GLP-PLANET

Консультант GLP-PLANET

2024

мнение
фармацевтической отрасли

https://glp-planet.com

Консультант GLP-PLANET

2024

Мнение фармацевтической отрасли

Монография

Санкт-Петербург, 2024

УДК 619:616-07
ББК 48.6
DOI 10.57034/978-5-6048955-9-7

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» Минпромторга России

Рецензенты:

Балабаньян В.Ю., доцент, вед. науч. сотрудник НИИ Трансляционной медицины РНИМУ имени Н.И. Пирогова, д-р фарм. наук

Бурлакина Н.В., заместитель начальника Управления инспектирования производства лекарственных средств, ФБУ «ГИЛС и НП»

Голованова Н.Э., доцент Медицинского института ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», канд. биол. наук

Дадали В.А., профессор СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, доктор философии по натуральной медицине и сертифицированный консультант по нутрициологии Университета натуральной медицины (Калифорния, США), член Международной ассоцющии микронутриентологии (США), научный консультант Компании ВИТАМАКС, д-р хим. наук

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

Онохин К.В., директор по науке, ООО «Экселлена»

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

Стукова М.А., заведующая лаборатории векторных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, канд. мед. наук

Устюгов А.А., директор обособленного подразделения Институт физиологически активных веществ ФГБУН ФИЦ ПХФ и МХ РАН, д-р биол. наук

Консультант GLP-PLANET 2024. Мнение фармацевтической отрасли : монография / Под ред. В.Г. Макарова и В.Н. Шестакова. — Санкт-Петербург: НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», 2024. — 344 стр. с илл.
ISBN 978-5-6048955-9-7

В монографии «Консультант GLP-PLANET. Мнение фармацевтической отрасли» приводятся мнения ведущих экспертов фармацевтической отрасли — специалистов в области доклинических исследований, представителей фармацевтических компаний, регуляторных и контрольно-надзорных органов.

ISBN 978-5-6048955-9-7
© Коллектив авторов, 2024

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» Минпромторга России

ОГЛАВЛЕНИЕ

Практические подходы к реализации непрерывности деятельности испытательных центров в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики (GLP) 9

Фармацевтическая разработка и особенности ее аналитического сопровождения. 25

ARRIVE в жизненном цикле лекарственного средства 49

Особенности доклинических исследований высокотехнологичных лекарственных препаратов 69

Методология в доклинических исследованиях 97

Лабораторные животные вне эксперимента 110

Соотношение возраста человека и лабораторных животных — критерии и методы оценки 127

Использование альтернативных тест-систем в доклинической практике. 299

Доклинические исследования *in vitro*. 320

Тезисы конференции GLP-PLANET V

Исследования *in vitro* и *in vivo*: общие мишени 330

Исследование фармакологического действия соединений ряда производных 4-R-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот . . 322

От организационного комитета

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

«Консультант GLP-PLANET» — это постоянно обновляемый источник знаний и экспертной информации, который позволяет осмыслять и интерпретировать научные данные относительно благополучия лабораторных животных, фармацевтической разработки, доклинических исследований и аспектов регистрации лекарственных средств. Это монография нацелена на будущее российской науки и будет полезна тем, кто хочет быть активным участником процесса разработки лекарственных средств.

Структура монографии сформировалась в рамках проведенной конференции GLP-PLANET V в процессе обсуждения современных вызовов создания эффективных и безопасных препаратов, решаемых путем повышения качества отдельных этапов жизненного цикла лекарственного средства, гармонизации требований проведения различных исследований, оптимизации процесса коммуникации между спонсором исследования и испытательным центром, достижением научного консенсуса с регулирующими и отраслевыми экспертами.

Монография включает 9 глав, охватывающих наиболее важные вопросы доклинических исследований. В основу каждой главы положен в первую очередь опыт практических знаний авторов и мнения экспертов. Рассмотрены подходы к фармацевтической разработке лекарственных средств и ее аналитического сопровождения. Охарактеризованы возможности применения альтернативных тест-систем (не млекопитающие) для проведения доклинических исследований, и приведен перечень OECD протоколов, регламентирующих эксперименты с участием этих видов. Обсуждаются особенности доклинических исследований высокотехнологических лекарственных средств, методологические подходы в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Разбираются примеры внедрения рекомендаций ARRIVE в планирование и проведение доклинических исследований. Затронуты вопросы значимости доклинических исследований для проведения клинических исследований и производства лекарственных средств. Рассмотрены практические аспекты GLP (Good Laboratory

Practice, надлежащая лабораторная практика), в том числе с позиции обеспечения непрерывности деятельности.

В главе, посвященной соотношению возраста человека и лабораторных животных, представлен анализ и систематизация большого количества литературных данных о критериях и методах оценки такого соотношения. В приложении к главе авторы приводят собственные расчеты. Понимание того, что каждый возрастной период жизни человека характеризуется определенными особенностями функционального состояния органов и систем организма, позволяет обоснованно выбрать животных сопоставимого возраста для проведения доклинических исследований. Это особенно важно при разработке лекарственных препаратов для педиатрической практики, поскольку реакция развивающегося организма на терапию может значительно отличаться от реакции взрослого.

Монография рассчитана на широкий круг специалистов, работающих в фармацевтической сфере.

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

Практические подходы к реализации непрерывности деятельности испытательных центров в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики (GLP)

https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-9-7-s1

С. В. Ходько[1], Е. Е. Бекетов[2], А. А. Бурдинская[3], К. В. Гарбуз[3], И. С. Гиба[4], П. В. Гремякова[5], Д. Ю. Ивкин[6], С. Н. Игнатенко[7], К.Ю. Кильдибеков[1], Н. А. Кищенко[1], Д. В. Компанцев[8], Ю. А. Пелогейкина[2], О. И. Платонова[9], М. О. Попова[10], Т. И. Ситько[11], М. Ц. Сультимова[12], Е. В. Флисюк[6], В. В. Чупова[13], Е. И. Шевченко[14]

[1] *АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,*
[2] *ООО «Мабскейл»,*
[3] *АО «БИОКАД»,*
[4] *АНОО ВО «Университет «Сириус»,*
[5] *ООО «Поверие»,*
[6] *ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России,*
[7] *Friday's Games,*
[8] *Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России,*
[9] *Межрегиональное управление № 122 ФМБА России,*
[10] *ООО «Центр фармацевтической аналитики»,*
[11] *Министерство здравоохранения Республики Беларусь,*
[12] *ООО «ГЕРОФАРМ»,*
[13] *Санкт-Петербургское государственное автономное учреждение «Центр занятости населения Санкт-Петербурга»,*
[14] *АО «ВЕРТЕКС»*

В ходе конференции GLP-PLANET V состоялась сессия «Практические аспекты GLP», посвященная обеспечению непрерывности деятельности испытательных центров.

Открывал сессию доклад руководителя службы качества АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» Светланы Владимировны Ходько «Менеджмент непрерывности деятельности», который был посвящен общим моментам менеджмента непрерывности деятельности и практической реализации в соответствии с основными правилами надлежащей лабораторной практики.

Менеджмент непрерывности деятельности регламентируется стандартом ISO 22301:2019[1], IDT и идентичным стандартом ГОСТ Р ИСО 22301–2021[2].

ISO 22301 — международный стандарт систем управления непрерывностью бизнеса предоставляет организациям основу для планирования, создания, внедрения, эксплуатации, мониторинга, анализа, обслуживания и постоянного совершенствования документированной системы управления для защиты от разрушительных инцидентов, снижения их вероятности и обеспечения восстановления после них.

Почему важен ISO 22301? Этот стандарт имеет решающее значение для организаций в повышении их устойчивости к различным непредвиденным сбоям, обеспечивая непрерывность операций и услуг. Он помогает выявлять риски, быть готовыми к чрезвычайным ситуациям и сокращать время восстановления, что особенно важно для испытательных центров в отношении выполнения исследований с использованием лабораторных животных в целом и для длительных исследований в частности.

Преимущества ISO 22301:

- повышает устойчивость организации;
- улучшает процессы управления рисками;
- обеспечивает систематическое реагирование на кризисы;
- повышает доверие между заинтересованными сторонами (испытательным центром и спонсором/заказчиком исследования).

Как и любая другая система управления, включает в себя следующие компоненты:

1) политику;
2) компетентный персонал с установленными обязанностями;
3) документированную информацию, поддерживающую оперативное управление и позволяющую выполнять оценку результатов;
4) процессы управления, которые связаны:
    - с политикой;
    - планированием;
    - разработкой и функционированием;
    - оценкой результатов работы;

[1] ISO 22301:2019 Security and resilience — Business continuity management systems — Requirements.

[2] ГОСТ Р ИСО 22301–2021. «Национальный стандарт Российской Федерации. Надежность в технике. Системы менеджмента непрерывности деятельности. Требования» (утв. и введен в действие Приказом Росстандарта от 05.10.2021 N 1059-ст).

- анализом со стороны руководства;
- постоянным улучшением.

Соответственно, эффективный подход к реализации стандарта будет требовать от организации затрат определенных ресурсов: временных, человеческих, финансовых. Таким образом, внедрение стандарта ISO 22301 или отдельных его элементов целесообразно для тех испытательных центров, которые уже имеют эффективную систему менеджмента качества в соответствии со стандартом ISO 9001:2015[3].

При этом, вне зависимости от наличия или отсутствия эффективной системы менеджмента качества, в испытательном центре может быть реализован некий альтернативный подход к организации непрерывности деятельности, построенный на основных принципах и правилах надлежащей лабораторной практики.

В соответствии с основным регламентирующим стандартом, действующим на сегодняшний день в рамках Евразийского экономического союза, решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств»[4] и его раздела III «Основные положения», к рассмотрению предлагаются следующие принципы, наличие и непрерывное функционирование которых необходимо обеспечить в любом испытательном центре:

1) система обеспечения качества;
2) персонал испытательной лаборатории;
3) помещения для исследований;
4) оборудование, материалы и реактивы;
5) тест-системы;
6) испытуемые вещества (лекарственные средства) и образцы сравнения (контрольные образцы);
7) стандартные операционные процедуры.

Система обеспечения качества

Данному вопросу на сегодняшний день уже посвящено множество обучающих программ, реализующихся в различных учебных центрах, а большинство этих принципов и практических рекомендаций были описаны в предыдущих выпусках Консультанта GLP-PLANET. Однако данная тема всегда имеет нюансы. Об одном из них рассказал Иван Сергеевич Гиба, кандидат физико-математических наук, доцент, руководитель отдела обеспечения качества лабораторного комплекса, Университет «Сириус». Доклад Ивана Сергеевича «Метрики эффективности системы качества лаборатории» был посвящен организации системы качества биоаналитической лаборатории, а также вопросу различий и преимуществ работы в частных испытательных центрах и в испытательных центрах, которые работают на базе вузов.

[3] ГОСТ Р ИСО 9001–2015 «Национальный стандарт Российской Федерации. Системы менеджмента качества. Требования».

[4] Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. N 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

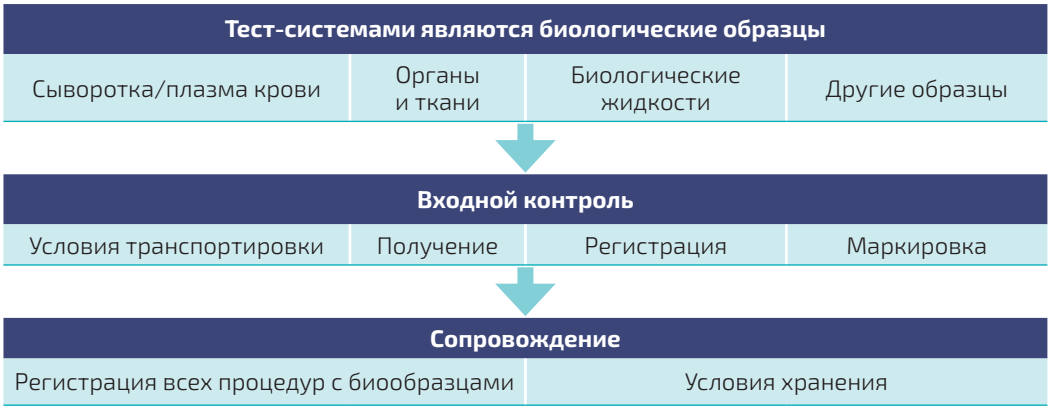


Рис. 1. Составные части системы менеджмента качества в биоаналитической лаборатории

Рис. 2. Схема работы с возражениями

Юлия Александровна Пелогейкина, заместитель директора Центра разработки по качеству ООО «Мабскейл» в своем выступлении «Организация системы GLP в биоаналитической лаборатории» также рассказала об особенностях организации системы менеджмента качества в испытательном центре, где тест-системой являются не лабораторные животные, а биологические образцы. Юлия Александровна очень наглядно показала, что принципы эффективной системы менеджмента качества для всех организаций, в том числе научных, являются общими (рис. 1).

Например, вне зависимости от того, что является тест-системой в испытательном центре, должны быть четкий входной контроль и обязательное документальное сопровождение всех процедур с данной тест-системой.

О такой особенности работы как возражения со стороны сотрудников при внедрении каких-либо изменений системы менеджмента качества рассказала в своем докладе «"Понять и простить" или как работать с возражениями при внедрении изменений» научный консультант Исследовательского центра ООО «ЦФА» Мария Олеговна Попова и привела ТОП-10 возражений и их решений.

В общем виде работа с возражениями, по мнению Марии Олеговны, может выглядеть следующим образом (рис. 2).

Персонал испытательного центра

В любом коллективе существует система взаимоотношений, которая, несомненно, влияет на деятельность испытательного центра.

Рассмотрим наиболее часто встречающиеся сложности, которые могут оказать влияние на непрерывность деятельности.

Трудовой конфликт

Трудовой конфликт является одной из разновидностей социального конфликта. Различают трудовые конфликты без остановки работы и с остановкой работы (забастовки и локауты).

Объективными причинами трудовых конфликтов могут стать:

- ограниченность ресурсов;
- различия в целях (нерациональная организация труда);
- ненормальные условия труда — высокая плотность рабочих мест, «скученность» работников в помещении, вынужденная высокая интенсивность контактов;
- разделение вины, ответственности — конфликт возникает при определении конкретного виновника (персонификации вины);
- недостаточная проработанность стандартных операционных процедур (СОП), инструкции и прочих внутренних документов, регламентирующих трудовые процессы сотрудников в испытательном центре.

Разрешение трудового конфликта — это процесс или целенаправленная деятельность руководства испытательного центра, устраняющие его причины и последствия. Разрешение трудового конфликта может быть организованным или произвольным. Для решения трудового конфликта следует оценить следующие факторы:

- масштаб конфликта (определяется общим количеством участвующих в конфликте, затронутых конфликтом сотрудников; количеством сторон, позиций в конфликте);
- длительность конфликтной ситуации;
- новизна или стандартность конфликта;
- объективные или субъективные причины конфликта.

С целью «профилактики» трудовых конфликтов руководством испытательного центра могут предприниматься следующие меры:

- тимбилдинг;
- анкетирование;
- специальная оценка условий труда и рисков, связанных с профессиональной деятельностью, в сроки, утвержденные законодательством РФ.

Организованный уход сотрудников или их потеря в результате, например, несчастного случая, текучесть кадров

Для предотвращения ухода сотрудников, в том числе в конкурирующую с испытательным центром организацию, могут быть предусмотрены:

- возможность карьерного роста;
- обучение;

- для научного звена возможность профессиональной реализации: посещение выставок и конференций, публикация научных трудов (статей, книг, диссертационных работ);
- повышение заработной платы и увеличение социальных гарантий.

С целью исключения потери сотрудника от несчастных случаев должны быть обеспечены:

- выполнение требований по охране труда, технике безопасности и противопожарной безопасности;
- использование оборудования надлежащего качества для проведения рабочих процессов;
- систематическое проведение внутреннего обучения и инструктажей.

Ненадлежащее исполнение трудовых обязанностей

Для каждой должности в испытательном центре должна быть разработана должностная инструкция, в которой подробно описаны должностные обязанности, область ответственности и компетенции сотрудника в соответствии с занимаемой должностью. При приеме на работу сотрудник обязан ознакомиться с инструкцией и поставить личную подпись. Данным действием сотрудник возлагает на себя персональную ответственность за вмененные ему должностные обязанности. Нарушение должностных обязанностей может повлечь за собой ущерб здоровью сотрудников, порчу материальных ценностей, потерю деловой репутации организации (например, приостановка исследований или потеря данных исследования) и прочие нештатные ситуации (НС).

При выявлении ненадлежащего исполнения трудовых обязанностей сотрудник, обнаруживший данное нарушение, информирует руководителя структурного подразделения, который обязан оценить степень воздействия нарушения на текущие процессы и сообщить руководству испытательного центра о возможных негативных последствиях (наступление НС) и путях преодоления. В случае выявления ненадлежащего исполнения трудовых обязанностей руководство испытательного центра вправе избрать меру воздействия на сотрудника вплоть до увольнения в соответствии со статьями Трудового кодекса РФ. Также руководство испытательного центра вправе требовать проведения для сотрудника, ненадлежащим образом выполняющего трудовые обязанности, обучения, переаттестации (теоретические и практические навыки), назначения испытательного срока. Руководитель структурного подразделения вправе обратиться с требованием уволить сотрудника, не выполняющего или выполняющего ненадлежащим образом свои трудовые обязанности.

Недостаточное количество сотрудников для выполнения производственных процессов

Должностные инструкции должны быть разработаны с учетом реальных требований к определенным должностям. При приеме на работу с соискателем проводится собеседование. Если результаты собеседования положительны, при наличии всех документов, предусмотренных Трудовым кодексом РФ, соискатель принимается на работу.

В случае невозможности подбора сотрудника по объективным причинам (недостаточная компетенция, неполный пакет документов) должностные задачи распределяются на действующих сотрудников на основании компетенции и текущей загруженности.

Для решения планового замещения сотрудников (декретный отпуск, отпуск по уходу за ребенком, отпуск, больничный) все должности в организации должны быть дублированы, а в должностные инструкции внесены соответствующие записи.

Человеческий фактор

Человеческий фактор играет одну из ведущих ролей в деятельности испытательного центра, поскольку из всех рабочих процессов люди в наименьшей степени поддаются управлению. Одной из основных проблем организационного поведения является проблема исполнения.

В общем смысле исполнение может быть описано следующей формулой:

Исполнение = индивидуальные свойства сотрудника × усилия × × организационная поддержка.

Индивидуальные свойства сотрудника определяют способность работника выполнить полученные задания. Усилия связаны с желанием выполнять задания, а организационная поддержка обеспечивает возможность их исполнения.

Для реализации эффективной системы управления индивидуальным поведением сотрудников при формировании рабочих структурных подразделений и приеме на работу обращают внимание на следующие факторы:

- личностные характеристики;
- индивидуальные формы отражения реальности (память, внимание, мышление);
- опыт (знания, умения, навыки);
- социальный фактор (коммуникативные навыки, лидерство, способность принимать решения в рамках компетенции).

Утечка информации

Доступ к информации испытательного центра, размещенной в виде электронных документов, а также переписка с контрагентами должны быть лимитированы.

Под несанкционированным доступом следует понимать доступ к информации в нарушение должностных полномочий сотрудника и доступ к закрытой для публичного просмотра информации со стороны лиц, не имеющих разрешения на ознакомление с ней. Также несанкционированным действием в отдельных случаях можно считать получение доступа к информации лицом, имеющим право на доступ к сведениям в объеме, превышающем необходимый для выполнения служебных обязанностей.

Несанкционированный доступ может быть реализован из-за:

- ошибки конфигурации (прав доступа, программного обеспечения);
- слабой защищенности средств авторизации (хищение паролей, физический доступ к плохо охраняемому оборудованию, доступ к незаблокированным рабочим местам сотрудников в их отсутствие);

- ошибки в программном обеспечении;
- злоупотребления служебными полномочиями (воровство резервных копий, копирование информации на внешние носители при праве доступа к информации).

