снаряд должен быть направлен в задний мозг рыбы; следует уделять особое внимание максимальному разрушению мозговой ткани

2. Рассечение шейных позвонков с помощью ножа или другого острого инструмента, вводимого каудально к черепу, для отделения спинного мозга и шейных позвонков с последующим прокалыванием (2-й этап). Этот подход похож на метод обезглавливания (разрушение связей между головным и спинным мозгом) и прокол (разрушение мозговой ткани), за исключением того, что голова все еще физически прикреплена мускулатурой к телу.
3. Тупая травма, нанесенная рукой (сотрясение черепа; рис. 17) с последующим проколом или обескровливанием (2-й этап). Нанесенная рукой травма тупым предметом (быстрый, точно нанесенный удар достаточной энергии по черепу дубинкой соответствующего размера) может вызвать немедленную потерю сознания и, возможно, смерть, но для обеспечения смертельного исхода следует провести прокол или обескровливание. Размер, вид и анатомия рыбы, а также характеристики удара (включая его точность, скорость и массу предмета) будут определять эффективность нанесенной рукой травмы тупым предметом. Эта процедура требует обучения и контроля за профессиональными навыками. Анатомические особенности, такие как размещение глаз, могут помочь определить расположение мозга.
4. ПБП или НПБП (рис. 18). Эти устройства обычно используются у крупных видов рыб.

5. Мацерация (1 этап). При правильном применении с использованием хорошо обслуживаемого мацератора, специально разработанного для размера усыпляемой рыбы, смерть наступает почти мгновенно. Процесс эмоционально неприятен для некоторых работников и наблюдателей.
6. Быстрое охлаждение (гипотермический шок; 1 или 2 этапа). Для рыбок данио допустимо умерщвление путем быстрого охлаждения (2–4 °С) до потери ориентации, оперкулярного дыхания и последующего выдерживания в воде, охлажденной льдом, в зависимости от размера и возраста рыбы. Взрослые особи рыбок данио (длиной около 3,8 см) могут быть быстро умерщвлены (от 10 до 20 с) при помощи погружения в воду температурой от 2 до 4 °С. Взрослых рыбок данио следует подвергать воздействию не менее 10 мин, а мальков — от 4 до 7 дней после оплодотворения в течение не менее 20 мин после потери оперкулярного дыхания, чтобы гарантировать гибель. Было показано, что использование быстрого охлаждения и использование только забуференного MS 222 являются ненадежными методами эвтаназии для эмбрионов рыбок данио. Для обеспечения эмбриональной летальности к этим методам следует применять дополнительный способ, такой как использование разбавленного раствора гипохлорита натрия или кальция в концентрации 500 мг/л. Если необходимо обеспечить гибель на других стадиях жизни, за быстрым охлаждением может последовать либо одобренный дополнительный метод эвтаназии, либо гуманный метод умерщвления. Пока не будут проведены дальнейшие исследования, быстрое охлаждение приемлемо в условиях для других, аналогичных по размеру тропических и субтропических стенотермических видов. Видовая термостойкость и размер тела будут определять целесообразность и эффективность быстрого охлаждения для эвтаназии рыбы. Размер рыбы важен, потому что скорость потери тепла за счет теплопроводности от тела пропорциональна площади его поверхности. Исходя из этих двух факторов, было высказано предположение, что быстрое охлаждение в воде, связанное с образованием ледяной суспензии, является подходящим методом уничтожения мелких тропических и субтропических видов рыб длиной 3,8 см (от кончика рыла до заднего конца последнего позвонка) или меньше, поскольку им требуются более низкие температуры для эвтаназии.

Для обеспечения оптимального гипотермического шока (то есть быстрого умерщвления) перевод рыбы в ледяную воду должен быть завершен как можно быстрее. Это означает, что должны быть достигнуты быстрые переходы от температуры акклиматизации к 2–4 °С. Этого можно добиться, используя минимальный объем воды для переноса рыбы (например, сачок для помещения рыбы в охлажденную воду). Кроме того, рыба не должна находиться в прямом контакте со льдом в воде; скорее в ледяной суспензии должно быть образовано углубление, чтобы вся поверхность рыбы подвергалась воздействию охлажденной воды. Полный контакт с холодной водой обеспечивает оптимальную экспозицию и быстрое охлаждение рыбы. Контейнеры с хорошей изоляцией помогут сохранить ледяную суспензию, а для подтверждения температуры воды можно использовать термометр.

Этот метод эвтаназии не подходит для умеренных, прохладных или устойчивых к холоду рыб, таких как карп, кои, золотая рыбка или другие виды, которые могут

выжить при температуре 4 °С и ниже. Он подходит для рыбок данио и других мелкотелых (длиной 3,8 см или меньше) тропических и субтропических stenothermных рыб, для которых нижний диапазон летальных температур превышает 4 °С. Этот метод также может быть приемлемым для рыб мелкого и среднего размера (длиной от 2,8 до 13,5 см), например, австралийской речной шеды, если после того, как рыба перестала реагировать, применяются методы вторичной эвтаназии. Использование этого метода нецелесообразно для других рыб среднего и крупного размера до тех пор, пока не станут доступны данные о его применимости для эвтаназии этих видов.

Дополнительные методы

Обезглавливание, прокол, обескровливание, замораживание и другие физические или химические методы разрушения функций мозга могут использоваться в качестве второго шага двухэтапной процедуры, когда рыба была приведена в бессознательное состояние до их применения.

Если необходимо обеспечить эвтаназию, за быстрым охлаждением для определенных групп может последовать одобренный метод дополнительной эвтаназии. Использование разбавленного раствора гипохлорита натрия или гипохлорита кальция может быть дополнительным методом для ранних стадий жизни рыб, включая эмбрионы и личинки.