Для предотвращения несанкционированного доступа в испытательном центре могут быть приняты следующие меры:

- пост охраны;
- запирание кабинетов на ключ;
- хранение в сейфах или шкафах, имеющих систему замков, персональные данные сотрудников;
- ограничение доступа в ряд помещений;
- использование личного пароля сотрудников, применяющих во время работы программное обеспечение (например, 1С);
- проведение обязательной смены кодов и паролей при увольнении сотрудников, имеющих доступ к используемым программам, сейфам и др.

В связи с важностью данного вопроса подготовки кадров и карьерного роста в науке в рамках конференции GLP-PLANET V была проведена отдельная сессия «Ярмарка вакансий». На этой сессии было рассмотрено множество вопросов, посвященных тому, как студентам и молодым ученым правильно выбрать свой карьерный маршрут.

Варвара Владимировна Чупова, ведущий психолог и карьерный консультант Санкт-Петербургского государственного автономного учреждения «Центр занятости населения Санкт-Петербурга», в своем докладе «Карьера в науке для молодого специалиста» рассказала, как предпочтительно мыслить и какие действия предпринимать молодым специалистам для того, чтобы их карьера стала успешной и принесла удовлетворение и самореализацию. Варвара Владимировна рассказала и о том, что молодым специалистам желательно в самом начале пути понимать итог — кем я хочу стать, и каждый должен сформулировать личные критерии удовлетворенности жизнью. При этом можно начать от обратного, то есть понять кем точно не хочется стать.

Светлана Николаевна Игнатенко, директор по персоналу Friday's Games, в докладе «Как эффективно подготовиться к интервью с работодателем» дала множество практических рекомендаций молодым ученым о том, как проходить интервью с потенциальным работодателем и менеджерами по персоналу, грамотно отвечать на вопросы при приеме на работу и правильно преподнести свои преимущества. Для этого необходимо определить свои ключевые навыки, опыт, достижения и все это записать, чтобы волнение в ходе собеседования не помешало рассказать об этом. Также Светлана Николаевна пояснила, что еще до собеседования необходимо собрать информацию о компании, используя доступные интернет-ресурсы, сайт компании, социальные сети, рейтинги и т.д. Важное замечание заключалось в том, что не стоит смущаться задавать вопросы как рекрутерам, так и непосредственно самому работодателю. При этом вопросы также лучше заранее записать.

Следующие докладчики данной сессии рассказали о возможностях для молодых ученых, которые есть в высших учебных заведениях Санкт-Петербурга, Перми

Таблица 1

Научно-образовательные возможности высших учебных заведений

Информация о лекторе	Тема доклада
Елена Владимировна Флисюк, проректор по научной работе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России	Научно-образовательный центр полного цикла на основе химического синтеза: Строительство экспериментальной площадки по производству лекарственных препаратов
Дмитрий Юрьевич Ивкин, начальник Центра экспериментальной фармакологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России	Подготовка специалистов доклинических исследований в рамках магистратуры направления «Биология»
Дмитрий Владиславович Компанцев, заведующий кафедрой фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России	Содержательная и декларативная компонента образования по программе 33.05.01 — Фармация как идеальная база для начала работы в качестве сотрудника R&D-центра фармацевтической компании

Таблица 2

Карьерные возможности в фармацевтических компаниях

Информация о лекторе	Тема доклада
Мита Цыриевна Сультимова, бизнес-партнер по управлению персоналом ООО «ГЕРОФАРМ»	ВСЕЛЕННАЯ ГЕРОФАРМ
Екатерина Игоревна Шевченко, руководитель центра привлечения талантов АО «ВЕРТЕКС»	Карьера в фарме
Ксения Владимировна Гарбуз, специалист направления «Привлечение и подбор» АО «БИОКАД»; **Александра Александровна Бурдинская,** ведущий специалист направления «Привлечение и подбор» АО «БИОКАД»	Развитие Soft Skills

и Пятигорска, какие существуют программы основного и дополнительного профессионального образования (табл. 1).

Специалисты компаний ООО «ГЕРОФАРМ», АО «ВЕРТЕКС» и АО «БИОКАД» рассказали о возможностях, которые предоставляют их организации как для студентов старших курсов, так и для выпускников профильных вузов (табл. 2).

Помещение (здание) испытательного центра

Помещение (здание) любого испытательного центра как комплекс, представляющий собой собственно здание (стены, перекрытия, кровля), инженерные системы и оборудование, имеет определенный набор потенциальных рисков, которые можно разделить на природные и техногенные. Это риски, которые можно предусмотреть заранее и создать алгоритмы действия на случай их возникновения.

Что касается природных факторов риска, их стоит определять в зависимости от географического расположения испытательного центра. Следует четко понимать, какие из природных явлений могут оказать влияние на непрерывность деятельности испытательного центра. Например, возможны ли в данной географической зоне наводнения, землетрясения или даже высота снежного покрова, которая может оказаться критичной и которую следует учитывать при проектировании здания или в ходе его эксплуатации. На тот случай, когда риски природного характера известны, следует разрабатывать необходимую документацию и информировать о ней сотрудников, чтобы в случае возникновения угрозы можно было сберечь как жизни людей и лабораторных животных, так и материальные ценности.

При получении извещения, например, из СМИ об угрозе возникновения одного из перечисленных явлений принимаются меры, рекомендованные Росгидрометом для обеспечения безопасности сотрудников. При необходимости может быть введен укороченный рабочий день на период действия явления. При соответствующих рекомендациях Росгидромета сотрудникам может быть предоставлен внеплановый свободный день или удаленный доступ, если позволяет характер трудовой деятельности. В этом случае на работу должны выйти только сотрудники, обеспечивающие надлежащее функционирование инженерных сетей и отвечающие за жизнеобеспечение лабораторных животных.

При возникновении зон неблагоприятной эпидемиологической обстановки следует разрабатывать комплекс мероприятий по защите здоровья сотрудников и лабораторных животных, руководствуясь действующими постановлениями правительства, иными нормативно-правовыми, а также внутренними документами. Среди мер можно рассмотреть, но не ограничиваться:

- административными действиями (сменный график работы, переход на дистанционную работу, разъяснительная и просветительская работа по информированию сотрудников о мерах противодействия распространения заболеваний, пропаганда вакцинации и т.д.);
- санитарно-эпидемиологическими мерами (введение масочного режима, обеспечение дополнительной дезинфекции отдельных зон организации и т.д.).

Если нештатная ситуация уже произошла, приблизительный вариант алгоритма действий может выглядеть так:

- формирование групп восстановления;
- уведомление сотрудников, поставщиков и спонсора;
- система оповещения о нештатных ситуациях;
- проведение эвакуационных мероприятий в нештатных ситуациях;

- обеспечение защиты сотрудников;
- оценка ущерба;
- анализ причин нештатных ситуаций, проведение расследований.

Не следует забывать в данных случаях и о других сторонах, заинтересованных в деятельности испытательного центра, таких как поставщики и спонсоры, которых необходимо будет оповестить при сбоях в работе.

Одной из наиболее важных составляющих не только функционирования здания и обеспечения работы персонала, но и соблюдения обязательных требований содержания лабораторных животных являются инженерные сети. О том, какие они бывают, каким образом их необходимо обслуживать и какие регламентирующие стандарты необходимо использовать, рассказал в своем докладе «Техническое обслуживание инженерных систем и оборудования» технический директор АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» Кирилл Юрьевич Кильдибеков. Строгое выполнение требований Ростехнадзора в области обслуживания инженерных систем и аттестации персонала обеспечит испытательный центр полным выполнением правил GLP в области технического обеспечения условий содержания животных и проведения исследований.

Крайне важным в отношении условий труда и содержания лабораторных животных является вопрос санитарного благополучия. О том, на что необходимо обратить внимание и какие нормативно-правовые документы следует использовать в своей работе испытательному центру, выполняющему доклинические исследования, рассказала Ольга Игоревна Платонова, главный специалист-эксперт отдела эпидемиологического надзора Межрегионального управления № 22 ФМБА России в своем докладе «Санитарно-эпидемиологические требования к доклиническому центру: на что обратить внимание?». Ольга Игоревна подробно сообщила о том, какие мероприятия должны проводиться в отношении помещений, персонала, обращения с отходами, реагентами и растворами, а самое главное о том, каким образом могут быть выстроены взаимоотношения испытательных центров с ФМБА России, и рассказала, что эффективное сотрудничество является залогом санитарного благополучия как для испытательного центра, так и для окружающей среды. Особенное внимание Ольга Игоревна обратила на то, что все требования GLP в области санитарной безопасности полностью совпадают с нормативными требованиями ФМБА России.

Доклад руководителя провизорской службы АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» «Актуальные вопросы использования наркотических средств и психотропных веществ в доклинических исследованиях» Натальи Александровны Кищенко был посвящен актуальным вопросам использования наркотических средств (НС) и психотропных веществ (ПВ) в доклинических исследованиях. Наталья Александровна подробно рассказала обо всех требованиях, предъявляемых к лицензиату, о допуске персонала к работе и последующих действиях по приобретению, хранению, использованию и уничтожению НС и ПВ, а также о необходимости создания перечня документов, регламентирующих оборот НС и ПВ. Однако наиболее значимым вопросом для получения лицензии является наличие помещений и оборудования, необходимых для осуществления деятельности по обороту НС и ПВ, используемых в научных и экспертных целях и в ветеринарии.

По вопросу непрерывности деятельности в контексте сохранности здания можно рассмотреть утрату архива и мероприятия по предотвращению потерь с этим связанных.

В испытательном центре может существовать несколько видов архивов:

- гистологический, в котором хранятся материалы, связанные с исследованиями (стекла, блоки, влажный архив);
- архив, в котором хранятся бумажные носители и электронные носители, фиксирующие отчеты о НИР и документооборот в структурных подразделениях.

Полная утрата архивной информации возможна при возникновении НС. При наступлении НС ответственный за архив самостоятельно оценивает соотношение риска для своего здоровья и пользу от эвакуации архивных материалов. Приоритетом является сохранение здоровья человека. Если угрозы жизни и здоровью ответственного за архив нет, архивариусом предпринимаются попытки к сохранению архивируемых материалов.

С целью обеспечения сохранности документации, связанной с доклиническими исследованиями в испытательном центре, может быть предусмотрен договор со сторонней организацией, которая предоставляет облачное хранилище данных. В данном хранилище могут быть размещены PDF-копии бумажных носителей, связанных с выполнением доклинического исследования (отчет о НИР и соответствующие приложения, документация службы качества). В случае полной утраты бумажной документации и серверного хранения документации, архив частично может быть восстановлен из облачного хранения.

В случае полной утраты гистологического архива — возможность восстановления, как правило, отсутствует.

Оборудование, материалы, реактивы

Важнейшим аспектом функционирования испытательного центра является управление оборудованием и товарно-материальными ценностями.

Директор Центра метрологии и консалтинга «Поверие» Полина Владиславовна Гремякова в своем докладе «Организация управления оборудованием для обеспечения непрерывности деятельности испытательного центра» на нескольких примерах продемонстрировала, как и для чего необходимо управлять рисками касательно оборудования, какие потенциальные источники риска существуют, затем рассказала о проблемах в управлении оборудованием, наиболее часто встречающихся в испытательных центрах.

Подробнейшим образом о валидации вспомогательного оборудования и аттестации испытательного на примерах различного оборудования, без которого не обходится в своей работе ни один испытательный центр, рассказал Евгений Евгеньевич Бекетов, директор центра разработки ООО «Мабскейл» в докладе «Валидация вспомогательного оборудования и аттестация испытательного» (рис. 3).

На примере конкретного оборудования для постановки клеточных тестов Евгений Евгеньевич наглядно продемонстрировал практический подход к определению

Оборудование	Правильность измерений	Безопасность сотрудников	Необходимость повторения	Риск поломки	Ключевая работа/фактор
Микроскоп	—	—	—	—	—
Камера Горяева	Да	—	—	—	Осмотр на наличие повреждений. Плановая замена принадлежности
Центрифуга (мини)	—	Да	Да	—	—
Центрифуга (ультра)	—	Да	Да	—	—
Водяная баня	—	—	Да	—	Валидация по температуре
Криохранилище	—	—	Да	—	Использование датчика уровня азота

Рис. 3. Подход к определению наиболее значимых факторов и ключевых работ, которые требуются для каждой единицы оборудования при постановке клеточных тестов

наиболее значимых факторов и ключевых работ, которые требуются для каждой единицы оборудования.

Доклад Татьяны Ивановны Ситько «Информационная безопасность. Валидация компьютеризированных систем», консультанта управления фармацевтической инспекции Минздрава Республики Беларусь, был посвящен информационной безопасности и валидации компьютеризированных систем. Данный вопрос до настоящего времени все еще остается открытым, так как во внешней нормативной документации недостаточно четко сформулированы правила документирования данного процесса. Татьяна Ивановна, помимо жизненного цикла компьютеризированных систем, рассказала об этапах валидации компьютеризированных систем и о подходе к документированию конкретных этапов.

Тест-системы

Чаще всего тест-системами в испытательном центре, выполняющем доклинические исследования, являются лабораторные животные. В отношении непрерывности деятельности, учитывая, что животные могут представлять угрозу не только друг для друга в плане распространения зоонозов, но и для персонала (антропозоонозные заболевания, нанесение физических повреждений и т.д.), непременно следует проводить оценку рисков и предусматривать алгоритм действий на случай возникновения нештатных ситуаций.

Рассмотрим некоторые возможные сценарии нештатных ситуаций.

Переезд

Переезд организации в новое помещение может быть плановым (капитальный ремонт здания, масштабирование организации и др.) или внеплановым (при возникновении чрезвычайной ситуации, повлекшей за собой разрушение здания и/или его технических систем: водоснабжения, электроэнергии, отопления, вентиляции и др.).

В случае планового переезда в новое помещение в первую очередь перевозят сотрудников, лабораторных животных, оборудование и документацию, не задействованные в текущих рабочих процессах. По завершении рабочих процессов в новые помещения перевозят оставшихся сотрудников, лабораторных животных, оборудование и документацию. После переезда проводят инвентаризацию, определяют возникшие в ходе переезда потери. На основании действующих в испытательном центре документов приступают к восстановлению рабочих процессов.

Для транспортировки животных используют машины и системы (специальные боксы, клетки и др.), позволяющие обеспечить жизненные функции лабораторных животных в пути.

Внеплановый переезд (эвакуация, чрезвычайная ситуация)

При чрезвычайной ситуации первым приоритетом организации является спасение жизни сотрудников, второй приоритет — спасение жизни лабораторных животных.

На случай эвакуации лабораторных животных следует предусмотреть, в каких клетках это можно осуществить. Например, лабораторных грызунов можно эвакуировать в клетках содержания, а для крупных животных следует предусмотреть загоны для временного размещения на улице. Также необходимо учитывать климатические особенности региона и в связи с этим, какое количество времени животных можно будет оставлять на улице. Также следует предусмотреть, куда животные отправятся дальше, если возвращение в здание будет невозможно.

Терроризм

Наиболее вероятной формой терроризма в отношении испытательного центра может быть деятельность активистов по защите прав животных. Среди членов обществ по защите прав животных есть активисты, искаженно воспринимающие проведение доклинических исследований не как научное познание, нацеленное на защиту здоровья нации, обеспечение населения качественными лекарственными средствами и др., а как целенаправленный акт вредительства, нацеленный на неоправданное издевательство над животными. В связи с чем возникает угроза возможного терроризма — погрома питомника для «освобождения» животных. Для предотвращения данной ситуации на территории испытательного центра может быть предусмотрена пропускная система входа/въезда внешних визитеров. Все исследования должны проходить оценку биоэтической комиссии, приоритетом которой является принятие решения о гуманности проводимых исследований и возможности проведения исследования с использованием альтернативных методов (без участия животных).

Зоонозы и антропозоонозы

Как известно, животные могут являться источником инфекционных заболеваний и быть потенциально опасными как для других видов животных, так и для сотрудников, контактирующих с животными. В первом случае (заражение животных) возможна эпидемия, во втором (при заражении людей) — временная потеря трудоспособности или инвалидизация и даже смерть. Перечень возбудителей в зависимости от вида животных, информация о наличии/отсутствии опасности для человека, а также о путях передачи должны быть в каждом испытательном центре [1–4].

Для предотвращения возникновения эпидемии среди лабораторных животных и с целью охраны здоровья сотрудников в испытательном центре могут проводиться следующие мероприятия:

- планировка вивария и/или питомника должна предусматривать раздельное содержание различных видов лабораторных животных;
- отказ сторонним сотрудникам (представители аудиторских компаний, спонсоры и др.) при посещении испытательного центра в том случае, если последние менее чем 3 сут назад посещали животноводческие хозяйства;
- применение ряда процедур, предусмотренных для обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия (меры карантинизации, обработки животных при получении из сторонних организаций, плановые мероприятия по уборке и дезинфекции помещений; организована поточность «чистых» и «грязных» материалов);
- использование разработанных процессов дезинфекции и санитарной обработки средств для содержания животных, в том числе и инвентаря, при этом все процессы должны быть задокументированы во внутренних документах испытательного центра;
- обеспечение санитарного мониторинга на основании внутренних документов испытательного центра и проведение производственного контроля за соблюдением санитарных правил и выполнением санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий;
- мониторинг здоровья животных на основании лабораторных исследований (объем определяется видом животных), исследованиям подвергают не менее 5% партии животных в зависимости от эпизоотологической ситуации, наличия каких-либо заболеваний у отдельных видов лабораторных животных, от результатов ранее проведенных исследований и выявленных патогенов, от назначения использования этих животных в исследованиях и рекомендаций ветеринарного врача;
- обучение сотрудников по вопросам биобезопасности в соответствии с инструкциями по биобезопасности;
- составление перечня контингента, подлежащего обязательному медицинскому осмотру и профилактическим прививкам в соответствии с действующим законодательством РФ.

В случае возникновения эпидемии среди лабораторных животных, вовлеченных и не вовлеченных в исследование, главный ветеринарный врач оценивает степень и масштаб поражения животных, возможную угрозу другим видам животных

и/или сотрудникам и по согласованию с руководством испытательного центра принимает решение о дальнейшей судьбе животных. После чего проводится расследование о причинах возникновения эпидемии.

Заключение

В данном разделе мы постарались привести практические рекомендации по обеспечению непрерывности деятельности испытательных центров. Основываясь на принципах надлежащей лабораторной практики и используя риск-ориентированный подход в отношении системы обеспечения качества, персонала, помещений, оборудования, тест-систем, исследуемых объектов и документации, можно обеспечить непрерывность деятельности любого испытательного центра.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Березкин В.А., Бондарева Е.Д., Семененко Н.А. Определение риска возникновения зооантропонозных заболеваний, характерных для лабораторных карликовых свиней в условиях доклинического центра // Лабораторные животные для научных исследований. 2023. № 1. С. 14–25. DOI: 10.57034/2618723X-2023-01-02.
2. Бондарева Е.Д., Макарова М.Н., Акимов Д.Ю. и др. Рискориентированный подход к мониторингу здоровья лабораторных кроликов // Лабораторные животные для научных исследований. 2023. № 3. С. 4–17. DOI: 10.57034/2618723X-2023-03-01.
3. Бондарева Е.Д., Макарова М.Н., Пастухова А.В. и др. Риск-ориентированный подход к мониторингу здоровья лабораторных хищных млекопитающих // Лабораторные животные для научных исследований. 2024. № 2. С. 98–122. DOI: 10.57034/2618723X-2024-02-09.
4. Акимов Д.Ю., Макарова М.Н., Акимова М.А. и др. Риск-ориентированный подход к проведению мониторинга здоровья обезьян // Лабораторные животные для научных исследований. 2021. № 2. С. 69–82. DOI: 10.29296/2618723X-2021-02-09.

Фармацевтическая разработка и особенности ее аналитического сопровождения

https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-9-7-s2

М. В. Карлина[1], В. М. Косман[1], О. А. Арчакова[2], Н. С. Багаева[2], И. А. Валуев[3], Ю. В. Власенко[4], П. К. Карнакова[2], Т. Н. Комаров[2], В. Г. Лужанин[5], А. М. Львов[6], А. Г. Никифорова[7], А. С. Пепелышева[6], Д. А. Рождественский[8], А. В. Соколов[9], А. Г. Солодовников[10], И. И. Тернинко[11], В. А. Хазанов[12], И. Е. Шохин[2], Н. С. Юдина[13]

[1] *АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,*
[2] *ООО «Центр фармацевтической аналитики»,*
[3] *ООО «Мабскейл»,*
[4] *ООО «Ферринг Продакшн»,*
[5] *ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России,*
[6] *АО «БИОКАД»,*
[7] *ООО «Экзактэ Лабс»,*
[8] *Евразийская экономическая комиссия,*
[9] *ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,*
[10] *ООО «Статэндокс»,*
[11] *Испытательная лаборатория Центра контроля качества лекарственных средств ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России,*
[12] *Группа компаний «ИФАР»,*
[13] *ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ*

Введение

В условиях быстрого развития глобализационных процессов в экономике, нестабильной геополитической обстановки и снижения доли зарубежных лекарственных препаратов (ЛП) современный отечественный фармацевтический рынок требует эффективной разработки и производства лекарственных средств (ЛС) высокого качества. Продолжающееся санкционное давление, ухудшение эпидемиологической ситуации в мире делают приоритетным для России развитие фармацевтического и лекарственного суверенитета (Subbotina T.N., Tryakin D.S., 2023). Фармацевтическая разработка (ФР) в целом направлена на создание такого состава и производственного процесса, которые позволят стабильно производить ЛП с заданными ха-

рактеристиками, удовлетворяющими потребности пациентов. Если рассматривать ФР как раздел регистрационного досье на ЛП, то он должен обобщать знания, полученные на разных этапах жизненного цикла ЛП, от лабораторного этапа разработки до выпуска промышленных серий препарата.

Как мы отмечали ранее (Карлина М.В. и соавт., 2023), каждый этап создания ЛП, начиная с поиска молекулы, проведения доклинических (ДКИ) и клинических исследований (КИ), заканчивая выводом препарата на рынок, связан с теми или иными рисками. Поэтому уже в начале работы по созданию нового ЛП необходимо тщательно оценить потенциальные риски и разработать стратегии их снижения. Применение рискориентированного подхода необходимо для эффективной работы над препаратом и позволяет минимизировать временные затраты и ресурсы для создания эффективного и безопасного ЛС. Основным документом, в котором изложены принципы и примеры управления рисками качества фармацевтической продукции, является ICH Q9 quality risk management, который был опубликован в 2015 г. и обновлен в 2023 г. (текущая версия вступила в силу с 26.07.23). Документ описывает управление рисками на этапе разработки, производства и распространения ЛП[1].

О применении риск-менеджмента в разработке лекарств рассказал в своем докладе Вениамин Абрамович Хазанов («Риск-менеджмент в разработке лекарств», группа компаний «ИФАР»). Он обозначил те проблемы, с которыми может столкнуться каждый разработчик на разных этапах жизненного пути препарата:

- *во-первых, в ходе НИР* самая эффективная молекула in vitro может оказаться не лучшей по безопасности, биодоступности, метаболизму, кинетике, стабильности, технологичности; не учтены все возможные мишени, на которые действует активная фармацевтическая субстанция (АФС), выбранная мишень может плохо соответствовать таковой у пациента или может не быть идентификации мишени для выбранной патологии, не проработаны источники сырья и цена технологии; установлен низкий уровень патентования и т.д.;
- *во-вторых, на этапе ФР и трансфера технологий* промышленный синтез может менять свойства субстанции (иные примеси, полиморфные структуры, кристаллы и др.); промышленная технология требует доработки лекарственной формы (ЛФ), необходима ревалидация аналитических методик, выявлены непригодность технологии для промышленного производства, удорожание при масштабировании производства, смена поставщика сырья влияет на технологию и качество;
- *в-третьих, на этапе ДКИ и КИ* не соблюдены требования GLP; объект исследования плохо стандартизован и менялся в ходе работы; смена ЛФ и возвращение к началу ДКИ; выявлены неожиданные свойства АФС, останавливающие разработку; нет эффективности по утвержденным Минздравом России конечным точкам; большие выборки и длительность КИ; возникновение недопустимых нежелательных явлений.

Докладчик подчеркнул высокий риск создания неконкурентоспособного препарата, который потом невозможно будет продать будущему производителю, особен-

[1] ICH Q9 quality risk management. https://www.ema.europa.eu/en/ich-q9-quality-risk-management-scientific-guideline (дата обращения 08.2024).

но если для него подобрана слабая доказательная база, касающаяся преимуществ перед лидерами рынка. Он также отметил, что для снижения рисков крайне важно, чтобы над проектом работала опытная команда при участии специалистов из всех областей разработки и продвижения проекта (в продажах, производстве, клинических и доклинических испытаниях, технологической разработке, проектном менеджменте, финансах), требуется рациональное управление формируемыми объектами интеллектуальной собственности и хорошее взаимопонимание разработчиков, инвестора и будущего производителя.

Необходимо отметить, что в настоящее время эффективность и безопасность оригинальных и воспроизведенных ЛП зачастую существенно отличаются. Эти различия могут быть обусловлены такими факторами, как фармацевтическая технология производства ЛП, используемые вспомогательные вещества (ВВ), их природа и количество, первичная упаковка препарата, условия его хранения и транспортировки (Гильдеева Г.Н., Белостоцкий А.В., 2017).

При переходе от национального регулирования сферы обращения лекарственных средств к единому в рамках Евразийского экономического союза (ЕАЭС) гармонизация требований ФР определяет необходимость использования современных подходов, включающих применение новых методик и инструментов, гарантируя выход на рынки ЕАЭС и других интеграционных объединений эффективных и безопасных ЛП. Новая модель разработки лекарственных средств, описанная в руководствах ICH, предусматривает применение научно-ориентированного подхода к разработке с использованием соответствующих инструментов, таких как определение целевого профиля качества препарата (ЦПКП), установление критических показателей качества (КПК), оценка рисков, установление пространства проектных параметров, разработка стратегии контроля, управление жизненным циклом ЛП и постоянное улучшение существующих процессов. В настоящее время группа экспертов Евразийской экономической комиссии (ЕЭК) рассмотрела и одобрила в целом проект нового отраслевого норматива — руководства «Фармацевтическая разработка» на базе документа ICHQ8(R2) Pharmaceutical development. Многие подходы и методики, приведенные в этих документах, не относят к элементам традиционной концепции ФР, не до конца изучены и затратны, однако гарантируют выход эффективного ЛП с заданными показателями качества (Феофилова А.Е. и соавт., 2020).

Современный подход к ФР, основанный на проектировании качества Quality by Design (QbD), — систематизированный подход к разработке, начинающийся с заранее сформулированных целей и направленный на понимание особенностей препарата и технологического процесса, а также контроль производства ЛП на базе строгих научных принципов и управления рисками для качества (Mohurle S.M., 2019, Mane S.S., 2022). Такой подход способствует разработке высококачественного продукта и позволяет управлять его качеством на протяжении всего жизненного цикла. QbD — концепция, впервые озвученная ученым Джозефом М. Джураном, который считал, что качество должно быть изначально заложено в продукте, и большинство проблем качества препаратов связано в первую очередь с тем, как они были спроектированы. В 2002 г. FDA объявило о внесении поправок в действующую надлежащую производственную практику, и фармацевтическая промышленность на-

чала создавать более систематические научные и основанные на оценке рисков методы ФР (Divya M., Veeresh Babu P., 2023).

QbD в отличие от традиционной фармацевтической разработки подразумевает большее количество экспериментов для научного обоснования состава и технологии ЛП, обязательную валидацию технологических процессов (валидация в разрезе данной концепции перестает быть разовым событием, исключен вариант выполнить только три валидационные серии и поставить на этом точку), их верификацию в ходе жизненного цикла, а также контроль процесса производства на основе научных данных. Фундаментальный принцип QbD заключается в том, что качество должно быть заложено в рецептуру путем разработки, а не тестирования АФС и ЛП. Проведение тестов контроля качества ЛП без определения свойств исходных веществ и технологических процессов, а также их влияния на эффективность и безопасность не будет иметь никакого значения для достижения требуемого высокого качества (Namjoshi S. и соавт., 2020).

На первый взгляд реализация QbD достаточно ресурсозатратна и может увеличивать сроки ФР ЛП, однако при более детальном рассмотрении можно сделать вывод, что она, обеспечивая более полные знания о ЛП [входящих в его состав действующих веществах (ДВ) и ВВ] и технологическом процессе, упрощает процедуры масштабирования, трансфера и производства коммерческих серий.

ФР можно разделить на 3 ключевых этапа — лабораторный, опытно-промышленный и промышленный. QbD может и должна быть применена на каждом из этих этапов.

Лабораторный этап ФР и QbD

Этап лабораторной ФР в общем объеме разработки играет основополагающую роль, так как именно в ходе этого процесса изучают ключевые свойства АФС, исследуют их совместимость с ВВ, на основании полученных данных осуществляют выбор состава ЛП, оптимальной технологии его создания и первичной упаковки (Демина Н.Б., 2016).

Получение достоверной информации по свойствам АФС и технологическим параметрам процесса производства ЛП, которую затем включают в состав регистрационного досье, обеспечивает ряд факторов. Важнейшими из них являются использование лабораторного оборудования надлежащего качества и применение разработанных стандартных методик, выполняемых обученным персоналом (Демченко Д.В. и соавт., 2020).

Исходя из того, что лабораторная часть ФР предшествует промышленному выпуску ЛП, именно ее реализация с позиции спланированного качества будет способствовать дальнейшему производству качественных, эффективных и безопасных препаратов. Приступая к лабораторной стадии ФР, необходимо определить ЦПКП, так как начинать процесс разработки ЛП необходимо с четко обозначенной конечной цели. ЦПКП предлагает структурированный шаблон, в котором собраны характеристики будущего ЛС, включая предполагаемое использование, целевые группы населения, характеристики безопасности/эффективности. Он включает

Таблица 1

ЦПКП для воспроизведенного препарата

Элемент ЦПКП	Основания для выбора
Лекарственная форма	Требования фармацевтической эквивалентности. Аналогичная оригинальному препарату
Путь введения	Аналогичный оригинальному препарату
Дозировка	Требования фармацевтической эквивалентности. Обеспечение эффективности и безопасности
Стабильность	Не менее срока, установленного для оригинального препарата. На первом этапе минимальный срок для подачи на регистрацию
Упаковка	Обеспечение стабильности препарата и соответствие потребительским характеристикам
Параметры качества	Требования фармацевтической эквивалентности
Способ применения	Требования эквиэффективности. Аналогичный оригинальному препарату
Фармакокинетика (ФК)	Требования к биоэквивалентности. Необходимо обеспечить биодоступность и эффективность, аналогичную оригинальному препарату

Примечание. ЦПКП — целевой профиль качества лекарственного препарата; ФК — фармакокинетика.

в себя как минимальные, так и предпочтительные свойства продукта, а также дает разработчику определенную основу для оценки своего препарата, которую необходимо применять по мере прохождения процесса разработки.

Марина Валерьевна Карлина («Целевой профиль качества лекарственного препарата, выбор критических показателей качества», АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ») подробно представила в своем докладе ряд аспектов, касающихся лабораторного этапа ФР с учетом QbD, а также рассказала о формировании ЦПКП для воспроизведенных и оригинальных ЛП (табл. 1 и 2). ЦПКП воспроизведенного ЛП во многом определен оригинальным препаратом, так как он должен иметь такой же качественный и количественный состав действующих веществ и ту же ЛФ. В основу создания ЦПКП оригинального или гибридного ЛП должны быть положены данные по ДКИ самой молекулы, маркетинговые исследования, учтены потребительские потребности.

Автор обратил внимание на то, что ЦПКП требует контроля и своевременного обновления на протяжении всего пути разработки препарата. Вариативность ЦПКП оригинального препарата будет во многом определена с помощью подробно проведенных ДКИ для АФС.

Юлия Васильевна Власенко («Целевой профиль качества продукта. Case-study: назальный спрей системного действия», ООО «Ферринг Продакшн») рассказала

Таблица 2

ЦПКП для оригинального или гибридного препарата

Элемент ЦПКП	Основание для выбора	
	На этапе идеи препарата	В процессе фармацевтической разработки
Лекарственная форма	Удобство приема, маркетинговые исследования, предварительные данные о ФК (если есть)	Данные о совместимости веществ, стабильности ЛФ, данные ФК прототипов составов
Путь введения	Планируемые схемы лечения, предварительные данные о ФК (если есть)	Возможно изменение изначально запланированного пути введения в зависимости от результатов ФР и ДКИ
Дозировка	Предварительные данные ДКИ для действующего вещества	Уточненные данные ДКИ для разрабатываемой ЛФ
Способ применения	То же	То же
Параметры качества препарата	Требования ОФС к планируемой разработке ЛФ и действующему веществу	Изменяются при изменении ЛФ и производителя действующего вещества
Упаковка	Соответствие потребительским характеристикам	Данные по стабильности вещества и ЛФ в различных видах упаковки
Стабильность	Желаемые ориентировочные сроки для подобных веществ и ЛФ	Срок, установленный в ходе изучения стабильности конкретного ЛП

Примечание. ДКИ — доклинические исследования; ОФС — общая фармакопейная статья; ЛП — лекарственный препарат; ЛФ — лекарственная форма; ФК — фармакокинетика; ФР — фармацевтическая разработка; ЦПКП — целевой профиль качества лекарственного препарата.

о клинических аспектах целевого профиля продукта (ЦПП) и ЦПКП на примере конкретной лекарственной формы — назального спрея. Автор сделала акцент на том, что эффективность, безопасность и качество назального препарата определяются не только действующим веществом и фармацевтической композицией, но и характеристиками системы доставки. Элементами ЦПП на начальной стадии планирования создания будущего препарата могут являться такие клинические аспекты его будущего применения, как неудовлетворенная потребность [необходимость в быстром наступлении эффекта, возможность использования при наличии проблем с желудочно-кишечным трактом (ЖКТ)], соотношение польза/риск (лучше, чем у референта: более быстрый эффект; такая же эффективность; безопаснее и с лучшей переносимостью ввиду отсутствия воздействия на ЖКТ), которые не будут иметь непосредственного отражения в виде каких-либо параметров или элементов ЦПКП.

Такие элементы ЦПП, как группа пациентов (взрослые), путь введения (назальный), режим дозирования (одна доза для экстренной терапии, повторная доза как минимум через 2 ч), продолжительность терапии (препарат для экстренной помощи), среда применения пациентом (дома или при перемещениях), начало действия (менее чем через 30 мин) и фармакокинетический профиль (T_{max} менее 1 ч), могут найти отражение в элементах ЦПКП — объем дозы, размер дозатора упаковки, удобство и точность дозирования, введение в состав препарата ВВ, обеспечивающих необходимую биодоступность, усиливающих проницаемость и повышающих абсорбцию действующего вещества.

На основе ЦПКП на лабораторном этапе ФР должны быть выбраны критические характеристики (показатели) качества — физические, химические, биологические, микробиологические свойства или те, которые должны находиться в определенном пределе, диапазоне или иметь соответствующее распределение, чтобы обеспечить желаемое качество препарата. КПК выбирают исходя из разрабатываемой ЛФ (например, растворение для таблеток, осмолярность для инфузионных растворов и др.) с учетом свойств АФС и ВВ (количественное определение, примеси).

Возможные КПК ЛП используют в ходе лабораторного этапа разработки состава препарата и процесса его получения. КПК, так же как и ЦПКП, могут изменяться по мере увеличения знаний о препарате и понимания процесса.

Для ряда ЛФ уже на этапе лабораторной ФР рационально определение критических параметров процесса (КПП). КПП — это параметр технологического процесса, вариабельность которого оказывает влияние на критическую характеристику качества и поэтому подлежащий мониторингу или контролю, чтобы обеспечить желаемое качество на выходе процесса. Примерами КПП могут служить скорость и время перемешивания раствора, температура получения расплава/раствора, давление прессования, скорость вращения барабана при нанесении покрытия на таблетки и др.

Необходимо отметить, что уже на лабораторном этапе начинается работа над созданием проектного поля — это многомерная комбинация и взаимодействие входных переменных (например, характеристик материалов) и параметров процесса, подтвердившая способность обеспечивать качество. Проектное поле является объектом регуляторной экспертизы, работу в его пределах не рассматривают в качестве изменения, а выход за пределы проектного поля, наоборот, считают его изменением, что, как правило, влечет за собой инициацию регуляторного процесса пострегистрационного изменения.

Дмитрий Анатольевич Рождественский («Трансфер производства и аналитических методик, проектное поле и сфера дизайна как элементы фармацевтической разработки лекарственного препарата в праве ЕАЭС», ЕЭК), рассматривая вопросы формирования проектного поля, обратил внимание на то, что при его построении необходимо учитывать возможные изменения технологических процессов (измельчение, грануляция, покрытие оболочкой), условий окружающей среды и проведения процесса (температура, влажность, скорость экстракции, высота заполнения флаконов, давление прессования), а также изменения машин и аппаратов (мертвый объем петли инжектора, толщина слоя кюветы). Возможности использования проектного поля докладчик продемонстрировал на примере

получения лиофилизата ЛП при смене первичной упаковки: заранее определенное проектное поле позволило установить, что замена флаконов повлекла за собой увеличение остаточной влажности лиофилизата, которое критично для конкретного ЛП (приводит к значимому нарастанию примеси в ходе хранения), хотя с точки зрения требований нормативных документов оставалась в пределах разрешенного нормирования (рис. 1).