Неприемлемые методы

Ниже приведены неприемлемые методы эвтаназии в любой ситуации. Смыв рыбы в канализационные, септические и другие виды канализационных систем недопустим по многим причинам. Химический состав и качество воды могут отсрочить время до смерти и привести к воздействию вредных соединений. Для систем, расположенных в непосредственной близости от естественных водотоков и/или связанных с ними, выделение или передача патогенов может происходить от больных животных или животных-носителей. Медленное охлаждение или замораживание ненаркотизированных животных, в том числе помещение рыбы в морозильную камеру без предварительного наркоза, также является неприемлемым методом. Смерть от аноксии и высыхания после извлечения из воды или от аноксии в воде, любой смертельный исход, вызванный воздействием едких химикатов, а также длительной травмой до потери сознания, недопустимы.

Эвтаназия на разных жизненных этапах

Эффективность методов эвтаназии, описанных в этих рекомендациях, может варьировать в зависимости от стадии жизни, а также от вида. На ранних стадиях жизни рыб, включая эмбрионы и личинки, могут потребоваться более высокие концентрации иммерсионных анестетиков или более длительная продолжительность воздействия. Например, погружение в забуференный раствор MS 222 с концентрацией более 1 г/л не является надежным методом для умерщвления некоторых рыб на более молодых стадиях жизни. Для некоторых видов и в некоторых ситуациях

может потребоваться применение дополнительных методов, чтобы гарантировать смерть этих животных после анестезии буферным MS 222. Быстрое охлаждение с последующим дополнительным методом, таким как погружение в разбавленный раствор гипохлорита натрия или гипохлорита кальция, приемлемо для эмбрионов и личинок рыбок данио в качестве двухэтапного метода, а также при определенных условиях в качестве двухэтапного метода для уничтожения эмбрионов и личинок других видов.

Рыба в особых условиях обитания

Частная ветеринарная практика — домашние и декоративные (выставочные) рыбы

Владельцы, у которых есть домашние или выставочные рыбы любого вида, часто ценят их как домашних животных-компаньонов, в данном случае связь между человеком и животным подобна той, что наблюдается у людей, имеющих других домашних животных, таких как собаки и кошки. Поэтому при выборе методов эвтаназии важно учитывать восприятие владельца. Владелец должен быть предоставлена возможность присутствовать во время эвтаназии, когда это возможно; однако они также должны быть проинформированы о том, какой метод будет использоваться, и что они могут наблюдать во время эвтаназии. Например, владельцы могут полагать, что фаза возбуждения при анестезии, которая может привести к повышенной двигательной активности или появлению ажитации, является чрезмерно болезненной или стрессовой для рыбы, даже если это не так.

Методы, подходящие для использования в этих обстоятельствах.

1. Погружение в растворы забуференного MS 222, бензокаина, изофлурана и севофлурана, сульфата хинальдина и 2-феноксиэтанола.
2. Инъекции пентобарбитала, кетамина с последующим введением пентобарбитала, комбинации кетамина и медетомидина и дальнейшим использованием пентобарбитала и пропофола с последующим введением пентобарбитала.

Владельцы должны быть проинформированы о возможности возникновения мышечных спазмов, вызванных кетаминном, во время индукции при использовании этого средства.

Следующий метод, приемлемый в подобных условиях, — это погружение в эвгенол, изоэвгенол или гвоздичное масло. Рыбу следует оставить в растворе не менее чем на 10 мин после прекращения оперкулярного дыхания.

Надо сказать, что не рекомендуется использовать следующие методы.

1. Погружение в воду, насыщенную CO₂, не рекомендуется, поскольку некоторые рыбы, подвергшиеся воздействию этого метода, могут стать гиперактивными, что может привести к замешательству персонала и владельцев.
2. Травмирование головы тупым предметом рукой, обезглавливание и прокалывание не рекомендуются, поскольку их применение может причинить беспокойство владельцам и персоналу.

На ранних стадиях жизни рыб, включая эмбрионы и личинки, могут потребоваться более высокие концентрации иммерсионных анестетиков или более

длительная продолжительность воздействия. Например, погружение в буферный раствор MS 222 с концентрацией более 1 г/л не является надежным методом умерщвления некоторых рыб на ранних стадиях жизни. Для некоторых видов и в определенных ситуациях может потребоваться применение дополнительных методов, гарантирующих смертельный исход этих животных после анестезии забуференным MS 222.

Быстрое охлаждение с последующим погружением в разбавленный раствор гипохлорита натрия или гипохлорита кальция приемлемо для эмбрионов и личинок рыбок данио в качестве двухэтапного метода, а также при определенных условиях в качестве двухэтапного метода уничтожения эмбрионов и личинок других видов.

Объекты оптовой и розничной торговли аквариумными рыбками

Пресноводных и морских аквариумных рыб в коммерческих целях отлавливают в дикой природе, а также разводят в неволе. Тропические аквариумные рыбки продаются в розничных зоомагазинах и рыбных магазинах, где их содержат по одному или более виду в одном аквариуме. Отдельные рыбы или популяции рыб получают травмы или заболевают, что может потребовать эвтаназии. Методы эвтаназии, используемые в этих обстоятельствах, должны быть применимы к отдельным рыбам, ко всем рыбам в аквариуме, к рыбам, содержащимся в нескольких аквариумах с центральной системой фильтрации, или к рыбным прудам. В определенных ситуациях эвтаназия может оказаться невозможной и требуются методы депопуляции.

Метод, допустимый для использования в этих обстоятельствах: погружение в растворы забуференного MS 222, бензокаина, этанола и сульфата хиналдина. Рыбу следует оставить в растворе анестетика на 30 мин после прекращения оперкулярного движения.

Далее следуют методы, приемлемые с учетом условий.

1. Погружение в насыщенную CO_2 воду (при условии, что наблюдатели осведомлены и могут принять тот факт, что некоторые рыбы, подвергшиеся воздействию этого метода, проявляют гиперактивность и оказываются в дистрессе); погружение в раствор эвгенола, изоэвгенола или гвоздичного масла, а также в раствор этанола.
2. Обезглавливание, рассечение шейных позвонков или травма тупым предметом, нанесенная рукой, в качестве 1-го этапа двухэтапного метода с последующим проколом.
3. Замораживание может использоваться как дополнительный метод эвтаназии после анестезии.
4. Быстрое охлаждение (гипотермический шок) для мелкотелых (длиной 3,8 см и менее) тропических и субтропических stenothermных рыб, для которых нижняя смертельная температура превышает 4 °C.