Безусловно, невозможно представить себе проведение лабораторного этапа ФР без аналитического сопровождения. Даже для самой ранней стадии ФР — преформуляционных исследований — требуется разработанная методика количественной оценки АФС, в ряде случаев также необходим и анализ примесей. Кроме того, на лабораторном этапе ФР должен быть разработан проект нормативной документации (НД), и соответственно определены методики качественного и количественного анализа ЛП. Инна Ивановна Тернинко («Валидация аналитических методик для целей стандартизации: реперные точки, «узкие места», практические примеры», испытательная лаборатория Центра контроля качества лекарственных средств ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), рассказывая о требованиях к объему валидации аналитических методик, отметила, что можно выделить различные ее виды (рис. 2). На стадии лабораторной ФР, когда еще не выбран окончательный состав и технология ЛП, необходимо и достаточно проведение первичной валидации. Инна Ивановна обратила внимание, что хотя критерии приемлемости аналитиче-

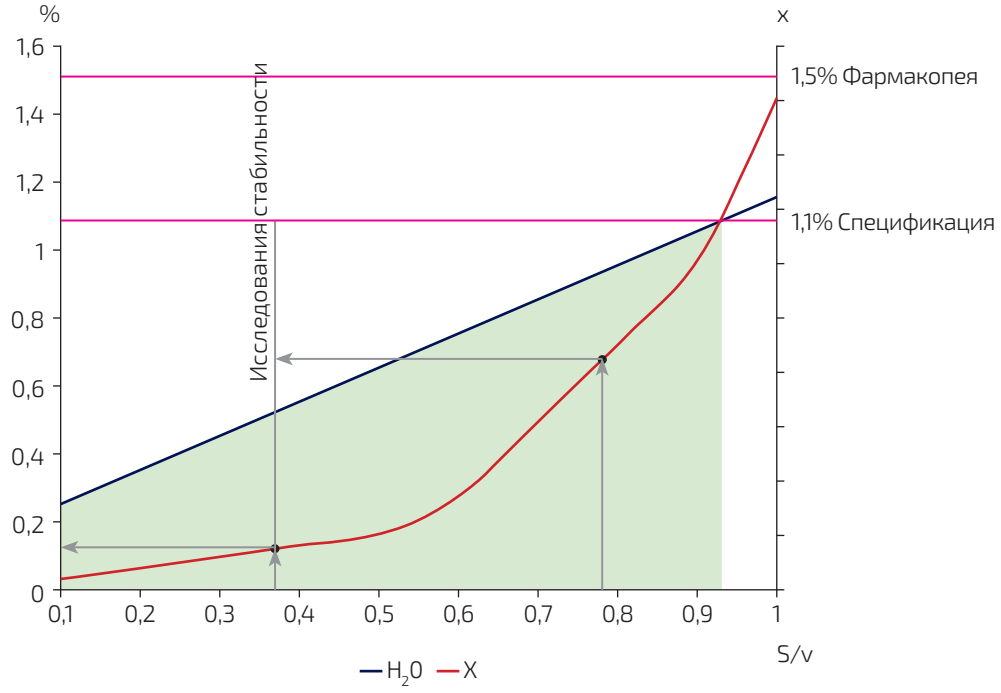


Рис. 1. Проектное поле для лиофильной сушки — остаточная вода и примесь X

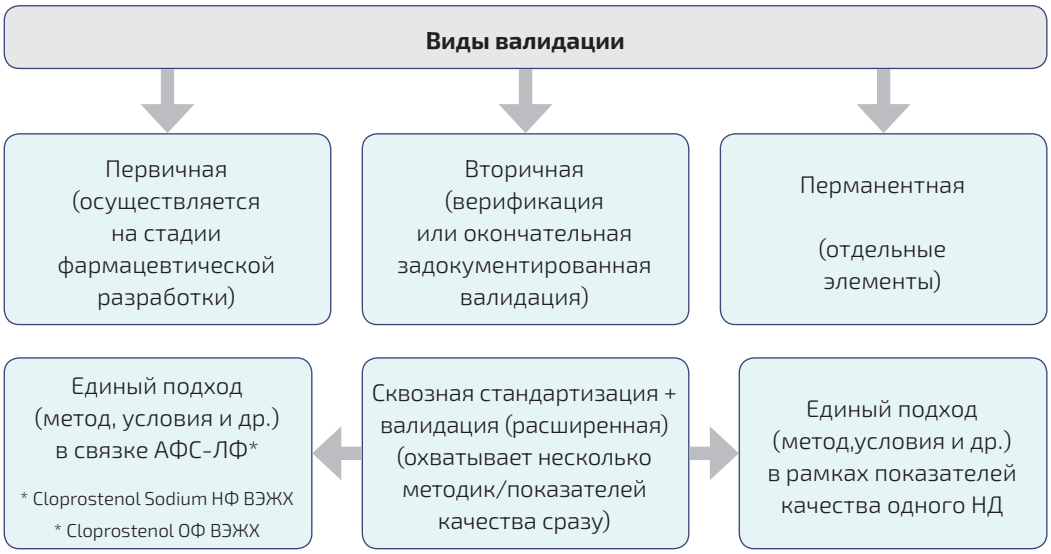


Рис. 2. Виды валидации аналитической методики (на основании[2]):
АФС — активная фармацевтическая субстанция; ЛФ — лекарственная форма; НД — нормативный документ; НФ — нормально-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; ОФ — обращенно-фазовая; ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография

ской методики для стандартизации присутствуют в руководстве[3], зависят от назначения методики и отклонения результата от номинальной дозировки, допустимого для разрабатываемого ЛП, в конечном итоге их утверждает сама лаборатория. Это обусловливает возникновение определенных рисков, связанных с достаточностью выбранных критериев приемлемости, обоснованностью их диапазонов и особенностями разработки методик. Кроме того, на любом этапе валидации методики есть риск установить, что она непригодна, и, следовательно, потребуется возвратиться к началу разработки.

Вторичную валидацию, направленную на проведение полной задокументированной процедуры, скоординированной с итоговой версией НД, целесообразно проводить на более поздних этапах ФР, когда состав ЛП, технология и условия выполнения анализа максимально приближены к итоговым (планируемым при промышленном производстве).

Об особенностях контроля качества ЛП моноклональных антител рассказал в своем докладе Алексей Викторович Соколов («Биосенсоры на эффекте поверх-

[2] Method Validation of U.S. Environmental Protection Agency Microbiological Methods of Analysis. EPA Forum on Environmental Measurements (FEM). 2009. 107 p. https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-01/documents/final_microbiology_method_guidance_110409.pdf (дата обращения 08.2024).

[3] Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. Москва: Министерство здравоохранения и социального развития РФ, 2007. 49 с.

ностного плазмонного резонанса для контроля качества моноклональных антител», ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»). Докладчик подробно рассказал о физических принципах, аппаратурном оснащении, сложностях экспериментальной работы при реализации этого сравнительно нового аналитического метода, имеющего пока ограниченное применение в выпускающем контроле качества ЛП. Биосенсоры на эффекте поверхностного плазмонного резонанса получили широкое применение в биомедицинских исследованиях, где требуется определять в режиме реального времени кинетические параметры взаимодействия молекул и диссоциации образующегося между ними комплекса, сопровождающиеся изменением показателя преломления исследуемой среды. В частности, с его помощью можно *in vitro* охарактеризовать процессы взаимодействия комплекса антиген — антитело, важные для понимания поведения биологических ЛП, в том числе моноклональных антител.

Ифрат Назимович Зилфикаров («Фитохимический анализ в контроле качества лекарственных препаратов: актуальные аспекты разработки, нормирования и стандартизации», ФГБНУ ВИЛАР) рассказал о методах анализа, используемых в стандартизации лекарственного растительного сырья и растительных ЛП и трансфере соответствующих аналитических методик. Он отметил, что процедура трансфера аналитических методик для фитопрепаратов и большинства ЛП схожа. Вместе с тем этот процесс зачастую сопряжен с изменением и совершенствованием методик при передаче от разработчика на производственную площадку, что позитивно сказывается на их качестве. Однако такая практика свидетельствует о нецелесообразности финализации разработки и валидации методик до их адаптации к условиям постоянного использования, что перекликается с мнением о рациональности частичной валидации на стадии лабораторной ФР, высказанным И.И. Тернинко. Особенности ФР могут быть связаны и с природой АФС и зависят от того, являются ли они индивидуальными веществами, полученными в результате химического синтеза, или комплексными смесями природного происхождения, как например, в случае фитопрепаратов.

В целом фитотерапия, несмотря на большое количество ЛП синтетического происхождения, не теряет свою актуальность и популярность среди пациентов. Интерес к растительным препаратам сохраняется благодаря их уникальным свойствам: достаточно высокая эффективность при низкой токсичности, комплексный органопротекторный эффект, широкий спектр терапевтического действия, минимальное количество побочных эффектов, а также относительная дешевизна по сравнению с синтетическими препаратами. Фитопрепараты находят применение при первичной и вторичной профилактике различных заболеваний, оздоровлении и реабилитации, в качестве средства повышения адаптационных резервов здорового организма, в спортивной медицине (Самбукова Т. В. и соавт., 2017).

Учитывая вышесказанное, проблемы поиска, разработки и стандартизации ЛП растительного происхождения, а также ЛП на основе индивидуальных веществ растительного происхождения как никогда актуальны. Владимир Геннадьевич Лужанин («Поиск потенциальных лекарственных кандидатов на основе индивидуальных веществ растительного происхождения», ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава

России) рассказал об основных принципах методологии выбора лекарственных кандидатов на основе индивидуальных веществ:

- выделение индивидуальных веществ единой химической группы из растительного сырья по универсальной неизбирательной методике;
- обеспечение химической чистоты выделенных индивидуальных соединений, недопустимость примесей веществ сходной структуры;
- необходимость применения современных физико-химических методов анализа для точного установления и подтверждения химической структуры молекул выделенных веществ, в том числе для определения изомеров, конформеров и др.;
- необходимость выделения относительно малого количества индивидуальных веществ для осуществления последующего фармакологического скрининга и выбора целевых наиболее перспективных субстанций;
- применение сочетанного фармакологического скрининга *in silico* для установления оптимальной экспериментальной системы организма и уточнения модели с использованием максимального количества потенциальных мишеней действия;
- выбор оптимальной модели фармакологического скрининга *in vitro*, позволяющей прямо или опосредованно изучить эффективность действия индивидуальных соединений растительного происхождения на максимальное число органов и систем организма;
- необходимость изучения взаимного влияния лекарственных кандидатов-лидеров при эквимолярном смешении на фармакологическую активность.

Автор поделился результатом своей работы с пятью объектами исследований — *Rubus chamaemorus L.*, морошка обыкновенная; *Empetrum nigrum L.*, водяника черная; *Solidago canadensis L.*, золотарник канадский; *Iris lactea Pall.*, касатик молочно-белый и *Ononis arvensis L.*, стальник полевой. За 10 лет работ с использованием вышеописанной методологии из изученных растений было выделено 38 соединений с установленной структурой, 8 новых природных соединений, 9 известных соединений, ранее не описанных для этих объектов. В целом, завершая разговор о лабораторном этапе ФР, необходимо отметить, что применение принципов QbD увеличивает затраты на научные исследования, однако в процессе серийного производства ЛП это может компенсироваться за счет повышения эффективности технологических процессов и контрольных операций, снижения количества забракованных серий препарата при его промышленном выпуске (Аладышева Ж.И. и соавт., 2019, Divya M., Veeresh Babu P., 2023).

Опытно-промышленный этап ФР, трансфер технологии и аналитических методик и QbD

После завершения лабораторного этапа ФР знания о технологических свойствах АФС, ее совместимости со вспомогательными веществами, составе препарата и технологии, о методиках анализа тех или иных характеристик препарата (количественное определение, примеси и др.), выбранных на этой стадии, передаются на про-

изводственную площадку, то есть должен произойти трансфер технологий и аналитических методик. Трансфер технологии ЛП будет успешным, если в результате можно будет стабильно производить ЛП с заданными при разработке показателями качества; все его этапы будут документально оформлены; персонал принимающей стороны овладеет всеми необходимыми знаниями, умениями и навыками, которые позволят достичь стабильного процесса производства; при этом, безусловно, должны соблюдаться сроки и бюджет проекта (Шигарова Л.В. и соавт., 2023).

В настоящее время процедура трансфера описана Международным обществом фармацевтического инжиниринга (ISPE) в «Руководстве по переносу технологий»[4], в документе Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) «Руководящие принципы ВОЗ по переносу технологии в фармацевтическом производстве»[5]. В Рекомендации Коллегии ЕЭК от 08.06.21 № 11 «О руководстве по трансферу технологий и(или) аналитических методик при производстве лекарственных средств»[6] достаточно подробно изложено, как должна быть проведена данная процедура, и какие документы в ходе нее должны быть оформлены. Трансферу аналитических методик посвящена общая фармакопейная статья[7].

При переносе технологии из лаборатории на производство продолжается работа над определением КПК, КПП и проектным полем ЛП. К моменту переноса технологии свойства АФС, ВВ и ЛФ должны быть изучены достаточно подробно, тогда как технологический процесс разработан не полностью, так как оборудование, используемое на лабораторной стадии ФР, во многом отличается от используемого в промышленном производстве. Производство на опытно-промышленном этапе не требует организации поточности процесса, создания окружающих условий, обеспечивающих защиту ЛП, которые необходимы в крупномасштабном производстве. Этот этап может быть проведен в одном помещении в условиях изоляции всей технологической линии. После удачно проведенной опытно-промышленной наработки ЛП требуется перенос технологии на крупномасштабное промышленное производство, для чего необходимы оценка рисков и предварительное моделирование процесса производства в новых реальных условиях (Береговых В.В., Спицкий О.Р., 2014).

Дмитрий Анатольевич Рождественский («Трансфер производства и аналитических методик, проектное поле и сфера дизайна как элементы фармацевтической разработки лекарственного препарата в праве ЕАЭС», ЕЭК) в своем докладе осветил и вопросы трансфера технологии. Докладчик отметил, что должны быть определены все факторы, влияющие на технологический процесс и качество ЛС для последующей их корректировки и снижения влияния возможных расхожде-

[4] Technology transfer: Analytical Methods, Active Pharmaceutical Ingredients, Dosage Forms // ISPE Good Practice Guide. http://www.fptl.ru/biblioteka/transfer/ISPE_Technology-transfer_2003.pdf (дата обращения 08.2024).

[5] WHO guidelines on transfer of technology in pharmaceutical manufacturing // World Health Organization. http://www.fptl.ru/biblioteka/transfer/rukovodstvoVOZ-po-transferu-tehnologii.pdf (дата обращения 08.2024).

[6] Рекомендация Коллегии ЕЭК № 11 «О руководстве по трансферу технологий и (или) аналитических методик при производстве лекарственных средств» от 08.06.21.

[7] ОФС 1.1.0030 Перенос (трансфер) аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. 15-е изд., Москва: Минздрав России, 2023. https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/perenos-transfer-analiticheskikh-metodik/ (дата обращения 08.2024).

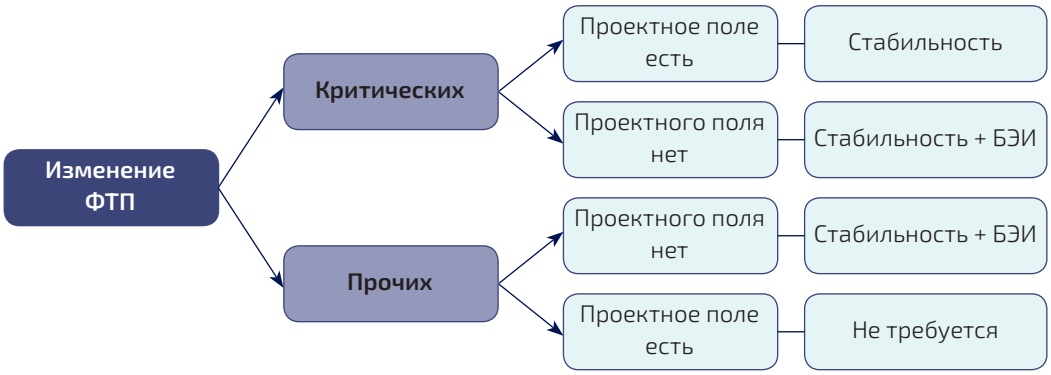


Рис. 3. Использование проектного поля при изменении физико-технических показателей (ФТП) лекарственного средства.
Примечание. БЭИ — исследование биоэквивалентности

ний. Для выявленных расхождений требуется определение их критичности для ЛС, а также условий для гарантии эквивалентного качества ЛС, полученных на разных производственных площадках. При переносе технологии с одной производственной площадки на другую крайне полезно наличие проектного поля, которое позволяет сократить объем работ по доказательству эквивалентности качества полученных серий (рис. 3).

Главные задачи опытно-промышленного этапа — отработка технологического процесса, выбор оптимальных его параметров и масштабирование. На этом этапе разработчик получает дополнительные знания технологического процесса производства ЛП, здесь может возникнуть необходимость корректировки как состава ЛП, так и технологии, что обусловлено различиями между оборудованием исследовательской лаборатории и производства. Опытно-промышленный этап позволяет снизить суммарные затраты времени и финансово-материальных средств на цикл от исследования до промышленного производства (Аладышева Ж.И. и соавт., 2019).

На опытно-промышленных сериях препарата начинаются исследования по валидации процесса его производства. Следует отметить, что размер опытно-промышленной серии должен соответствовать как минимум 10% от размера серии промышленного масштаба (то есть коэффициент масштабирования должен быть не более 10). Для твердых пероральных лекарственных форм размер опытно-промышленной серии, как правило, должен составлять не менее 10% от максимального размера серии промышленного масштаба, или 100 000 единиц в зависимости от того, какое количество больше.

Серии препарата, полученные в ходе опытно-промышленного этапа ФР, используют для проведения доклинических и клинических исследований.

Александр Геннадьевич Солодовников («Документы фармацевтической разработки в составе пакета документов на РКИ», ООО «Статэндокс») подчеркнул, что в регистрационных досье часто не предоставлено полное описание ФР. Это ус-

ложняет подтверждение соответствия проведенных доклинических и клинических исследований той версии препарата, которую подают на регистрацию. Основные причины — несоответствие состава и свойств препаратов опытной и производственной серий, недостаточная прослеживаемость изменений в составе ЛП, а также отсутствие контроля за источником субстанции или вспомогательных веществ в ходе разработки. Автор также обсудил изменения в Федеральном законе № 61, вступающие в силу с 1 сентября 2024 г., касающиеся документов для получения разрешения на проведение клинических исследований. Важно учитывать Рекомендацию Коллегии ЕЭК № 49[8] при подготовке таких документов и информации.

По его мнению, введение этих норм имеет свои преимущества, включая систематизацию фармацевтической разработки, полную прозрачность и прослеживаемость изменений до уровня исследуемой серии препарата, а также четкое разделение обязанностей между отделами R&D, производственными площадками, клиническими и регистрационными подразделениями, что способствует высокой степени готовности регистрационного досье, особенно модуля 3 «Качество».

Однако существуют и недостатки: увеличение трудозатрат при подготовке клинического досье за счет привлечения дополнительных отделов и возможное увеличение числа заявок на внесение изменений в процессе клинического исследования, если происходят значимые изменения в составе или производстве исследуемого препарата или плацебо.

Значимой частью ДКИ и КИ являются исследования фармако/токсикокинетики и биоэквивалентности, затрагивающие вопросы всасывания, распределения, метаболизма и выведения действующих веществ и/или их метаболитов из организма лабораторных животных и человека. Неотъемлемые инструменты таких исследований — биоаналитические методики, предназначенные для определения концентрации действующего вещества в биологических жидкостях (матрицах), полученных по результатам токсикокинетических исследований и всех фаз клинических исследований[9]. В основу таких методик могут быть положены различные аналитические методы, прежде всего хроматографические с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ), масс-спектрометрическим (МС) и другими типами детектирования (Wada M. и соавт., 2008, Рейхарт Д.В., Чистяков Д.В., 2010, Медведев Ю.В. и соавт., 2013, Косман В.М. и соавт., 2020), а также методы связывания лиганда или полимерсвязывающие методы, например, с применением иммуноферментного анализа (ИФА) и др. (Карлина М.В. и соавт., 2016, Косман В.М. и соавт., 2021). Как и в случае аналитических методик, предназначенных для стандартизации ЛП, биоаналитические методики должны быть валидированы. В зависимости от назначения методики и метода, положенного в ее основу, процедура валидации может иметь отличия и особенности.

Понятия «валидация» и «процедура валидации аналитических и биоаналитических методик» внедрены в практику фармацевтических исследований в РФ

[8] Рекомендация Коллегии ЕЭК № 49 «О Руководстве по составлению документации по химическому и фармацевтическому качеству для исследуемых лекарственных средств, применяемых в клинических исследованиях» от 27.12.22.

[9] Решение Совета ЕЭК № 85 «Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» от 03.11.16.

в последние 20–25 лет. С одной стороны, к настоящему времени накоплен достаточный опыт проведения этих процедур. А с другой, возникло понимание их несовершенства, особенностей, противоречий, различного толкования регуляторных документов, которые также претерпели изменения за этот период как в РФ, так и за рубежом. Поэтому на смену первичной фазе ознакомления, освоения и практического применения валидации аналитических и биоаналитических методик приходит новый этап, стали актуальны обмен опытом и мнениями, поиск «общего знаменателя», совершенствование регуляторной базы, единое понимание объема и порядка проведения валидационных процедур и наполнения отчетной документации.