В этих обстоятельствах не рекомендуется следующий метод: использование инъекционных анестезирующих препаратов, включая барбитураты, особенно

для более крупных видов, что требует надзора ветеринара и особого учета используемых средств.

На ранних стадиях жизни рыб, включая эмбрионы и личинки, могут потребоваться более высокие концентрации иммерсионных анестетиков или более длительная продолжительность воздействия. Например, погружение в буферный раствор MS 222 с концентрацией более 1 г/л не является надежным методом умерщвления некоторых рыб на ранних стадиях жизни. Для некоторых видов и в некоторых ситуациях может потребоваться применение дополнительных методов, гарантирующих смерть этих животных после анестезии забуференным MS 222.

Быстрое охлаждение с последующим погружением в разбавленный раствор гипохлорита натрия или гипохлорита кальция приемлемо в качестве двухэтапного метода для уничтожения не только эмбрионов и личинок рыбок данио, но также и эмбрионов, и личинок других видов.

Исследовательские центры

Исследователи, работающие в лабораториях, должны иметь под рукой материалы для проведения надлежащей эвтаназии своих объектов, когда это необходимо, и проходить обучение и мониторинг на предмет владения выбранными методами. Многие учреждения, использующие рыбу в качестве объекта исследования, занимаются биомедицинскими исследованиями. Рыбки данио — наиболее распространенный вид, используемый для исследований, обычно их содержат в небольших аквариумах. Однако некоторые исследовательские учреждения имеют крупномасштабные системы содержания и производства или содержат другие более крупные виды рыб, для которых могут потребоваться дополнительные варианты эвтаназии. При необходимости следует обратиться к специалистам, хорошо осведомленным об этих условиях и видах.

Методы, допустимые для использования в этих обстоятельствах.

1. Погружение в растворы забуференного MS 222, бензокаина, лидокаина, сульфата хинальдина и 2-феноксиэтанола. Рыба, усыпленная таким способом, не одобрена для употребления в пищу человеком.
2. Быстрое охлаждение (гипотермический шок) приемлемо для рыбок данио и австралийской речной шеды, в этом случае перевод из привычных температур в воду с ледяной суспензией температурой от 2 до 4 °C должен происходить, как можно быстрее.

Следующие методы, приемлемые в подобных условиях.

1. Погружение в воду, насыщенную CO₂ (при условии, что наблюдатели осведомлены и могут согласиться с тем, что некоторые рыбы, подвергшиеся воздействию этого метода, могут проявить гиперактивность и оказаться в дистрессе), или в раствор эвгенола, изоэвгенола или гвоздичного масла.
2. Быстрое охлаждение (гипотермический шок) до температуры от 2 до 4 °C допустимо в условиях для мелкотелых (длиной 3,8 см или менее) тропических и субтропических стенотермных рыб, для которых нижний диапазон летальных температур превышает 4 °C. Использование этого метода не подходит для других рыб со средним и крупным телом до тех пор, пока не появятся дополнительные данные по этим видам.

3. Мацерация приемлема в условиях, когда смерть наступает мгновенно из-за использования хорошо обслуживаемого мацератора, предназначенного для размера умерщвляемой рыбы. Процесс, вероятно, будет эмоционально неприятным для тех, кто за ним наблюдает.
4. Обезглавливание с последующим проколом. Быстрое отделение головы и головного мозга от спинного с последующим проколом головного мозга приведет к быстрой смерти и потере сознания.
5. Нанесенная рукой тупая травма (сотрясение черепа) с последующим проколом или обескровливанием.

На ранних стадиях жизни рыб, включая эмбрионы и личинки, могут потребоваться более высокие концентрации иммерсионных анестетиков или более длительная продолжительность воздействия. Например, погружение в буферный раствор MS 222 с концентрацией более 1 г/л не является надежным методом умерщвления некоторых рыб на более ранних стадиях жизни. Для некоторых видов и в определенных ситуациях может потребоваться применение дополнительных методов, гарантирующих гибель этих животных после анестезии буферизованным MS 222.

Быстрое охлаждение с последующим погружением в разбавленный раствор гипохлорита натрия или гипохлорита кальция приемлемо в качестве двухэтапного метода не только для эмбрионов и личинок рыбок данио, но и для эвтаназии эмбрионов и личинок других видов.

Рыба, содержащаяся на открытом воздухе и в рыбных хозяйствах

Полевые исследования рыб проводятся в сложных условиях, которые должны быть поняты как сотрудниками, так и соответствующим комитетам по благополучию животных. Полевые исследования часто проводятся в масштабах, сопоставимых с коммерческим рыболовством, с использованием того же оборудования, лодок и персонала. Большое количество рыбы, ограниченное пространство в лодке, неблагоприятные условия окружающей среды и соображения безопасности персонала могут оправдывать использование методов добычи, которые, бывает, и не соответствуют критериям эвтаназии, но во всех ситуациях боль и дистресс должны быть сведены к минимуму в максимально возможной степени. Аналогичным образом биологи, занимающиеся рыболовством, могут столкнуться с ситуациями, связанными с большим количеством рыб, требующих депопуляции (например, инвазивных видов), а не эвтаназии. Полевые работы с рыбой также могут проводиться в меньших масштабах в условиях, делающих возможной эвтаназию. В таких случаях следует применять следующие методы, при этом удобство для исследователя не должно быть главным соображением.

Следующие методы, допустимые для использования в этих обстоятельствах.

1. Погружение в растворы забуференного MS 222, бензокаина, сульфата хинальдина, изофлурана или севофлурана, этанола, сульфата хинальдина и 2-феноксизэтанола. Несмотря на общую озабоченность по поводу всех сред и ситуаций, при использовании любого из этих препаратов следует учитывать потенци-

альное воздействие остатков лекарств и правильно утилизировать останки животных.