Александр Андреевич Агабалаев («Особенности валидации ВЭЖХ-методик количественного определения», УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» Республики Беларусь) подробно рассказал об особенностях валидации биоаналитических методик, основанных на применении метода ВЭЖХ с учетом отечественных и зарубежных регуляторных документов[10]. Автор прокомментировал свое видение процедуры выполнения валидационных испытаний по параметрам, необходимым для подтверждения приемлемости и надежности биоаналитической методики: селективность, нижний предел количественного определения, функция отклика и аналитический диапазон (воспроизводимость параметров градуировочной кривой), правильность, прецизионность, влияние матрицы (эффекты матрицы, полнота элюирования), стабильность анализируемых веществ в биологических образцах и стабильность анализируемого вещества/веществ и внутреннего стандарта при хранении, в рабочих растворах, извлечениях в течение всего периода хранения и пробоподготовки. Несмотря на схожие термины и процедуры, следует подчеркнуть необходимость понимания отличий в объеме и порядке валидации аналитических методик стандартизации ЛП (в том числе в зависимости от их назначения — оценка подлинности, содержания примесей, количественного определения по различным показателям — примеси, тест «Растворение», количественное определение[11] от биоаналитических методик, всегда предназначенных для количественного определения целевых аналитов в биологической матрице)[12].

Айыына Григорьевна Никифорова («Частичная валидация биоаналитических методик. Зачем и когда ее делать?», ООО «Экзактэ Лабс») представила понимание алгоритма и объема валидационных испытаний, необходимых при частичной ва-

---

[10] Решение Совета ЕЭК № 85 «Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» от 03.11.16.

ICH M10 on bioanalytical method validation — Scientific guideline. https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline (дата обращения 08.2024).

[11] Решение Коллегии ЕЭК № 113 «Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств» от 17.07.18.

ОФС. 1.1.0012 «Валидация аналитических методик» // Государственная фармакопея Российской Федерации. 15-е изд. Москва: Минздрав РФ, 2023. https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/validatsiya-analiticheskikh-metodik/ (дата обращения 08.2024).

[12] Решение Совета ЕЭК № 85 «Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» от 03.11.16.

ICH M10 on bioanalytical method validation — Scientific guideline. https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline (дата обращения 08.2024).

лидации биоаналитических методик. Полная валидация, по мнению автора, необходима в следующих случаях:

- изменение матрицы, антикоагулянта;
- методика с применением метода ВЭЖХ-МС/МС для данного аналита будет разработана и применена в конкретной лаборатории впервые;
- добавление других аналитов (дополнительных Q1/Q3-переходов) в уже существующую методику с целью их количественного определения;
- изменение концентрационного диапазона в том случае, если новый диапазон концентраций выходит за пределы предыдущего валидированного диапазона.

Потребность в частичной валидации возникает при:

- изменении методики (изменения в способе детекции: МС/МС/УФ, ВЭЖХ условий и др.);
- замене деталей, комплектации аналитического оборудования;
- анализ с помощью валидированной методики не проводили более 2 мес;
- изменении в процессе пробоподготовки;
- изменениях, связанных с использованием переноса метода на другое оборудование или версии программы (QTRAP 5500–Triple Quad 4500 и др.).

Согласно рекомендациям автора, частичная валидация в самом простом случае может быть выполнена в объеме одного валидационного цикла, включающего бланк-пробы, холостые пробы, калибровочные стандарты, образцы контроля качества в необходимом количестве повторностей и позволяющего провести испытания по параметрам: селективность (специфичность), нижний предел количественного определения (НПКО), калибровочный диапазон и линейность, правильность и прецизионность (внутри цикла), матричный эффект, извлечение, перенос пробы. Частичная валидация при повторном обращении к тому же аналиту (как минимум в рамках той же лаборатории) предположительно позволяет сократить затраты временных и материальных ресурсов при сохранении высокого качества и достоверности получаемых аналитических данных. Вопросы частичной валидации составляют основу жизненного цикла методики (чуть более конкретно этот термин в настоящее время определен для аналитических методик[13], но не для биоаналитических, что, вероятно, может являться предметом дальнейших обсуждений).

Игорь Александрович Валуев («Валидация методик определения иммуногенности терапевтических белков: предел исключения и статистические выбросы», ООО «Мабскейл») представил сведения об биоаналитических методиках, предназначенных для оценки иммуногенности. Особенности экспериментов по оценке иммуногенности и необычное назначение (определение иммунного отклика организма на введение исследуемых объектов преимущественно белковой и пептидной природы) этой группы биоаналитических методик обусловливают отличия в необходимых для них валидационных параметрах и процедурах, в частности, определения предела исключения (cut off или cut point). Предел исключения (пороговое значение или точка отсечения анализа) — значение, относительно которого измеренный сигнал в образце определяют как «положительный» или «отрицательный».

[13] ICH Q14 Analytical procedure development. https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q14_Document_Step2_Guideline_2022_0324.pdf (дата обращения 08.2024).

Для определения предела исключения необходим анализ образцов от сравнительно большого числа субъектов (не менее 25 в ДКИ, не менее 50 в КИ) до первого контакта с исследуемым ЛС в ходе двух этапов исследования: скринингового (в ходе которого образцы анализируют без дополнительной обработки ЛС) и подтверждающего (когда образцы анализируют с добавлением ингибирующих концентраций ЛС). Автор продемонстрировал процедуру выявления, оценки и исключения аналитических (отражают ошибки/отклонения, допущенные при выполнении анализа) и биологических (отображают биологическое разнообразие популяции, потенциальное наличие антител к препарату и/или неспецифических реакций у конкретного индивидуума в выборке) выбросов на примере двух массивов данных, сопоставил возможные алгоритмы статистической обработки, получаемые в итоге заключения, и предложил оптимальный вариант, который может быть применен в практической работе. Более подробно в работе коллектива авторов (Никофорова М.А. и соавт., 2024) представлены вопросы разработки и валидации методики на основе функционального клеточного теста для определения нейтрализующих антител к адалимумабу в сыворотке крови человека.

К биологическим ЛП относят иммунологические (иммунобиологические), биотехнологические, ЛП, полученные из плазмы человека, препараты пробиотиков (эубиотиков), бактериофагов, высокотехнологические лекарственные средства, а также лекарственные препараты, содержащие АФС нерекомбинантного происхождения, произведенные или выделенные из биологических источников (тканей, жидкостей и органов человека, сырья животного происхождения, микроорганизмов или продуктов их жизнедеятельности)[14]. Разнообразие источников и свойств биологических ЛП обусловливает особенности и сложности как их создания, так и аналитического сопровождения на разных этапах жизненного цикла.

Екатерина Сергеевна Пепелышева («Ключевые аспекты и опыт валидации методик для оценки фармакокинетики и иммуногенности биологических лекарственных средств», АО «БИОКАД») продолжила тему, поделившись опытом валидации биоаналитических методик, предназначенных для оценки фармакокинетики и иммуногенности биологических ЛС. Автор отметила различия и сходства в валидационных параметрах биоаналитических методик для оценки фармакокинетики и иммуногенности (табл. 3), их трактовке и рассказала о практическом опыте валидации и применения биоаналитических методик в исследованиях оценки иммуногенности.

Игорь Евгеньевич Шохин («Исследование фармакокинетики инсулинов и их аналогов: успешные кейсы», Центр фармацевтической аналитики) сообщил об особенностях, проблемах и решениях, возникших при изучении фармакокинетики препаратов такой важной с фармакологической и сложной с аналитической точки зрения группы препаратов, как инсулины и их аналоги. Автор особо подчеркнул, что аналитические работы с объектами этой группы следует начинать задолго до утверждения протокола КИ, поскольку их анализ в биологических матрицах обычно основан на применении ИФА, для которого первым этапом является проверка работоспособности наборов (в ряде случаев) нескольких производителей, выбор оптимально-

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

Таблица 3

Валидацинные параметры биоаналитических методик для оценки фармакокинетики и иммуногенности

Методика для оценки фармакокинетики биологических лекарственных средств	Методика для оценки иммуногенности биологических лекарственных средств
Калибровочная кривая	Определение пороговой точки Cut Point скринингового и подтверждающего анализа
Чувствительность (нижний предел количественного определения)	
Селективность	
Специфичность	
Прецизионность (сходимость)	
Правильность	
Стабильность	
Параллелизм	Проверка пригодности системы
Линейность разведения	—

го (с учетом возможности и длительности поставки в РФ в современных условиях) и только затем валидация биоаналитической методики. Эта часть работы может оказаться наиболее затратной как по финансовым, так и по временным ресурсам. Однако тщательное ее планирование и выполнение являются залогом последующего корректного проведения аналитического этапа исследований биоэквивалентности, что повышает вероятность успешного выполнения всего КИ в целом. Ключевые результаты схожей работы в отношении синтетического аналога инсулина лираглутида представлены в публикации (Аметов А.С. и соавт., 2023).

Тимофей Николаевич Комаров («Аналитические особенности фармакокинетических исследований агонистов GLP-1», Центр фармацевтической аналитики) продолжил тему сложности создания и применения биоаналитических методик для оценки молекул полимерной (пептидной) структуры. Агонисты рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1, GLP-1) представляют собой класс сахарпонижающих препаратов, разрабатываемых в течение последних 15 лет. ГПП-1 — это пептид, синтезируемый в желудочно-кишечном тракте человека, который вносит значимый вклад в контроль постпрандиальной гликемии, стимулируя глюкозозависимую секрецию инсулина (Галстян Г.Р. и соавт., 2017). Агонисты рецепторов имеют близкую химическую природу, для их анализа в биологических матрицах можно использовать доступные коммерческие наборы реагентов с применением метода ИФА. Однако на практике была выявлена высокая вариабельность результатов при использовании наборов различных производителей, разных серий одного производителя и др., что побудило авторов отказаться от метода ИФА в пользу ВЭЖХ-МС/МС.

Андрей Михайлович Львов («Опыт разработки тест-систем для оценки фармакокинетики препаратов моноклональных антител», АО «БИОКАД») коснулся вопросов

создания аналитической процедуры для оценки препаратов моноклональных антител (МАТ) в биоматериале, начиная со стадии разработки самой тест-системы. При отсутствии на рынке доступного коммерческого набора реагентов (тест-системы), что ожидаемо для оригинальных препаратов группы МАТ, перед разработчиком ЛП встает дополнительная аналитическая задача, без решения которой невозможно проведение исследований (в частности, фармакокинетики), необходимых для регистрации создаваемого ЛП. Цель разработки биоаналитической методики состоит в определении дизайна, условий работы, ограничений и готовности методики к валидации. Разработка методики включает выбор процедур и условий, связанных с количественным определением аналита. На начальном этапе авторы сформулировали критерии приемлемости будущей методики:

- оптическая плотность калибровочного стандарта:
  — с наибольшей концентрацией аналита более 0,8;
  — не содержащего аналит (фон), менее 0,2;
- калибровочная кривая описывается с помощью логарифмической логистической модели с пятью параметрами.

В процессе работы апробировали применение в составе тест-системы ряда доступных антител [антитело кролика к IgG человека, конъюгированному с HRP (Fab-spec), антитело кролика к препарату, конъюгированному с биотином + стрептавидином, конъюгированное с HRP, антитело кролика к препарату, конъюгированному с дигоксигенином + антителом кролика к дигоксигенину, конъюгированному с HRP], вариантов конъюгатов для детекции, посадки стрептавидина и антитела к препарату, выбрав оптимальный итоговый вариант детекции через стрептавидин и HRP.

В условиях изменений рынка, логистических цепочек поставок оборудования, реагентов, материалов, необходимых для выполнения исследований, обслуживания аналитических приборов на смену привычным маркам (например, европейских и американских производителей) приходят новые бренды.

Одними из довольно популярных и перспективных для создания ЛП, но сложных с аналитической точки зрения особенно для анализа в биологических матрицах, являются белки и пептиды.

Надежда Сергеевна Юдина («Валидация биоаналитических методик определения белков методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией высокого разрешения», ФГБУ ГНИИИ ВМ МО России) отметила, что методики измерения концентрации белков в пробах крови необходимы в случае:

- применения иммунотоксинов для терапии злокачественных опухолей;
- определения биомаркеров в крови для диагностики заболеваний;
- контроля дозы препаратов на основе белков.

Наиболее точными и чувствительными являются методы ИФА и ВЭЖХ-МС/МС, а ключевые проблемы методик измерений низкоуровневых концентраций белков с применением специфических антител связаны с вероятностью кросс-реактивных взаимодействий, влиянием матрицы и невысокой точностью определения, обусловленной в том числе вариативностью степени извлечения аналита на разных уровнях его концентраций.

Полина Константиновна Карнакова («Особенности разработки методик определения производных малоновой кислоты в плазме крови человека для проведения

исследований фармакокинетики», Центр фармацевтической аналитики) представила опыт создания и применения методик анализа этмабена и малобена методом ВЭЖХ-МС/МС для проведения ДКИ и 1-й фазы КИ. Подробно материалы исследования представлены в публикации (Карнакова П.К. и соавт., 2024). Результаты способствовали завершению исследований, необходимых для создания, регистрационных действий и планируемому выходу на рынок отечественных ЛП с антиишемическим и антиоксидантным действием.

Ольга Александровна Арчакова («Биоаналитические исследования лекарственных препаратов: подходы к решению спорных вопросов со стороны лаборатории», Центр фармацевтической аналитики) затронула вопросы обеспечения качества аналитического этапа исследований биоэквивалентности, сообщила о трудностях, возникающих при взаимодействии с заказчиком исследований (разработчиком ЛП), а также о спорных моментах в запросах от регулятора, рассматривающего отчетную документацию в составе регистрационного досье.

Вопросы планирования исследований с точки зрения полноценности и корректности последующего статистического анализа также важны для создания качественных ЛП. Для традиционного (неадаптивного) КИ с фиксированным размером выборки на стадии планирования должен быть сделан ряд предположений, определяющих его дизайн [например, целевая популяция пациентов, ожидаемый размер эффекта (клинически значимые различия, вариабельность, доля ответчиков), зависимость доза—эффект, доля досрочно выбывших пациентов и др.]. Очевидно, что успех такого исследования во многом зависит от точности сделанных предположений. Более гибкий адаптивный дизайн позволяет проводить запланированные модификации на основе наблюдаемых и накапливаемых в исследовании данных, что может помочь скомпенсировать неопределенность, неизбежную на стадии планирования, и повысить шансы исследования на успех. Применение адаптивного дизайна в КИ должно происходить с особым вниманием, поскольку методологические ошибки адаптации могут привести к невозможности интерпретировать результаты (Бондарева И.Б., 2017). В исследованиях биоэквивалентности при отсутствии данных о вариабельности фармакокинетических параметров (коэффициент внутрииндивидуальной вариабельности — CV_{intra}) можно применить адаптивный дизайн (Решение Совета ЕЭК № 85 от 03.11.16, Еременко Н.Н., 2022, Еременко Н.Н., 2023), предполагающий модификации в ходе исследования размера выборки добровольцев.

Практическим примерам применения данного подхода был посвящен доклад Натальи Сергеевны Багаевой («Опыт применения адаптивного подхода в исследованиях биоэквивалентности», Центр фармацевтической аналитики). Подробно материалы исследования такого рода представлены в статье (Арефьева А.Н. и соавт., 2023).

Промышленный этап ФР и QbD

На промышленном этапе ФР производят коммерческие промышленные серии ЛП с заданными параметрами качества. Здесь же осуществляют хранение и реализацию произведенных ЛС в соответствии с требованиями нормативной документации. К моменту выпуска коммерческих серий уже должны быть выбраны КПК и КПП,

определено проектное поле, проведена оценка рисков и сформулирована стратегия контроля, которая позволит обеспечить стабильное производство ЛП.

Стратегия контроля — спланированный комплекс средств контроля, составленный на основании текущего понимания препарата и процесса, который обеспечивает работу процесса и качество препарата. Она включает в себя контроль показателей входных материалов (например, АФС, ВВ, первичной упаковки), контроль единичных технологических операций, влияющих на качество препарата, внутрипроизводственные испытания или выпускающие испытания в реальном времени вместо испытаний конечного продукта (например, измерение и контроль КПК во время обработки). Из вышесказанного следует, что стратегия контроля должна быть сформирована с учетом всех знаний о препарате, полученных на лабораторном и опытно-промышленном этапе.

На данном этапе проводят полные валидационные исследования, для каждого ЛП в соответствии с разработанным планом валидации процесса. План валидации процесса должен быть включен в регистрационное досье, в которое входят описание производственного процесса, перечня выполняемых испытаний и критериев приемлемости, дополнительных элементов контроля в процессе, а также данные, которые должны быть получены.

На этом этапе ФР может быть сформирован реестр факторов риска и определены риски при производстве ЛП, произведены качественный анализ последствий реализации рисков и оценка их вероятностей, установлена степень влияния рисков на качество получаемой продукции, определены рекомендации по управлению рисками в процессе производства ЛП (Камаева С.С. и соавт., 2023).

В ряде случаев на данном этапе могут стать актуальны вопросы технологического трансфера, поскольку решение этой задачи может потребоваться не только при переходе от лабораторного этапа ФР к опытно-промышленному — это наиболее частый вариант (Сидоров К.О. и соавт., 2024), но и при переносе производства на другую производственную площадку или расширении производства и увеличении числа выпускающих площадок.

Необходимо отметить, что работа над качеством производимого ЛП в рамках применения QbD должна проводиться на протяжении всего его жизненного цикла. Требуется контролировать производственный процесс, чтобы убедиться в главном — качество ЛП от серии к серии остается стабильным. Изменения процессов и материалов в рамках проектного поля не потребуют внесения изменений в производственный процесс, а на значимые отклонения от проектного поля QbD позволит быстро и эффективно реагировать, минимизируя последствия для качества, производимого ЛП (Mane S.S. и соавт., 2022).

Заключение

Таким образом, внедрение подхода проектирования качества (QbD) к ФР на всех ее этапах обеспечит глубокое понимание технологического процесса, влияния свойств АФС и ВВ на ЛП и поможет определить возможные источники вариабельности качества препарата. Понимание источников вариабельности и критичности

их влияния на качество ЛС в свою очередь обеспечивает возможность перенести средства контроля на подготовительные этапы и минимизировать потребность в испытаниях конечного продукта. Понимание препарата и технологического процесса в сочетании с управлением рисками для качества позволяют контролировать процесс производства ЛП и дают возможность вовремя скомпенсировать вариабельность (исходного сырья, условий проведения технологической операции и т.д.) для обеспечения надлежащего качества ЛП.