2. Инъекцию пентобарбитала (от 60 до 100 мг/кг) можно вводить внутривенно или интрацеломически. Пентобарбитал также вводят внутрисердечно наркотизированным животным. Бывают случаи, когда используют двухэтапные инъекционные процедуры, включающие введение кетамина (внутримышечно) с последующим применением летальной дозы пентобарбитала; комбинацию кетамина и медетомидина (внутримышечно) и последующее введение летальной дозы пентобарбитала; использование пропофола, а затем смертельной дозы пентобарбитала. Несмотря на общую озабоченность по поводу всех сред и ситуаций, при использовании любого из этих препаратов следует учитывать потенциальное воздействие остатков лекарств и правильно утилизировать останки животных.

Методы, приемлемые с учетом условий, для использования в этом случае.

1. Погружение в воду, насыщенную CO_2 (при условии, что наблюдатели освещены и могут согласиться с тем, что некоторые рыбы, подвергшиеся воздействию этого метода, могут проявить гиперактивность и оказаться в дистрессе), или в раствор эвгенола, изоэвгенола или гвоздичного масла.
2. Травма головы тупым предметом, нанесенная рукой, с последующим проколом или обескровливанием.
3. Обезглавливание с последующим проколом. Обезглавливание само по себе не считается гуманной формой эвтаназии, особенно для видов, которые могут быть особенно устойчивы к низкому содержанию концентрации O_2 . Прокалывание помогает обеспечить быструю гибель этих видов.
4. Рассечение шейных позвонков с последующим проколом или обескровливанием. Обоснование этого подхода аналогично обезглавливанию и прокалыванию, за исключением того, что голова по-прежнему физически прикреплена мускулатурой к телу.
5. Болт-пистолет. Этот метод обычно применяется к крупным видам рыб.
6. Быстрое охлаждение (гипотермический шок) при температуре воды от 2 до 4 °C для мелкотелых (длиной 3,8 см или меньше) тропических и субтропических стенотермных видов (как описано ранее для рыбок данио). Использование этого метода нецелесообразно для рыбы среднего и крупного размера до тех пор, пока не будут получены соответствующие данные по этим видам.

На ранних стадиях жизни рыб, включая эмбрионы и личинки, могут потребоваться более высокие концентрации иммерсионных анестетиков или более длительная продолжительность воздействия. Например, погружение в буферный раствор MS 222 с концентрацией более 1 г/л не является надежным методом умерщвления некоторых рыб на ранних стадиях жизни. Для некоторых видов и в определенных ситуациях может потребоваться применение дополнительных методов, гарантирующих гибель этих животных после анестезии забуференным MS 222. Быстрое охлаждение с последующим погружением в разбавленный раствор гипохлорита натрия или гипохлорита кальция приемлемо в качестве двухэтапного метода для эмбрионов и личинок рыбок данио, а также при определенных условиях для эвтаназии эмбрионов и личинок других видов.

Водные беспозвоночные

Передозировка общего анестетика является подходящей стратегией эвтаназии как для водных беспозвоночных, так и для рыб. Кроме того, погружение является эффективным способом введения анестетиков и средств эвтаназии.

Поскольку подтвердить смерть многих беспозвоночных сложно, часто рекомендуются двухэтапные процедуры эвтаназии, при которых химическая индукция анестезии, потеря сознания или предполагаемая смерть сопровождаются дополнительным методом, который физически разрушает мозг или основные ганглии (например, прокалывание, замораживание, кипячение) или химически (например, спирт, формалин). Применение последних методов само по себе, как правило, не соответствует критериям, установленным для эвтаназии.

Первый этап, приемлемый для двухэтапных методов

Неингаляционные средства для погружения

Соли магния являются практически универсальным анестетиком и средством не только расслабляющим, но и применяемым для эвтаназии водных беспозвоночных, хотя они неэффективны для ракообразных. Исследования показывают, что ион магния действует централизованно, а также блокирует передачу как афферентных, так и эфферентных нервов, подавляя нервную активность головоногих моллюсков. Был рекомендован определенный диапазон концентраций для различных типов. Исходный раствор $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ в концентрации 7,5% (75 г/л, около 370 мм в деионизированной воде) почти изоосмотичен с морской водой и может добавляться (до 1 : 1) в воду в возрастающем соотношении объема исходного раствора к объему воды (3,75%, 37,5 г/л, около 185 мм) или выше для осуществления эвтаназии. Непосредственное добавление солей магния в морскую воду приводит к образованию гипертонического раствора. Соли магния можно комбинировать с этанолом для эвтаназии головоногих. Для головоногих рекомендуются погружение не менее чем на 15 мин, а также дополнительный метод, такой как децеребрация, по крайней мере через 5 мин после остановки дыхания или потери сознания. Рекомендуется погружение в воду не менее чем на 30 мин, если разрушение мозга невозможно. Восприимчивость видов к действию солей магния неодинакова.

Гвоздичное масло или *эвгенол* эффективно использовались в качестве иммерсионного средства для эвтаназии некоторых ракообразных (0,125 мл/л). Изоэвгенол является потенциальным канцерогеном, поэтому безопасность человека при применении этого средства вызывает беспокойство.

Спирт этиловый — этанол использовался для эвтаназии некоторых видов, действуя путем ингибирования нейронных натриевых и кальциевых каналов у моллюсков. Он ингибирует как афферентную, так и эфферентную нервную передачу у головоногих. Сообщалось, что первоначальная неприязнь и возбуждение наблюдались у некоторых, но не у всех головоногих моллюсков. Он используется в концентрации от 1% до 5% (от 10 до 50 мл/л) и до 10% в отличие от концентраций более 70%, используемых для консервации, и может быть менее эффективным при более низких температурах. Рекомендуется медленно добавлять этанол при перемешива-

нии. Этанол можно комбинировать с раствором соли магния для эвтаназии головоногих моллюсков. Рекомендуется погружение не менее чем на 10 мин с последующим дополнительным методом, таким как децеребрация. Восприимчивость видов к воздействию этанола неодинакова.

Второй этап, приемлемый для двухэтапных методов

Неингаляционные средства для погружения

Неингаляционные средства, которые можно вводить путем погружения в качестве второго этапа двухэтапного подхода к эвтаназии, включают 70% спирт и 10% формалин с нейтральным буфером. Однако эти средства неприемлемы для иммерсии в качестве одноэтапной процедуры или первого шага двухэтапной процедуры.

Физические методы

Прокалывание, замораживание и кипячение приемлемы в качестве второго шага (дополнительные методы) двухэтапной процедуры эвтаназии. Подача требует детального знания анатомии рассматриваемого вида. Однако эти методы неприемлемы ни в качестве одноэтапной процедуры, ни первого шага двухэтапной процедуры.

Эвтаназия на разных жизненных этапах

Эффективность методов эвтаназии, описанных в руководстве, может различаться в зависимости от стадии жизни и вида. Методы, используемые для разных стадий жизни одного и того же вида, могут потребовать модификации для обеспечения максимальной эффективности.

Рекомендации относительно использования дополнительных методов (как описано ранее) также могут быть необходимы для гарантии смертельного исхода.

Неприемлемые методы

Методы эвтаназии, не вызывающие быстрой смерти или причиняющие травму до потери сознания, не считаются гуманными. Они могут включать удаление рыбы или водных беспозвоночных из воды и предоставление им возможности умереть от гипоксии, вторичной по отношению к высыханию жаберной ткани; оставление рыбы или водных беспозвоночных в емкости с водой без достаточной аэрации, вызывающее смерть от аноксии; или любая смерть из-за воздействия едких химикатов или травматического повреждения, не вызывающего предварительной потери сознания у рыбы или водного беспозвоночного.

Средства и методы эвтаназии по видам

Вид	Приемлемый метод	Приемлемый метод с учетом условий (дополнительные методы приведены в тексте)
Водные беспозвоночные	Погружение в раствор анестетика (соли магния, гвоздичное масло, эвгенол, этанол)	Дополнительные методы (второй этап) включают 70% спирт и 10% формалин с нейтральным буфером, прокол, замораживание, кипячение
Земноводные	В зависимости от вида — инъекция барбитуратов, диссоциативные средства и анестетики, как указано, местно или вводимый буферизованный MS 222, или местный бензокаина гидрохлорид	В зависимости от вида — ингаляционные анестетики, как указано, CO ₂ , ПБП или огнестрельное оружие, травма головы тупым предметом, нанесенная рукой, быстрое замораживание мелких (менее 4 г) особей, при котором наступает мгновенная смерть
Птицы (см. также домашняя птица)	Внутривенно вводимые барбитураты	Ингаляционные анестетики, CO ₂ , CO, N ₂ , Ar, цервикальная дислокация (мелкие птицы), обезглавливание (мелкие птицы). Огнестрельное оружие (свободно летающие птицы)
Кошки	Внутривенно вводимые барбитураты, передозировка инъекционных анестетиков, трибутам, Т-61	Барбитураты (альтернативные пути введения), передозировка ингаляционных анестетиков, CO*, CO ₂ *, огнестрельное оружие*
Крупный рогатый скот	Внутривенно вводимые барбитураты	Огнестрельное оружие, ПБП
Собаки	Внутривенно вводимые барбитураты, передозировка инъекционных анестетиков, трибутам, Т-61	Барбитураты (альтернативные пути введения), передозировка ингаляционных анестетиков, CO*, CO ₂ *, огнестрельное оружие*, ПБП*
Рыбы	Погружение в забуференный бензокаин или бензокаина гидрохлорид, изофлуран, севофлуран, хинальдинсульфат, забуференный MS 222, 2-феноксиэтанол, пентобарбитал для инъекций, быстрое охлаждение (для соответствующих видов), этанол	Эвгенол, изоэвгенол, гвоздичное масло, вода, насыщенная CO ₂ , обезглавливание/цервикальная дислокация/травма тупым предметом, нанесенная рукой, с последующим проколом, мацерация (в условиях исследования), разделка на части (крупная рыба)
Лошади	Внутривенно вводимые барбитураты	ПБП, огнестрельное оружие

Окончание таблицы 1

Вид	Приемлемый метод	Приемлемый метод с учетом условий (дополнительные методы приведены в тексте)
Морские млекопитающие	В неволе: инъекции барбитуратов. На свободе: инъекции барбитуратов или передозировка анестетиков	В неволе: ингаляционные анестетики (в свободном доступе). На свободе: огнестрельное оружие, травма тупым предметом, нанесенная рукой, имплозивная децеребрация
Нечеловекообразные приматы	Инъекции барбитуратов или передозировка анестетиков	В зависимости от вида: ингаляционный анестетик, CO, CO ₂
Домашняя птица	То же	CO ₂ , CO, N ₂ , Ar, оглушение при низком атмосферном давлении, цервикальная дислокация (в зависимости от анатомических особенностей), обезглавливание, ручная травма тупым предметом, поражение электрическим током, огнестрельное оружие, ПБП
Кролики	Внутривенно вводимые барбитураты	Передозировка ингаляционного анестетика, CO ₂ , цервикальная дислокация (в зависимости от анатомических особенностей), ПБН, НПБН
Рептилии	При необходимости с помощью специальных инъекций барбитуратов/MS222, диссоциативные средства с дополнительным методом и анестетики, как описано	В зависимости от вида — ингаляционные анестетики, как описано, CO ₂ , ПБП или огнестрельное оружие, травма тупым предметом, нанесенная рукой, быстрое замораживание животных массой менее 4 г, при котором наступает мгновенная смерть, разрыв спинного мозга/разрушение головного мозга (крокодилы)
Грызуны	Вводимые барбитураты и комбинации барбитуратов, комбинации диссоциативных средств	Ингаляционные анестетики, CO ₂ , CO, трибромэтанол, этанол, цервикальная дислокация, обезглавливание, микроволновое облучение сфокусированным пучком
Мелкие жвачные животные	Внутривенно вводимые барбитураты	CO ₂ (козлята), огнестрельное оружие, ПБП, НПБП (козлята)
Свиньи	То же	CO ₂ , CO, NO, N ₂ , Ar, огнестрельное оружие, поражение электрическим током, ПБП, НПБП (поросята), травма тупым предметом, нанесенная рукой

Примечание: * — не рекомендуется для повседневного использования.