В отношении аналитического сопровождения необходимо отметить, что объем и масштабность валидационных процедур должны быть сопряжены с этапом создания ЛП, назначением методики, особенностями природы АФС, а глубина проработки нарастать в ходе его жизненного цикла с соблюдением принципа необходимости и достаточности.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Divya M., Veeresh Babu P. QbD: A New Horizon in Pharmaceutical Product Development // Ijppr. Human. 2023. Vol. 26. N. 4. P. 286–301.
2. Mane S.S., Kasture S.S., Suryawanshi P. Y. et al. Emerging Trends and Novel Approaches of Quality by Design // International Journal of Creative Research Thoughts (IJCRT). 2022. Vol. 10. N. 4. P. 444–454.
3. Mohurle S.M., Asnani A.J., Chaple D. et al. Quality by Design (QbD): An Emerging Trend in Improving Quality & Development of Pharmaceuticals // Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences. 2019. Vol. 5. N. 12. P. 1132–1138. DOI: 10.36348/sjmps.2019.v05i12.019.
4. Namjoshi S., Dabbaghi M., Roberts M.S. et al. Quality by Design: Development of the Quality Target Product Profile (QTPP) for Semisolid Topical Products // Pharmaceutics. 2020. Vol. 12. N. 3. P. 287. DOI: 10.3390/pharmaceutics12030287.
5. Subbotina T.N., Tryakin D.S. Analysis of the Russian pharmaceutical market: the impact of the geopolitical crisis and sanctions measures // International Journal of Humanities and Natural Sciences. 2023. Vol. 12–14. N. 87. P. 211–214. DOI: 10.24412/2500-1000-2023-12-4-211-214.
6. Wada M., Alkhalil S.M., Nakashima K. Current HPLC methods for determination of medicaments in formulations and biological samples // Jordan journal of Pharmaceutical Sciences. 2008. Vol. 1. N. 1. P. 1–27.
7. Аладышева Ж.И., Береговых В.В., Демина Н.Б. и др. Промышленная фармация. Путь создания продукта / А.Л. Хохлова, Н.В. Пятигорской. Москва. 2019. 394 с.
8. Арефьева А.Н., Доротенко А.Р., Носков С. М. и др. Сравнительное адаптивное исследование фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов GP30121 и Цераксон® с использованием коррекции на уровень эндогенного аналита // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2023. № 12(3). С. 218–227. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-3-218-227.
9. Аметов А.С., Шохин И.Е., Рогожина Е.А. и др. Российская разработка для лекарственной независимости в эндокринологии: сравнительный анализ биоэквивалентности, безопасности и переносимости первого отечественного лираглу-

тида // Фармация и фармакология. 2023. № 11(3). С. 255–276. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-3-255-276.
10. Береговых В.В., Спицкий О.Р. Применение подхода, основанного на рисках, для определения критических факторов при переносе технологии в производстве лекарственных средств // Вестник Российской академии медицинских наук. 2014. № 9–10. С. 117–122. DOI: 10.15690/vramn.v69i9-10.1140.
11. Бондарева И.Б. Адаптивный дизайн в клинических исследованиях: преимущества и риски // Качественная клиническая практика. 2017. № 3. С. 23–34.
12. Галстян Г.Р., Каратаева Е.А., Юдович Е.А. Эволюция агонистов рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 в терапии сахарного диабета 2 типа // Сахарный диабет. 2017. № 20(4). С. 286–298. DOI: 10.14341/DM8804.
13. Гильдеева Г.Н., Белостоцкий А.В. Концепция QUALITY-BY-DESIGN как ключевой элемент в обеспечении качества лекарственных препаратов // Ремедиум. 2017. № 3. С. 54–58. DOI: 10.21518/1561-5936-2017-3-54-58.
14. Демина Н.Б. Фармацевтическая разработка: обзор оборудования для лабораторной разработки и наработки опытных партий твердых лекарственных форм // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1. С. 38–46.
15. Демченко Д.В., Ампилогова И.Н., Макарова М.Н. и др. Опыт организации работы лаборатории по фармразработке лекарственных средств. В книге: Гармонизация подходов к фармацевтической разработке. Сборник тезисов III Международной научно-практической конференции. Российский университет дружбы народов. Москва, 2020. С. 76–79.
16. Еременко Н.Н. Адаптивный дизайн в исследованиях биоэквивалентности: ошибки при планировании. Регуляторная практика и регистрация лекарственных средств (РегЛек-2022): Материалы научно-практической конференции, Москва, 16–18 ноября 2022 г. Москва: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2023. С. 20–21.
17. Еременко Н.Н., Горячев Д.В. Выбор адаптивного дизайна в исследованиях биоэквивалентности. Критерии принятия решений // Химико-фармацевтический журнал. 2023. Т. 57. № 7. С. 47–54. DOI: 10.30906/0023-1134-2023-57-7-47-54.
18. Камаева С.С., Меркурьева Г.Ю., Умарова Н.Н. Риск-ориентированный подход при анализе качества таблеток кислоты ацетилсалициловой // Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. 2023. № 3. С. 18–31. DOI: 10.24412/2312-2935-2023-3-18-31.
19. Карлина М.В., Косман В.М., Абрамович Р.А. и др. Риск-ориентированный подход к созданию лекарственного препарата. Консультант GLP-Planet 2023. Мнение фармацевтической отрасли. Санкт-Петербург: Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ», 2023. DOI: 10.57034/978-5-6048955-2-8-s2.
20. Карлина М.В., Фаустова Н.М., Пожарицкая О.Н., Косман В.М., Шиков А.Н., Макаров В.Г. Определение дарбопоэтина альфа в плазме крови кроликов методом иммуноферментного метода // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 4(17). С. 204–209.
21. Карнакова П.К., Комаров Т.Н., Арчакова О.А. и др. Разработка и валидация методики количественного определения этмабена в плазме крови человека мето-

дом ВЭЖХ-МС/МС // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2024. № 13(1). С. 257–271. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-1-1752.
22. Косман В.М., Карлина М.В., Макарова М.Н. Опыт разработки биоаналитических методик методом ВЭЖХ с УФ-детектированием // Фармация. 2020. Т. 69. № 3. С. 23–35. DOI: https://doi.org/10.29296/25419218-2020-03-04.
23. Косман В.М. Фаустова Н.М., Карлина М.В., Макаров В.Г. Подходы к изучению фармакокинетики природных лекарственных препаратов на основе оценки биологической активности (биомаркеров) // Ведомости Научного Центра экспертизы средств медицинского применения. 2021. № 11(1). С. 24–35. DOI: 10.30895/1991-2919-2021-11-1-24-35.
24. Медведев Ю.В., Раменская Г.В., Шохин И.Е., Ярушок Т.А. ВЭЖХ и СВЭЖХ как методы для определения лекарственных веществ в крови (обзор) // Химико-фармацевтич. журнал. 2013. № 47(4). С. 45–51.
25. Никифорова М.А., Валуев И.А., Петров А.В., Бекетов Е.Е., Шохин И.Е. Разработка и валидация методики на основе функционального клеточного теста для определения нейтрализующих антител к адалимумабу в сыворотке крови человека // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2024. № 13(1). С. 208–215. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-1-1632.
26. Рейхарт Д.В., Чистяков В.В. Анализ лекарственных средств при фармакокинетических исследованиях // Казанский мед. журнал. 2010. № 91(4). С. 532–536.
27. Самбукова Т.В., Овчинников Б.В., Ганапольский В.П. и др. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2017. Т. 15. № 2. С. 56–63. DOI: 10.17816/RCF15256-63.
28. Сидоров К.О., Кислов Г.Л., Ильинова Ю.Г. Применение технологического трансфера в биофармацевтической отрасли: условия и ограничения // Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. 2024. № 1. С. 114–127. DOI: 10.24412/2312-2935-2024-1-114-127.
29. Феофилова А.Е., Фотеева А.В., Ростова Н.Б. Современные концепции фармацевтической разработки в условиях перехода к единому регулированию сферы обращения лекарственных средств // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2020. № 9(4). С. 171–179. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-171-179.
30. Шигарова Л.В., Флисюк Е.В., Стрелкова А.В. Актуальные вопросы трансфера технологии лекарственных средств // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. 2023. № 3(41). С. 36–42.

ARRIVE в жизненном цикле лекарственного средства

https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-9-7-s3

М. А. Ковалева [1], О. А. Аверина [2], Н. С. Вахрушев [3], Е. В. Вербицкая [4], Т. Д. Власов [4], М. М. Галагудза [5], Л. С. Гузеватых [6], Г. Н. Енгалычева [7], Н. С. Ильинский [8], Д. М. Карачевцева [1], В. С. Попов [9], Е. Ю. Сорокина [10], И. М. Суханов [4], Р. Д. Сюбаев [7], Я. Г. Торопова [5]

[1] *АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,*
[2] *НИИ ФХБ имени А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова,*
[3] *АО «БИОКАД»,*
[4] *ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России,*
[5] *ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России,*
[6] *АО «Р-Фарм»,*
[7] *ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России,*
[8] *ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ,*
[9] *МГУ им. М. В. Ломоносова,*
[10] *ООО «Статэндокс»*

Воспроизводимость и трансляционность доклинических исследований до сих пор являются одной из обсуждаемых тем в научном сообществе. Во многом причиной возникновения таких дискуссий стала публикация статьи о невоспроизводимости результатов доклинических исследований препаратов для терапии рака. Анализ, проведенный сотрудниками компании Amgen, показал, что лишь 11% полученных научных результатов подтверждено впоследствии (Begley C.G., Ellis L.M., 2012). Это положило начало активной работе по сбору статистики, отражающей невоспроизводимость результатов исследований *in vivo* (Failure to Replicate, 2024, Leenaars C.H. C., Kouwenaar C., 2017). Публикуемые неоптимистические результаты таких исследований (Sun D., Gao W., 2022) и высказываемые альтернативные мнения заставляют задуматься, чем на самом деле является «кризис невоспроизводимости» — непреодолимым феноменом, навязанным понятием или проблемой, которую можно преодолеть или же существенно минимизировать? Описаны подходы к выявлению, а также качественной и количественной оценке причин возникновения такого кризиса. Одной из таких причин может быть избыточно оптимистичное представление данных результатов доклинических исследований в публикациях,

что приводит к резкому смещению выводов, а значит невозможности воспроизведения результатов. Анализ 2015 г., представленный BMJ, продемонстрировал, что в период с 1974 по 2014 г. относительная частота положительных слов (таких как «надежный», «новый», «инновационный» и «беспрецедентный») в аннотациях работ, размещенных в научной базе PubMed при описании биологических эффектов изучаемых веществ, увеличилась практически в 150 раз (Vinkers C.H., Tijdink J.K. и соавт., 2015). Данные результаты косвенно указывают, что исследователи могут отдавать предпочтение описанию определенных показателей, при этом полный контекст исследования, вероятно, оказывается искажен для читателя.

Определенная публикационная предвзятость, безусловно, является не единственной причиной «кризиса невоспроизводимости». По мнению Владимира Сергеевича Попова, заведующего лабораторией трансляционной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, более серьезным фактором кризиса является плохое понимание тех физиологических процессов, которые исследователи пытаются измерять у животных, о чем он рассказал в своем докладе «Трансляционные исследования: верный ответ на неверный вопрос». Трансляционная эффективность может быть обеспечена только фундаментальным пониманием физиологических процессов, которые наблюдают *in vivo*, и их связи с процессами, изучаемыми применительно к человеку. Это приводит к необходимости осознания значения термина «релевантный» вид лабораторного животного. Обычно таким принято считать вид, на котором хорошо воспроизводятся целевая патология, звенья патогенеза (соответствующие течению патологии у человека) или возможное измерение маркеров патологии, которые определяются у человека. Представленные подходы имеют ряд допущений и ограничений, наиболее простым и понятным является измерение у животных маркеров патологии, используемых в клинической практике. Сегодня в арсенале исследователя есть большое количество прецизионных экспериментальных методик для моделирования патологий, измерения отдельных показателей или определения состояний животного. При этом нет полного осознания, как полученные данные связаны с клиникой. Поэтому исследователь, работая в такой парадигме, не способен доказать или опровергнуть собственную гипотезу. В качестве примера можно привести генетически модифицированных мышей, накатных по гену, кодирующим muc2 (муцин-2). Муцин-2 — белок, который служит основой для синтеза протеогликана кишечной выстилки. В результате мутации у таких нокаутных мышей, созданных в 2002 в США для моделирования колоректального рака, практически отсутствует слизистый слой в кишечнике. Предполагалось, что отсутствие муцинового слоя будет приводить к развитию хронического воспаления, которое в конечном счете будет малигнизироваться. Согласно данным литературы, мышей muc2-КО также используют для моделирования язвенного колита (Kang Y., Park H. и соавт., 2022). При проведении на базе МГУ им. М.В. Ломоносова собственных исследований показано, что к 8-й неделе жизни у мышей muc2$^-$ КО по сравнению с животными «дикого типа» наблюдаются снижение прироста массы тела, ректальный пролапс и кровотечения, однако при гистологическом анализе не выявлено признаков воспаления — абсцессов, эрозий эпителиального слоя и инфильтратов. Системные маркеры воспаления (например, TNF-α — фактор некроза опухолей) также не показали существенной разницы между мышами muc2$^-$ КО и животными «дикого типа».

Интересно, что перитонеальные макрофаги М2-типа (противовоспалительные) преобладали у мышей-нокаутов. В соответствии с данными (Velcich A., Yang W. и соавт., 2002) у 20% мышей muc2-KO в возрасте 6 мес выявляются аденокарциномы, и 70% у годовалых мышей. В ходе исследований, проведенных на таких мышах, автором у 18-месячных животных аденокарцином установлено не было. Полученные результаты позволили выдвинуть предположение, что особенности условий содержания (в соответствии с генотипом, когда гетеро- и гомозиготные особи содержатся раздельно, или с родством, а генотип не учитывается) могут стать дополнительным фактором, инициирующим канцерогенез, поскольку в группах, сформированных с учетом генотипа, возникает иерархия доминирования, приводящая к хроническому стрессу из-за внутригрупповой агрессии.

Другим фактором, приводящим к «кризису невоспроизводимости», является подход, при котором исследователи для проведения экспериментов используют избыточно гомогенные выборки. При этом в настоящее время есть понимание того, что повышение степени гетерогенности выборки, то есть возможность включения в исследование животных разного пола, возраста, линии и т.д., позволит в большей степени учитывать имеющуюся биологическую вариабельность при последующем клиническом исследовании. Правомочность такого подхода поддержал заведующий кафедрой патофизиологии с курсом клинической патофизиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России) Власов Тимур Дмитриевич в своем докладе «Исследования на крысах: традиции или необходимость?». Свое мнение он обосновал тем, что в реальной клинической практике нередко формирование исследуемых когорт сопровождается включением коморбидных пациентов, пациентов разного возраста и степени тяжести заболевания. В первую очередь это касается острых состояний.

Среди других возможных причин «кризиса невоспроизводимости» и низкой трансляционности данных доклинических исследований выделяют неудовлетворительный дизайн исследования, выбор нерелевантных тест-систем и отсутствие их детального описания, низкую прецизионность экспериментальных моделей, отсутствие глубокого понимания статистических методов, используемых для анализа данных, ошибки при выполнении процедур и манипуляций, низкое качество изложения результатов исследований в итоговых отчетах.

Заместитель директора по научной работе Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России Яна Геннадьевна Торопова в докладе «Руководство PREPARE как инструмент для реализации принципов ARRIVE» в качестве основных компонентов, способствующих повышению качества исследований, выделила релевантность (выбор тест-системы и экспериментальной модели), надежность или достоверность (исключение систематических ошибок и использование стандартных методов оценок), воспроизводимость (качественная практика документирования, обеспечивающая прозрачность и полноту отчетности для воспроизведения исследования, необходимость учета биологической изменчивости и т.д.). Безусловно, в исследованиях *in vivo* важно учитывать биологическую

изменчивость тест-системы, поскольку она определяет изменение ответа лабораторного животного на экспериментальное воздействие при наличии различных факторов. Часть таких факторов является неконтролируемыми, но есть те, на которые исследователи могут воздействовать, стандартизируя их. С целью повышения трансляционности исследований предлагается проводить многоцентровые доклинические исследования, хотя они сложно реализуемы из-за трудностей в организации самого исследования и подготовки отчетности. Альтернативой может стать проведение многоцентрового исследования в рамках одной лаборатории (испытательного центра), когда одно исследование разделяется на несколько мини-исследований, которые проводятся в разные периоды времени, при этом не происходит увеличение количества используемых лабораторных животных. Такой подход вносит контролируемый уровень гетерогенности и повышает репрезентативность. Приведенные исследования показали, что мультицентровой подход внутри одной лаборатории (испытательного центра) может повышать воспроизводимость (von Kortzfleisch V.T., Karp N. A. и соавт., 2020). Другим механизмом повышения воспроизводимости исследований является ARRIVE 2.0, основной задачей которого является обеспечение полноты и прозрачности информации, представленной в научных публикациях. Документом, дополняющим ARRIVE 2.0 (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) и позволяющим качественно планировать исследования, является PREPARE (Planning Research and Experimental Procedures on Animals: Recommendations for Excellence), который охватывает три сферы:

1. Формулировка задач исследования.
2. Взаимодействие между исследователем и виварием.
3. Контроль качества компонентов исследования.

PREPARE может быть адаптирован для удовлетворения особых потребностей отдельных видов исследований, например полевых исследований, и стать основой для внедрения принципов ARRIVE в систему менеджмента качества.

В своем докладе «Опыт стандартизации экспериментальной модели SARS-CoV-2-инфекции на сирийских хомяках» заместитель начальника отдела ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ Никита Сергеевич Ильинский поделился личным опытом, рассказав о подходах к стандартизации экспериментальной модели SARS-CoV-2-инфекции. При анализе русскоязычной литературы установлено, что на сегодняшний день нет единого подхода к стандартизации экспериментальных моделей, в связи с чем за основу взяты подходы, описанные в ОФС 1.1.0012 «Валидация аналитических методов» и в статье С.В. Ходько (Ходько С.В., Макарова М.Н. и соавт., 2015). Для стандартизации модели SARS-CoV-2-инфекции использовали показатель — прецизионность, который представляет собой степень разброса значений между результатами (измерениями), полученными в одной и той же однородной выборке в предписанных методикой условиях. В исследовании прецизионность рассматривалась на двух уровнях:

1. Повторяемость (прецизионность внутри методики, сходимость) — прецизионность методики при выполнении повторных измерений в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории в ходе одного эксперимента в пределах короткого промежутка времени (один и тот же исполнитель, одно и то же оборудование и т.д.).

Таблица 1

Статистические характеристики количественной изменчивости биометрических показателей сирийских хомяков через 7 сут после заражения SARS-CoV-2

Параметр	Среднее значение			Стандартное отклонение			Коэффициент вариации, %		
	1*	2	3	1	2	3	1	2	3
Самцы									
Изменение массы тела относительно фона, %	6,6	6,4	7,1	1,1	1,2	1,1	16,7	19,7	15,5
Влагонасыщение легких, %	80,6	80,8	80,2	1,1	1,4	1,6	1,4	1,7	2,0
Массовый коэффициент правого легкого, усл. ед.	4,0	4,1	3,9	0,5	0,7	0,5	12,8	16,3	13,9
Самки									
Изменение массы тела относительно фона, %	4,5	4,1	4,2	0,9	0,8	0,8	**20,0**	**19,5**	**19,0**
Влагонасыщение легких, %	81,7	80,9	82,1	1,1	1,3	1,6	1,3	1,6	1,9
Массовый коэффициент правого легкого, усл. ед.	4,2	4,1	4,3	0,6	0,6	0,8	14,7	13,3	18,4

*Примечание. * — серия эксперимента, красным цветом выделены значения, которые характеризуют повторяемость, зеленым — внутрилабораторную прецизионность, жирным шрифтом — неудовлетворительные значения Cv.*

2. Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность — влияние вариации внутри лаборатории на результаты идентичных испытаний, выполненных в одной и той же серии отдельных экспериментов (разные не только сотрудники, но и оборудование, сезоны и т.д.).

Для стандартизации модели значение коэффициента вариации (*Cv*) должно быть менее 20%. Исследование выполнено на 36 самцах и 36 самках хомяков. Три эксперимента (12 самцов и 12 самок для каждого) проводили последовательно в течение 1 мес при соблюдении одинаковых условий, но разными группами исследователей. Стандартизацию выполняли по неспецифическим показателям — масса тела, массовые коэффициенты легких, влагонасыщение легких (табл. 1). На примере показателя «массовый коэффициент правого легкого» показано, что несмотря на участие разных исследователей, от исследования к исследованию не наблюдали статистически значимых отличий (значения выделены зеленым) у самок, при этом *Cv* был менее 20%. Внутри одной группы также исследована повторяемость (значения в табл. 1 выделены красным), установлено, что у самцов стандартное отклонение имело приемлемые границы, и *Cv* был менее 20%. У самок значение *Cv* было практически равным 20%, что еще раз подтверждает необходимость использовать самцов в данных исследованиях.

Для стандартизации экспериментальной модели могут быть использованы только те показатели, которые подлежат количественному определению. На примере макроскопической оценки степени повреждения легких показано, что патоморфологический анализ носит субъективный характер и результаты, получаемые разными специалистами, могут существенно отличаться.

Директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России Михаил Михайлович Галагудза в своем докладе «Критерии исключения при планировании эксперимента: кто, когда, какие, зачем и как?» рассмотрел критерии исключения как один из способов повышения воспроизводимости экспериментов. В STAIR 2 (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable, рекомендации Академического отраслевого круглого стола по терапии инсульта) впервые было охарактеризовано понятие критериев включения/исключения, которые направлены на улучшение качества доклинических исследований, предполагаемых методов лечения острого инсульта (Fisher M., Feuerstein G. и соавт., 2009). Важно отметить, что в принципах ARRIVE определена необходимость описания критериев включения и исключения при проведении эксперимента.

Адаптированные для доклинических исследований определения могут быть представлены следующим образом.

Критерии включения — ключевые параметры качества биологической тест-системы, соответствие которым обеспечивает повышение внутренней валидности эксперимента (пол, возраст, микробиологический и генетический статус и т.д.).

Критерии исключения применяются к особям (значениям), которые исходно соответствовали критериям включения, но до начала эксперимента или в ходе него продемонстрировали особенности, снижающие вероятность получения валидного результата.

Особи или значения, соответствующие критериям включения и оставшиеся после применения критериев исключения, обозначаются как удовлетворяющие **критериям соответствия**.

Критерии включения базируются на компонентах качества лабораторных животных, таких как охарактеризованный генотип, установленный микробиологический статус животных и стандартные условия содержания. Исследования, к которым применяются жесткие критерии, имеют ряд особенностей. С одной стороны, это приводит к получению однородной («рафинированной») выборки, низкой вариабельности конечной точки, надежному контролю конфаундеров[1], более высокой вероятности подтверждения гипотезы (внутренняя валидность увеличивается). С другой — возникает проблема — более низкая внешняя валидность, поскольку, как правило, уменьшается размер эффекта на выборке из «реальной» жизни, а значит становится труднее оценивать соотношение риск/польза. Возникают сложности с экстраполируемостью и воспроизводимостью. Критерии исключения следует применять на следующих этапах:

1. До начала эксперимента — уменьшение систематической ошибки отбора (общие и специфические). Такая ситуация может возникнуть в случае выявления

[1] В данном контексте под конфаундером следует понимать фактор, который не поддается контролю со стороны исследователя и может приводить к искажению полученного результата.

заболевания животного, после того как оно уже было включено в исследование, но до начала каких-либо манипуляций.
2. В ходе выполнения эксперимента (физиологические, морфологические, поведенческие, этические критерии т.д.).
3. При анализе результатов, в том числе при получении данных описательной статистики (выбросы).

На рис. 1 представлен пример того, как можно представлять данные об исключении животных в ходе исследования в отчете или статье. Важно отметить, что в эксперименте нужно не только фиксировать исключения, но и описывать причины их появления.

Исключение отдельных данных уже после завершения эксперимента с математической точки зрения определяется как выброс. В целом, под выбросом следует понимать индивидуальное значение параметра в выборке, далеко отстоящее от всех остальных. Выбросы могут сделать некорректными большинство статистических выводов, но они могут быть автоматически обнаружены с помощью специальных тестов и исключены на этапе анализа результатов эксперимента. Перед тем как определять выбросы, исследователь должен ответить «нет» на следующие вопросы:

1. Не было ли ошибки при вводе данных.
2. Не является ли выброс кодом отсутствующего значения.
3. Не было ли проблемы в этом конкретном эксперименте.
4. Может ли выброс быть реальным биологическим проявлением.
5. Возможно, это ненормальное распределение.

Существует 5 ошибок при работе с выбросами.

1. Попытка найти выбросы и удалить их из выборки, подчиняющейся ненормальному распределению (статистические критерии анализа выбросов касаются нормального распределения).
2. Неиспользование методов робастной статистики для обработки данных с выбросами (например, использование медианы, а не среднего значения).
3. Последовательное тестирование и исключение выбросов (обычно он один, но если несколько, нужны специальные тесты).
4. Исключение выбросов только в том случае, когда результат не соответствует ожидаемому.
5. Полное удаление информации о выбросах, в том числе из первичных данных.

Руководитель исследования несет ответственность за формирование и использование критериев исключения, которые всегда должны быть определены до начала исследования. Такой подход необходим для повышения внутренней валидности и воспроизводимости и, следовательно, для соблюдения принципов 3R. При определении критериев исключения руководитель исследования должен опираться на имеющиеся знания, опыт и здравый смысл.

Младший научный сотрудник АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» Дарья Михайловна Карачевцева в своем докладе «Внедрение элементов ARRIVE. Практические аспекты» рассказала о внедрении отдельных элементов ARRIVE 2.0 — ослепления (маскировки), определения размера выборки, критериев включения и исключения в повседневную практику организации на примере двух экспериментальных моделей — рев-

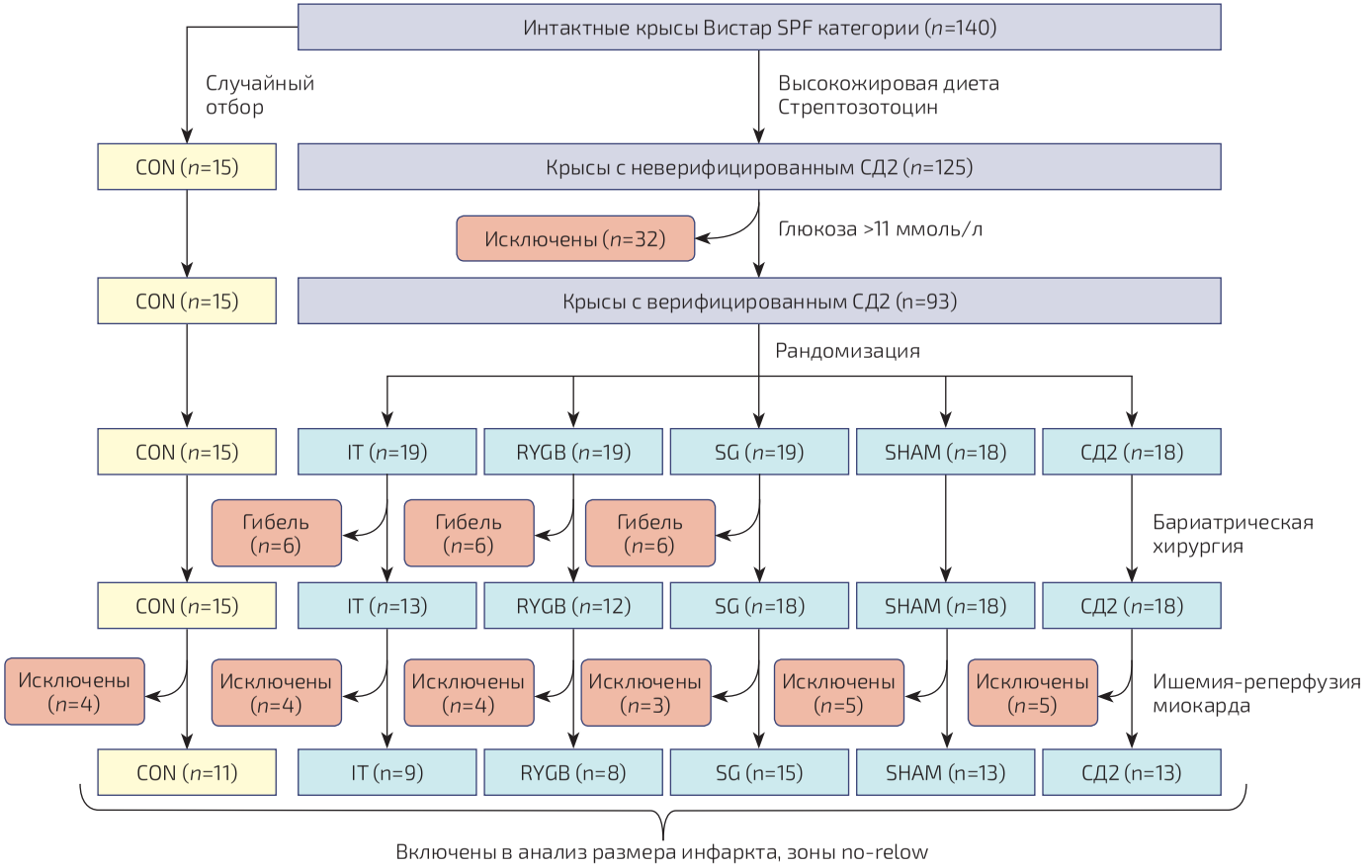


Рис. 1. Схема, показывающая точное количество животных в каждой экспериментальной группе на разных этапах исследования, а также количество исключенных/мертвых животных: CON — контроль; SHAM — ложная операция; IT — транспозиция подвздошной кишки; RYGB — желудочное шунтирование по Roux-en-Y; SG — рукавная гастрэктомия, СД2 — сахарный диабет 2 типа

матоидного артрита (длительное исследование — 24 дня) и CCl4-индуцированной патологии печени (краткосрочное исследование — 4 дня). Оба исследования выполнены на самцах и самках крыс Вистар. Автор акцентировала внимание слушателей на том, что каждое исследование, помимо оценки возможности внедрения принципов ARRIVE 2.0, имело научную цель — установить половые различия в развитии экспериментальной патологии. Для определения размера выборки могут быть использованы разные подходы. При моделировании экспериментального артрита использовали математический подход. Анализ мощности, определяющий размер выборки, проводили на основании данных значений концентрации интерлейкина-6 у животных контрольной и экспериментальной групп в ранее проведенных в испытательном центре исследованиях. Расчеты выполняли с использованием программного обеспечения Statistica 10.0. Установлено, что для получения статистически значимых различий между группами достаточно 7 животных, однако, принимая во внимание возможную смертность животных, руководитель исследования решил увеличить число животных в группе до 10. В исследовании CCl4-индуцированной патологии печени для расчета размера выборки использовали данные литературы, согласно которым число животных в группе составило 12. В соответствии с принципами ARRIVE 2.0 стоит описывать любые критерии, использованные для включения или исключения экспериментальных единиц во время эксперимента и при анализе данных, а также сообщить о любых животных, экспериментальных единицах или точках данных, не включенных в анализ. Дарья Михайловна сообщила, что обычно данную информацию вносили только в итоговый отчет о научно-исследовательской работе. В ходе проведения вышеописанных экспериментов критерии исключения лабораторных животных были охарактеризованы на этапе планирования, информация была включена в план исследования (табл. 2). Одного критерия в каждой экспериментальной патологии было достаточно для исключения лабораторного животного.

В доклиническом исследовании возможно полное или частичное ослепление, и конечно, выбор способа маскировки зависит в том числе от возможностей кон-

Таблица 2

Критерии исключения крыс из исследования

Модель ревматоидного артрита	Модель гепатотоксичности CCl4
Снижение массы тела крысы более чем на 20% относительно последней зафиксированной. Развитие некроза опытной конечности	Снижение массы тела более чем на 10–15% за 24–48 ч. Снижение температуры тела более чем на 10% от нормальной. Диарея или недержание мочи в течение 2 сут и дольше. Тяжелое обезвоживание. Значительная кровопотеря. Признаки серьезного повреждения органов и систем. Признаки боли по шкале гримас у грызунов

кретного испытательного центра — количества персонала, текущих процессов, материальных ресурсов и т.д. Оценив уже внедренную в работу испытательного центра схему частичного ослепления, было принято решение модифицировать ее. Вместо привычной системы обозначения групп и нумерации животных применена альтернативная (табл. 3), которая не отражала их принадлежность к группе, также были заменены коды групп.

Ослеплены были лаборанты-исследователи, ветеринары, а также специалисты, обеспечивающие проведение биохимического и гистологического исследований. Стоит отметить, что при моделировании ревматоидного артрита пораженная конечность отличалась от здоровой и визуально, лаборанты-исследователи могли определить принадлежность животного к группе патологии. В целом, Дарья Михайловна оценила опыт внедрения принципов ARRAIVE 2.0 как положительный, отметив, что внедрение отдельных пунктов не повлекло за собой дополнительных финансовых расходов и необходимости внедрения новых ролей.

Илья Михайлович Суханов, заведующий лабораторией фармакологии поведения отдела психофармакологии Института фармакологии им. А.В. Вальдмана ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, в своем докладе «Изучение перекрестной толерантности ингибиторов фосфодиэстеразы 10А» продолжил рассказывать о результатах исследований ингибиторов фосфодиэстеразы 10А (предыдущие результаты изложены в монографии «Консультант GLP-PLANET. Мнение фармацевтической отрасли». Целью настоящего исследования стало изучение механизма толерантности (фармакокинетического или фармакодинамического) к стимулирующему действию ингибиторов фосфодиэстеразы 10А на фармакологической модели гиподофаминергии. При планировании и проведении эксперимента исследователи руководствовались рекомендациями, в том числе и ARRIVE 2.0. При проведении пилотного эксперимента на этапе ослепления сотрудники столкнулись с проблемой, возникшей в результате вынужденной замены поставщика тестируемого вещества (МР-10). В ходе подготовки доз для введения лабораторным животным раствор МР-10 был желтого цвета, тогда как ранее раствор (от другого поставщика) был бесцветным, как и носитель (рис. 2, 3). Такие изменения могли привести к непреднамеренному разослеплению сотрудника, осуществляющего введение исследуемых объ-

Таблица 3

Изменение устоявшейся системы кодировки

Система кодировки	
До модификации	**После модификации**
Нумерация животных — 1.1, 1.2, 1.3 и т.д. Кодировка интактной группы — М	Нумерация животных — 49, 2, 51 и т.д. Кодировка группы с экспериментальной патологией — Т2
Нумерация животных — 2.1, 2.2, 2.3 и т.д. Кодировка группы с экспериментальной патологией — IP	Нумерация животных — 38, 7, 15 и т.д. Кодировка интактной группы — Т1

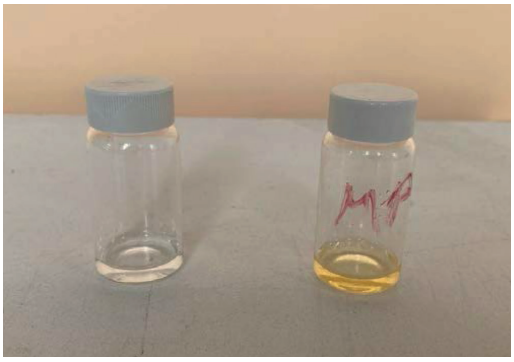


Рис. 2. Внешний вид раствора МР-10 (справа) и растворителя (слева)

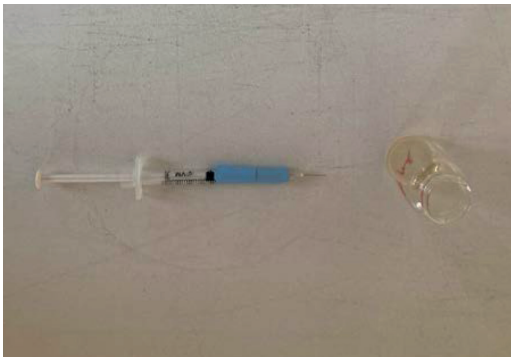


Рис. 3. Внешний вид шприца, наполненного МР-10

ектов. Для решения возникшей ситуации потребовалось включение дополнительной роли, то есть специалиста, который выполнял бы пробоподготовку — приготовление раствора МР-10 и наполнение шприцев исследуемыми объектами. Для обеспечения процедуры ослепления принято решение дополнительно заклеивать шприцы специальной непрозрачной лентой.

Результаты исследования показали, что изменение физико-химических свойств МР-10 нашло отражение в перемене биологической активности. Сопоставление фактов изменения цвета раствора МР-10 и его активности позволило исследователям обоснованно исключить часть данных из последующего анализа. Важно отметить, что принятое исследователями решение не может рассматриваться как предвзятость в отношении определенных результатов, поскольку протокол исследования прошел процедуру пререгистрации.

Согласно руководящим принципам ARRIVE, при проведении исследования должно быть представлено обоснование выбора возраста животных. В обзоре S.J. Jackson и соавт. (Jackson S.J., Andrews N. и соавт., 2017) приводятся данные о том, что в источниках литературы, описывающих исследование с использованием грызунов, часто употребляется термин «взрослое»[2] животное, который в проанализированных статьях применяют для особей от 6 до 20 нед. При этом обоснование выбора возраста животного к началу исследования остается неудовлетворительным и в ряде проанализированных работ сводится к тому, что технически проще работать с животными в возрасте от 6 до 10 нед. Возникают опасения, что в возрасте 6–10 нед часть систем еще может быть полностью не сформирована, а это может приводить к искажению данных и затруднять их интерпретацию. Предполагается, что более широкое внедрение ARRIVE со временем позволит обеспечить бóльшую ясность в описании лабораторных животных, в том числе для обоснования выбора возраста.

Ведущий научный сотрудник НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова Ольга Александровна Аверина (доклад «Влияние возраста на результаты тестирований мышей гибридов C57Bl/6/CBA») поделилась опытом проведения ис-

[2] В контексте рукописи термин «взрослый» не является эквивалентом «половозрелый» и был перенесен из рукописей, подлежащих анализу прямым переводом.

следований на мышах гибридах первого поколение двух инбредных линий C57Bl/6 и CBA (F1 C57Bl/6/CBA) с целью обоснования выбора возраста животных для проведения экспериментов. У мышей C57Bl/6/CBA от 2 до 18 мес изучали изменения массы тела, мышечной силы, тревожного и депрессивно-подобного поведения, способности к обучению, пространственной памяти, концентрации глюкозы, а также чувствительности к инсулину. Установлено, что наиболее подходящим возрастом для включения в исследования является возраст 3 и 4 мес (12–16 нед; в целом до 6 мес, или 24 нед), поскольку именно у этих возрастных групп выявлена наибольшая сходимость изученных показателей, и все органы и системы полностью сформированы. О.А. Аверина отметила, что на основании собственных исследований у мышей C57Bl/6/CBA старше 24 нед наблюдаются признаки старения, а значит в эксперименты по изучению возрастных изменений целесообразно включать особей в возрасте 48–72 нед (12–18 мес).