Приложение 2

Таблица 2

Некоторые средства и методы, которые неприемлемы в качестве основных методов эвтаназии

Средство или метод	Комментарии
Воздушная эмболия	Может сопровождаться судорогами, опистотонусом и вокализацией. Если используется, то это следует делать только у животных, находящихся под наркозом
Удушье	Физическое воспрепятствование дыханию (удушение, дегидратация) недопустимо
Сожжение	Химическое или термическое сжигание животного не является приемлемым методом эвтаназии
Хлоралгидрат	Применение недопустимо для собак, кошек и мелких млекопитающих
Хлороформ	Является известным гепатотоксином и предполагаемым канцерогеном и, следовательно, чрезвычайно опасен для персонала
Цианид	Представляет чрезвычайную опасность для персонала, а способ смерти неприемлем с эстетической точки зрения
Декомпрессия (исключая оглушение при низком атмосферном давлении, когда можно убедиться, что это приводит к смерти)	Применение неприемлемо для эвтаназии из-за многочисленных недостатков. 1. Многие камеры сконструированы таким образом, чтобы производить декомпрессию со скоростью, в 15–60 раз превышающей рекомендуемую оптимальную для животных. Расширяющиеся газы, попавшие в полости тела, вызывают у животных боль и дистресс. 2. Незрелые животные толерантны к гипоксии, и для прекращения дыхания требуются более длительные периоды декомпрессии. 3. Может произойти случайная повторная компрессия с восстановлением пострадавших животных. 4. У животных, находящихся в бессознательном состоянии, могут развиваться кровотечения, рвота, судороги, мочеиспускание и дефекация, которые эмоционально неприятны
Утопление	Не является средством эвтаназии, это бесчеловечный способ
Обескровливание	Из-за беспокойства, связанного с крайней гиповолемией, обескровливание как единственный метод умерщвления следует применять только к животным, находящимся в бессознательном состоянии
Формальдегид	Прямое погружение животного в формалин в качестве средства эвтаназии бесчеловечно, за исключением губок (Porifera)

Средство или метод	Комментарии
Бытовые химикаты и растворители	Ацетон, чистящие средства, четвертичные соединения (включая CCl ₄), слабительные, пестициды, диметилкетон, продукты четвертичного аммония, антациды и другие токсиканты, специально не предназначенные для терапевтического применения или эвтанази, недопустимы
Гипотермия	Не является подходящим методом эвтанази
Инсулин	Вызывает гипогликемию, которая может привести к значительному расстройству (изменению поведения, раздражительности, дезориентации) до начала гипогликемических припадков, которые могут привести или не привести к смерти
Сульфат магния и хлорид калия	Применение неприемлемо для использования в качестве средства для эвтанази у позвоночных животных, находящихся в сознании
Нанесенная рукой травма головы тупым предметом	Как правило, неприемлемо для большинства видов, за исключением поросят и мелких лабораторных животных. Необходимо заменить, насколько это возможно, травму головы, нанесенную тупым предметом рукой, альтернативными методами
Нервно-мышечные блокаторы (никотин, сульфат магния, хлорид калия и все курареподобные средства)	При применении по отдельности все эти препараты вызывают остановку дыхания перед потерей сознания, поэтому животное может испытывать боль и дистресс после того, как оно будет обездвижено
Быстрое замораживание	Как единственное средство эвтанази не считается гуманным, за исключением мелких (менее 4 г) рептилий, амфибий и новорожденных грызунов в возрасте менее 5 дней, у которых наступает немедленная смерть. Во всех остальных случаях перед замораживанием животных следует умертвить или привести в бессознательное состояние (быстрое охлаждение рыбы не считается быстрым замораживанием)
Стрихнин	Вызывает сильные судороги и болезненные сокращения мышц
Сдавливание грудной клетки	Неприемлемо для использования на животном, находящемся в сознании

Ассоциация специалистов по лабораторным животным

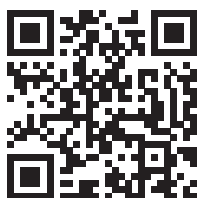


Rus-LASA

Российская общественная организация,
объединяющая всех, чья работа так
или иначе связана с использованием
животных в научных целях.

Мы проводим конференции,
организуем тренинги,
издаем тематическую литературу.

Присоединяйтесь!



www.ruslasa.ru



ГК «ФармЭко» более 20 лет работает во всех основных сегментах фармацевтической отрасли: научной разработке и исследованиях, производстве и дистрибуции лекарственных препаратов, медицинской техники и изделий медицинского назначения. Входит в топ-500 крупнейших компаний России.*

ГК «ФАРМЭКО» СЕГОДНЯ:



ИССЛЕДОВАНИЯ И РАЗРАБОТКИ (R&D)



Центр разработки и регистрации лекарственных средств



ФармЮнити



ZYNGENIA



ПРОИЗВОДСТВО ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ



ЗИО-ЗДОРОВЬЕ



ДОБРОЛЕК



БИОДЖЕТ



ДИСТРИБУЦИЯ И ЛОГИСТИКА



ИРВИН



ИРВИН 2



ФармСервис Логистик

www.pharmeco.ru

+7 (495) 800 77 87



Бизнес-центр «Ньютон Плаза»
Россия, 115230, г. Москва,
1-й Нагатинский пр-д, д. 10, стр. 1

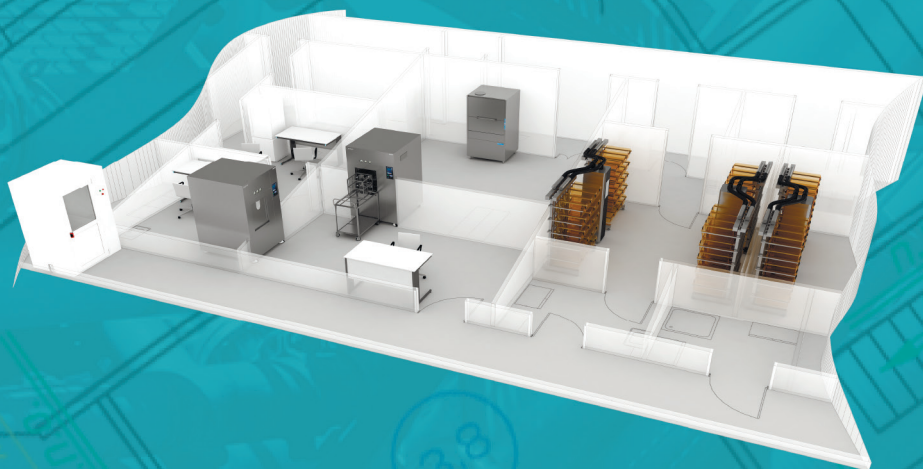
* рейтинг РБК, 2020



Группа Компаний АВТех

Мы проектируем, строим, модернизируем и оснащаем виварии, лаборатории и другие объекты в соответствии с российскими и международными нормативными документами.

Виварий под ключ - от разработки концепции до оснащения оборудованием и обучения персонала



Лабораторное оборудование собственного производства

- Системы индивидуально вентилируемых клеток
- Оборудование для эвтанази лабораторных животных
- Ламинарные станции для работы с животными
- Клетки для лабораторных животных
- Ламинарные укрытия
- Элементы чистых помещений
- Фильтровентиляционные модули
- Модульные конструкции (лаборатория трансформер)
- Индивидуальное проектирование и производство оборудования под задачи заказчика



**Скачать
каталог**



Группа компаний АWTech

127566 Россия, Москва,
Алтуфьевское шоссе, д. 48, корп. 1
+7 (499) 322-99-34 | +7 (999) 078-72-69
info@awt.ru | www.awt.ru

СДЕЛАНО В РОССИИ

Все лучшее для науки!

О нас

Компания «FarmBioLine» стабильно развивается на рынке создания и оснащения клиник и центров для работы с лабораторными животными более 15 лет

Наша цель

— превзойти ожидания заказчика, постоянно контролируя, повышая и совершенствуя компетенцию и качество выполняемых работ.

Наши решения

- разработка задания на проектирование и проектирование вивариев для работы с ПБА, СПФ и конвенциональными животными;
- питомники;
- помещения для временного содержания тест-систем;
- графическая визуализация проектов.

Наши партнеры



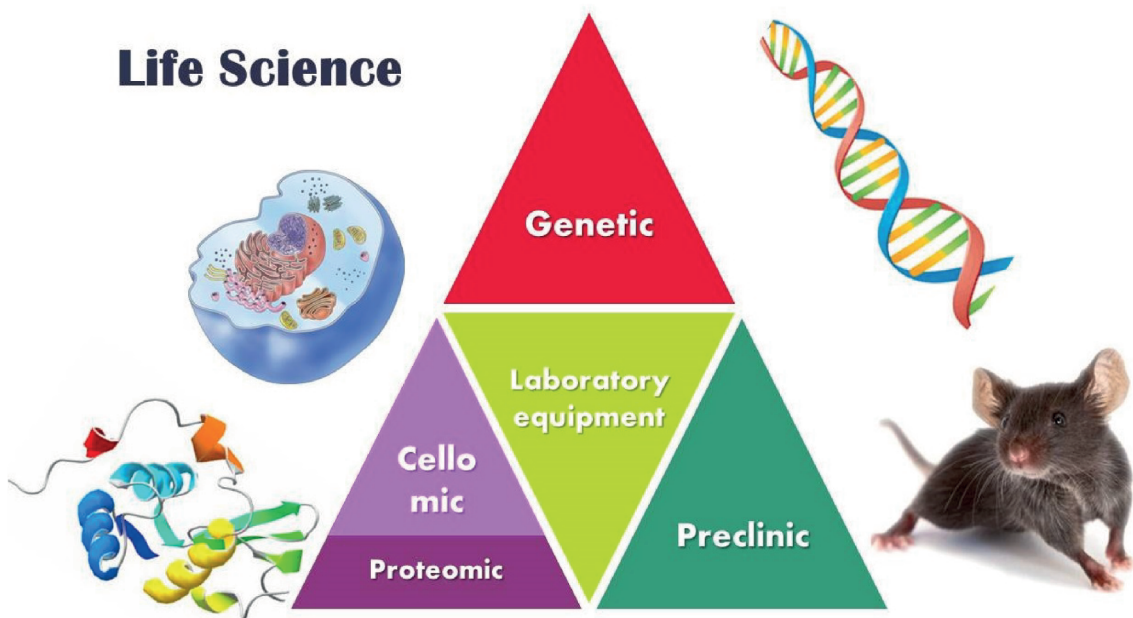
+ 7 (812) 500-71-72

г. Санкт-Петербург,
пр. Большой Сампсониевский, д. 82

farmbioline.ru

Российская компания **БИОГЕН-АНАЛИТИКА** основана в 2004 году. Мы эффективно используем накопленные профессиональные знания и умения для обеспечения наших заказчиков инновационным оборудованием и услугами в сферах образования, науки и медицины, а также в других областях, непосредственно связанных со здоровьем и благополучием нашей страны.

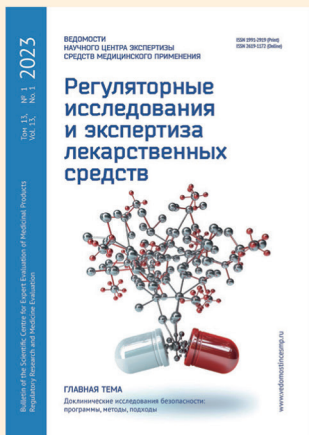
Life Science



Наши контакты:

ООО «БИОГЕН-АНАЛИТИКА»
127422, Москва, ул. Тимирязевская, д. 1, стр. 2
Тел./факс: +7 499 704 62 44
e-mail: 84997046244@bga.su
www.bga.su





Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств

Освещаются вопросы стандартизации и оценки качества лекарственных препаратов различных групп, разработки и совершенствования методик фармацевтического анализа, методологии экспертизы лекарственных средств, в том числе по установлению их взаимозаменяемости.

Обсуждаются новые высокотехнологичные методы доклинических и клинических исследований лекарственных средств.

Рассматриваются актуальные проблемы фармакологии, клинической медицины, вопросы рационального применения лекарственных препаратов на основе принципов персонализированной терапии, вопросы организации фармацевтического дела.

Главный редактор

Косенко В.В., канд. фарм. наук

E-mail: vedomosti@expmed.ru

Сайт: www.vedomostincesmp.ru

Включен в перечень ВАК (категория K1) и RSCI.
Научные специальности:

- Промышленная фармация и технология получения лекарств
- Фармацевтическая химия, фармакогнозия
- Организация фармацевтического дела
- Фармакология, клиническая фармакология

Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение

Публикуются статьи, посвященные вопросам разработки регуляторных процедур, стандартизации, контроля качества, производства и применения терапевтических, профилактических и диагностических биологических лекарственных препаратов – иммунобиологических, биотехнологических, генотерапевтических и лекарственных препаратов, полученных из плазмы крови человека и животных, а также различных групп иммуномодулирующих лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов.

Главный редактор

Меркулов В.А., доктор мед. наук, проф.

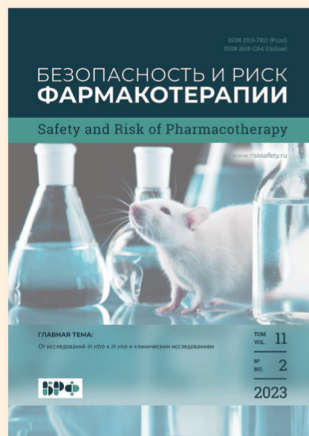
E-mail: biopreparaty@expmed.ru

Сайт: www.biopreparations.ru

Включен в перечень ВАК (категория K2) и RSCI.

Научные специальности:

- Биотехнология
- Молекулярная биология
- Вирусология
- Микробиология
- Аллергология и иммунология



Безопасность и риск фармакотерапии

Освещаются научные достижения и практический опыт в области обеспечения безопасности лекарственных средств и снижения рисков фармакотерапии.

Публикуются статьи, посвященные разработке, экспертизе, оценке качества, регистрации, стандартизации и применению в клинической практике различных групп лекарственных препаратов. Журнал предназначен для специалистов практического здравоохранения, в том числе клинических фармакологов, врачей других специальностей, провизоров, специалистов экспертных учреждений, уполномоченных по фармаконадзору фармацевтических организаций, сотрудников центров доклинических и клинических исследований, регуляторных и контрольно-надзорных органов в сфере обращения лекарственных средств.

Главный редактор

Аляутдин Р.Н., доктор мед. наук, проф.

E-mail: birf@expmed.ru

Сайт: www.risksafety.ru

Включен в перечень ВАК (категория K1).

Научные специальности:

- Фармакология, клиническая фармакология
- Внутренние болезни
- Неврология
- Геронтология и гериатрия



Трансляционная Медицина

Рецензируемый научно-практический журнал, освещающий новейшие достижения в различных областях медицины, перед которым стоит очень актуальная цель — обеспечить взаимосвязь между достижениями фундаментальных наук и конкретными проблемами, возникающими в клинической практике.

Журнал выходит **6 РАЗ В ГОД** в электронном и печатном виде.

Подпишитесь



БЕСПЛАТНО

Сайт журнала: <https://transmed.almazovcentre.ru/jour>



Трансляционная Медицина

Журнал «Трансляционная медицина»
входит в перечень ВАК и индексируется в РИНЦ и RSCI.

Журнал одинаково заинтересован как в обзорных статьях, которые помогут обеспечить взаимодействие между специалистами из сферы биологии, физики, химии и практикующими клиницистами, так и в практических рекомендациях по внедрению результатов трансляционных исследований в рутинную врачебную практику.

**БУДЕМ РАДЫ ВИДЕТЬ ВАС
В ЧИСЛЕ НАШИХ АВТОРОВ!!!**

Сайт журнала: <https://transmed.almazovcentre.ru/jour>

E-mail: pdocshin@icloud.com



ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

для научных исследований

Миссией журнала «Лабораторные животные для научных исследований» является популяризация гуманного обращения с лабораторными животными, расширение знаний в области зоотехнии разных видов и референсных интервалов различных показателей. Освещаются вопросы, связанные с разработкой и стандартизацией новых экспериментальных моделей, а также с использованием альтернативных видов животных. Журнал является открытой площадкой для свободной дискуссии, обмена опытом и идеями ученых.

ПОДПИШИТЕСЬ
БЕСПЛАТНО



ЖУРНАЛ
ВЫХОДИТ

4 раза
в год

В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

ВАК (К2), РИНЦ

САЙТ ЖУРНАЛА www.labanimalsjournal.ru

E-MAIL

info@labanimalsjournal.ru

(для общих вопросов)

submit@labanimalsjournal.ru (для подачи рукописей)

Консультант GLP-PLANET 2023

Мнение фармацевтической отрасли

Монография

Ответственный редактор: Л.В. Кузнецова

Корректор: В.М. Замаева

Дизайн обложки: А.Г. Асеева

Компьютерная верстка: А.В. Замараев

Координаторы проекта: М.А. Ковалева и А.И. Мискарян

НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»

<https://doclinika.ru>

E-mail: info@doclinika.ru

ISBN 978-5-6048955-2-8



9 785604 895528