Доцент кафедры клинической фармакологии и доказательной медицины, заведующая отделом биомедицинской статистики ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России Елена Владимировна Вербицкая в своем докладе «Объекты исследования, взгляд биостатистика» осветила важный пункт ARRIVE 2.0. При проведении экспериментов исследователи часто используют понятие «объект исследования», под которым в доклинических исследованиях понимают лабораторное животное. Тем не менее важно понимать, что фактически исследователь работает с «экспериментальной единицей». Оба понятия, безусловно, связаны друг с другом, но все же разные. Например, объектом исследования может являться лабораторное животное — крыса, при этом экспериментальной единицей могут являться глаза, в том случае если проводится исследование офтальмологических лекарственных средств. Это говорит о том, что «объект исследования» — более широкое понятие, которое определяет область, явление или сферу изучения и может включать несколько экспериментальных единиц. R.O. Kuehl (Kuehl R.O., 2000) обозначил экспериментальную единицу как «физическую сущность», или субъект, подвергаемый вмешательству, независимо от других единиц. Четкое разделение понятий «объект исследования» и «экспериментальная единица» обеспечивает правильный уровень анализа данных исследования, применение соответствующих статистических методов, позволяет избегать псевдорепликаций (псевдоповторностей), а также обеспечивает корректную интерпретацию и обобщение результатов. На этапе планирования эксперимента важно понять, что будет представлять экспериментальная единица: группу биологических объектов (группа крыс — группа, получающая препарат сравнения), конкретный биологический объект (мышь, крыса, собака и т.д.), биологический объект и помет (самка и потомство в исследованиях репродуктивной токсичности), биологический объект в определенный временной интервал (лабораторное животное при реализации исследований с перекрестным дизайном), часть биологического объекта (глаз крысы, мозг собаки и т.д.). Если при проведении исследования запланировано многократное измерение какого-либо показателя от одного и того же животного, это не означает, что такое животное дает несколько экспериментальных единиц. Данные измерения должны рассматриваться как псевдорепликации. В исследовании, в котором имеется 2 группы по 12 лабораторных животных в каждой в общей клетке, при этом в интактной группе вмешательство

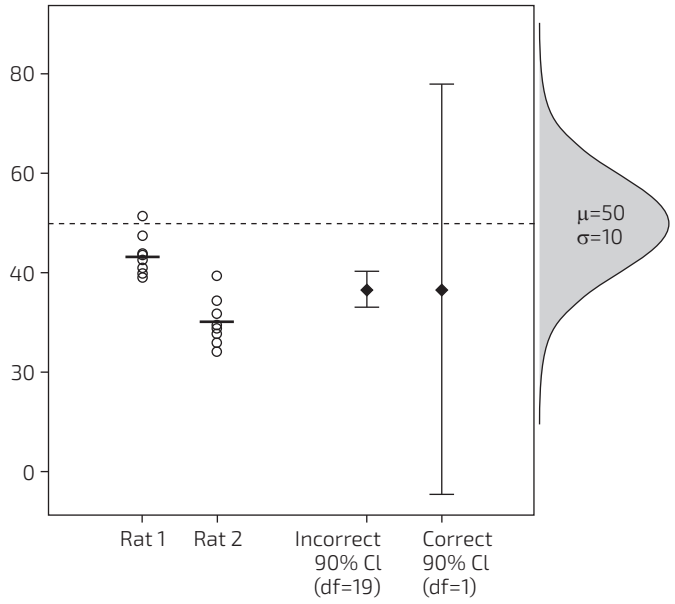


Рис. 4. Пример псевдорепликации:
Rat 1 — крыса 1; Rat 2 — крыса 2; Incorrect 90% CI — некорректный 90% доверительный интервал; correct 90% CI — корректный 90% доверительный интервал; df — степень свободы; горизонтальная пунктирная линия — среднее значение показателя в популяции

не осуществляется, в контрольной проводится, экспериментальной единицей является клетка (то есть каждое вмешательство будет оценено на одной экспериментальной единице), а не отдельное животное внутри группы (клетки). Поскольку при групповом содержании лабораторных животных возникают различные зоосоциальные взаимодействия и формируется иерархия доминирования, можно предполагать, что этот фактор будет влиять на результаты исследования. Следовательно, более рациональным будет включение в исследование несколько интактных групп по 12 животных и соответственно несколько контрольных групп (по 12 животных), но не увеличение повторов измерений для каждого отдельного животного внутри группы (клетки). Такой подход сложно реализовать, поскольку он требует увеличения количества животных и финансовых затрат. Еще одним решением будет случайный отбор животных в группы из разных клеток, отмечая их определенным цветом, при этом они остаются жить в своей клетке. С математической точки зрения описанный пример представлен на рис. 4.

Если из популяции крыс случайным образом выбрать двух со средним значением (μ) 50 и стандартным отклонением (σ) 10 и для каждой крысы провести 10 измерений какого-либо показателя, то доверительный интервал 90% может быть определен на основании данных 20 измерений (10+10). Такой подход не учитывает иерархический характер данных, поскольку 20 измерений не может рассматриваться в качестве случайной выборки из всей популяции. На рис. 4 видно, что 10 измерений от каждого животного имеют нормальное распределение относительно сред-

него значения показателя и ненормальное — относительного среднего значения показателя в популяции (горизонтальная линия на графике). Более верными будут определение средних значений для измерений, полученных от каждого животного, а затем расчет доверительного интервала на основании этих двух усредненных значений, то есть увеличение количества измерений показателя у каждого животного не приведет к более точной оценке среднего значения, для этого потребуется использование большего числа крыс. На представленном примере увеличение количества измерений показателя у каждого животного может рассматриваться как техническая реплика[3], основной целью которой является показать, насколько точны проведенные измерения в пределах одной экспериментальной единицы (Lazic S.E., 2010).

Если же при групповом содержании каждое животное получает разное вмешательство (например, разные лекарственные средства), то каждое животное будет являться экспериментальной единицей.

В работе (Lazic SE, Essioux L., 2013) представлен один из возможных алгоритмов определения экспериментальной единицы при проведении исследований репродуктивной токсичности. В таких исследованиях изучению подлежит потомство (оценка тератогенного действия лекарственного средства), при этом вмешательство получает самка (материнский организм, F0). Когда самка получает вмешательство, ее можно считать экспериментальной единицей. После рождения потомства (F1) экспериментальной единицей будет являться весь помет от одной самки, а переменная «отдельный детеныш» будет вложена в экспериментальную единицу «помет». Каждого детеныша в помете одной самки можно рассматривать как техническую реплику, при этом важно понимать, что именно каждый детеныш является единицей научного интереса. Исследование тератогенного действия лекарственного средства является сложным с математической точки зрения, дисперсия в таком эксперименте будет складываться из дисперсии внутри помета от одной самки, дисперсии между пометами от разных самок и дисперсией между экспериментальными группами. При сравнении групп, получавших разное вмешательство, необходимо использовать средние значения показателя, полученного от одного помета. Использование неусредненных значений приведет к увеличению размера выборки (псевдорепликации) при стандартном статистическом анализе.

Стоит отметить, что до сих пор в научном сообществе существуют различные точки зрения в отношении определения экспериментальной единицы в исследовании. Тем не менее все придерживаются мнения, что чрезвычайно важно дать четкое представление об экспериментальной единице, репликах и псевдорепликах, а также о тех методах статистического анализа, которые будут использованы на этапе планирования эксперимента.

Безусловно, результаты доклинических исследований во многом определяют стратегию клинической разработки и производства лекарственного средства.

Специалист по системной биологии АО «БИОКАД» Никита Сергеевич Вахрушев в своем докладе «Применение моделирования для обоснования стартовых доз

[3] Технические реплики, как правило, позволяют фиксировать вариации, вызванные используемым методом, оборудованием и человеческим фактором, то есть сотрудником, проводившим измерение.

в клинических исследованиях на основании ФК/ФД *in vivo* и ФД *in vitro*»[4] рассказал о том, какие подходы могут быть использованы для выбора доз I фазы клинических исследований. В руководстве EMA (European Medicines Agency, Европейское агентство лекарственных средств) описан механистический способ, основанный на математическом моделировании, постулирующий определение дозы с минимальным ожидаемым биологическим эффектом, которая вычисляется с использованием данных *in vivo* и *in vitro* одновременно. Стратегии выбора дозы first-in-human (впервые для человека) начали разрабатываться после трагедии с веществом TGN1412 (суперагонист CD 28, TeGenero Immuno Therapeutics), когда при проведении доклинических исследований не было учтено, что мишень не экспрессируется у приматов. Первое введение препарата в ходе проведения клинического исследования I фазы привело к гибели людей из-за синдрома выброса цитокинов. Эта история заставила разработать меры по исключению подобных ситуаций и внедрению методов математического прогнозирования (см. формулу). В ходе экспериментального изучения занятости рецепторов (*RO*) CD28 суперагонистом показано, что она составляет от 45 до 80%, а согласно данным прогноза *RO*, — 86,2–90,9% (Waibler Z., Sender L.Y., 2008). Представленный подход может быть использован для моделирования ситуаций, когда мишень находится в крови или органах.

$$RO = \frac{доза/V}{K_D + доза/V},$$

где доза — доза (в моль); K_D — константа диссоциации (в моль/л); V — предполагаемый объем плазмы крови (в л); *RO* — занятость рецепторов.

Выбор доз препаратов на основе антител можно осуществлять с применением данных фармакодинамики, установленных *in vitro*, для этого используют значение экспозиции EC50 *in vitro* (могут быть выбраны EC20, EC90) релевантного клеточного теста. Далее проводится изучение фармакокинетического профиля лекарственного препарата *in vivo* (на приматах). После скалирования установленного профиля с примата на человека происходит последовательный «перебор» доз таким образом, чтобы минимальная концентрация (C_{min}) не была ниже полумаксимальной эффективной концентрации (EC50), установленной *in vitro*. На основании полученных данных можно ожидать, что препарат будет оказывать биологическое действие на всем интервале дозирования. Выбор доз препаратов на основе антител может быть основан на данных фармакодинамики, установленных *in vivo*. Для этого по результатам доклинических исследований на животных необходимо определить зависимость между фармакокинетикой и фармакодинамикой, вывести соответствующие коэффициенты. Далее для предсказания фармакодинамических эффектов маркера при разных условиях можно использовать данные литературы в отношении концентрации маркера и скорости его метаболизма у человека.

Выбор начальной дозы I фазы клинических испытаний является важнейшим аспектом управления рисками в исследовании и должен быть представлен и обоснован в брошюре исследователя.

[4] ФК — фармакокинетика, ФД — фармакодинамика.

Директор ООО «Статэндокс» Екатерина Юрьевна Сорокина в своем докладе «Предоставление данных результатов доклинических исследований в брошюре исследователя» подчеркнула значимость результатов доклинических исследований не только для этапа планирования клинических исследований, но и в целом для принятия окончательного решения о возможности вывода лекарственного средства в гражданский оборот. От того, насколько корректно будут представлены результаты ДКИ (доклинических исследований) в брошюре исследователя, зависят риски в клинических исследованиях. Брошюра исследователя представляет собой сводное изложение доклинических и клинических данных об исследуемом лекарственном средстве, относящихся к его исследованию у человека. Она составляется спонсором исследования и должна ежегодно пересматриваться по мере накопления новых данных в отношении лекарственного средства. Брошюра исследователя подается на рассмотрение в национальные компетентные органы одновременно с заявкой на разрешение проведения клинического исследования. Она должна содержать необходимую клиницисту или потенциальному исследователю информацию для оценки целесообразности проведения исследования, в том числе соотношения польза—риск, изложенную в независимой и беспристрастной форме. Лектор привела пример, когда результаты доклинических исследований инъекционного лекарственного средства[5] были представлены в излишне оптимистичной форме, а риск выявленной реакции в месте введения не был надлежащим образом обозначен. Тем не менее при анализе данных эксперимента стало очевидно, что введение препарата приводило к асептическому некрозу в месте введения, что вызвало мутиляцию хвоста. В планировании I фазы клинических исследований заказчику было отказано и предложено уточнить причину возникновения нежелательного явления.

При подготовке брошюры следует руководствоваться в том числе Федеральным законом от 12.04.10 № 61 «Об обращении лекарственных средств». В пункте 3 статьи 40, посвященной проведению клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения, сообщается, что исследователь и соисследователи должны быть ознакомлены с результатами доклинических исследований лекарственного средства. В брошюре исследователя должна быть отражена вся информация, позволяющая проследить историю исследований по лекарственному средству, то есть недопустимо исключение ранее полученных данных. Требования к структуре брошюры описаны в правилах GCP (Good Clinical Practice, надлежащая клиническая практика) ЕАЭС. Изменение структуры, а именно заголовков первого порядка, недопустимо. В отношении заголовков более низкого порядка возможны изменения только в том случае, если это способствует облегчению понимания представленного материала. Брошюра исследователя должна содержать основные результаты доклинических исследований, представляющие значимость для человека. Нежелательные реакции (нежелательные лекарственные реакции), которые были зарегистрированы в клинических исследованиях, необходимо сопоставить с данными доклинических исследований и провести анализ в отношении причин

[5] Конкретное международное непатентованное наименование (МНН) и анатомо-терапевтически-химическая (АТХ) группа препарата названы не были.

их возникновения. Такой подход позволяет минимизировать риски путем введения ограничений для определенных групп людей. Отдельное внимание стоит уделить описанию исследований по изучению примесей и продуктов деградации, что особенно важно для лекарственных средств, предназначенных для длительного применения. Отсутствие данных по примесям и продуктам деградации может иметь высокий риск для человека, поскольку спустя длительный промежуток времени возможно выявление канцерогенного потенциала.

В целом, ключевым моментом при подготовке брошюры исследователя становится создание хорошо структурированного, исчерпывающего документа о свойствах (фармакодинамике, фармакокинетике, безопасности) изучаемого лекарственного средства. Брошюра исследователя должна нести строго объективный характер и четко обосновывать контекст планируемого клинического исследования.

Главный эксперт управления № 2 по эффективности и безопасности ЛС ЦЭК ГЛС ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России Галина Нинелевна Енгалычева в докладе «Обоснование релевантности экспериментальных животных при проведении доклинических исследований безопасности лекарственных средств» охарактеризовала недостатки брошюр исследователя, которые являются основанием для запроса экспертного учреждения. Для оригинальных препаратов I фазы клинических исследований самым первым и самым важным вопросом, требующим обоснования, является релевантность экспериментальных животных, особенно это касается высокотехнологичных лекарственных препаратов. Также обоснование релевантности важно при расширении популяции пациентов, например, в случае создания препарата для детей, новой лекарственной формы и изменения пути введения (в том числе гибридных препаратов). Среди других вопросов были выделены доказательства использования максимальных доз при изучении общетоксического действия (при отсутствии токсических эффектов) и обоснование отсутствия тех или иных видов исследования — в отношении оригинальных лекарственных препаратов; анализ ключевых факторов риска для оценки соотношения пользы и риска применения препарата у детей — при расширении популяции в показаниях к применению; вопросы по полученным результатам касаются всех групп препаратов.

Использование релевантных тест-систем является непременным условием получения достоверной, научно обоснованной информации о безопасности лекарственного средства. Не существует точных и всеобъемлющих указаний по выбору подходящих животных для каждого конкретного препарата, поскольку при доклиническом изучении каждого нового соединения возможны свои нюансы. Для обоснования адекватности использования той или иной тест-систем целесообразно руководствоваться национальными и международными нормативно-методическими документами, а также актуальной научной информацией. Обоснование релевантности экспериментальных животных необходимо включать в брошюру исследователя и в регистрационное досье лекарственного препарата.

Людмила Сергеевна Гузеватых, руководитель группы токсикологии GMP процессов АО «Р-Фарм», в докладе «Доклинические исследования как основа токсикологической оценки лекарственных средств для целей надлежащей производственной

практики» рассказала о значимости доклинических исследований при производстве лекарственных средств. В Решении Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.16 № 77[6] в пункте 3.6 указано требование к предотвращению перекрестной контаминации при производстве лекарственных препаратов, в пункте 5.20 представлены требования к оценке и контролю риска перекрестной контаминации производимой продукции, в рамках которой должна выполняться токсикологическая оценка. Такая необходимость возникает, поскольку на одной производственной линии могут совмещаться лекарственные препараты с разным действующим веществом, а значит риск переноса одного вещества в другое должен быть охарактеризован качественно и количественно. При токсикологической оценке требуется определить безопасные количества действующего вещества, которые могут оставаться на поверхностях производственной линии. Оценку проводят в соответствии с Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14.01.20 № 1[7] с учетом того, что этот документ применим не ко всем группам лекарственных средств. Основной целью токсикологической оценки является определение безопасного уровня воздействия лекарственного средства, при котором не будет негативных последствий для здоровья человека при непреднамеренном пожизненном воздействии. В доклинических исследованиях изучают, как правило, терапевтические дозы или токсические, при этом дозы значительно ниже терапевтических обычно не подлежат изучению. Остаточные количества лекарственного средства могут попадать в другой препарат, не предназначенный для данной популяции пациентов, при этом может быть изменен и путь введения. Результатом токсикологической оценки является расчет PDE (Permitted Daily Exposure, допустимая ежедневная экспозиция). Поскольку в клинические исследования должен поступать препарат, произведенный в соответствии с принципами GMP (Good Manufacturing Practice, надлежащая производственная практика), то уже к этому времени необходимо определить значение PDE. Для расчета могут быть использованы собственные результаты исследований, данные литературы и информация постмаркетинговых исследований. Особую ценность при анализе представляют результаты клинических исследований I фазы (оценка безопасности применения лекарственного препарата) для оригинального препарата или биоэквивалентности для воспроизведенного препарата, поскольку в таких экспериментах чаще участвуют здоровые добровольцы, а полученные эффекты отражают вариабельность популяции, не ограниченную показаниями к применению лекарственного средства. При анализе данных клинических исследований I фазы особое внимание следует уделять описанию нежелательных явлений и/или нежелательных явлений, связанных с действием препарата. Важно определить уровни доз, при которых данные явления были зарегистрированы. Говоря о доклинических исследованиях при расчете PDE, необходимо учитывать все данные — фармакодинамические, фармакокинетические, токсикологические (общие и специфические виды) и токсикокинетические. Для анализа основными дан-

[6] Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.16 № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза».

[7] Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14.01.2020 № 1 «Об утверждении Руководства по установлению допустимых пределов воздействия на здоровье в целях идентификации рисков при производстве лекарственных средств на общих производственных (технологических) линиях».

ными будут являться те, которые получены в исследованиях, проводимых с целью последующей государственной регистрации. Объем и качество доклинических исследований должны позволять провести межвидовую экстраполяцию результатов исследований. Для каждого эффекта должны быть определены вид кривой зависимости эффекта от дозы, пороговая доза, или сделан вывод о беспороговом характере действия.

Стремление к повышению воспроизводимости исследований как внутри одного, так и между экспериментами путем повышения строгости и прозрачности их планирования и проведения, научно обоснованный подход к представлению и анализу результатов, использование всех доступных документов (нормативные, нормативно-правовые, руководства, рекомендации и т.д.), включая ARRIVE 2.0, содействующих этому процессу, в конечном итоге приведут к становлению культуры доклинических исследований в России.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Begley C.G., Ellis L.M. Drug development: Raise standards for preclinical cancer research // Nature. 2012. Vol. 483. N. 7391. P. 531–533.
2. Fisher M., Feuerstein G., Howells D.W. et al. STAIR Group. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations // Stroke. 2009. Vol. 40. N. 6. P. 2244–2250. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.541128.
3. Jackson S.J., Andrews N., Ball D. et al. Does age matter? The impact of rodent age on study outcomes // Lab. Anim. 2017. Vol. 51. N. 2. P. 160–169. DOI: 10.1177/0023677216653984.
4. Kang Y., Park H., Choe B.-H. et al. The Role and Function of Mucins and Its Relationship to Inflammatory Bowel Disease // Front. Med. 2022. Vol. 9. P. 848344. DOI: 10.3389/fmed.2022.848344.
5. Kuehl R.O. Design of experiments: Statistical principles of research design and analysis. 2nd Edition. 2000.
6. Lazic S.E. The problem of pseudoreplication in neuroscientific studies: is it affecting your analysis? // BMC Neurosci. 2010. N. 11. P. 5. DOI: 10.1186/1471-2202-11-5.
7. Leenaars C.H. C., Kouwenaar C., Stafleu F.R. et al. Animal to human translation: a systematic scoping review of reported concordance rates // J. Transl. Med. 2019. Vol. 17. N. 1. P. 223. DOI: 10.1186/s12967-019-1976-2.
8. Failure to Replicate: A Big Nail in the Animal Research Coffin. URL: https://www.pcrm.org/news/good-science-digest/failure-replicate-big-nail-animal-research-coffin (дата обращения 09.2024).
9. Sun D., Gao W., Hu H. et al. Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? // Acta Pharm. Sin. B. 2022. Vol. 12. N. 2. P. 3049–3062. DOI: 10.1016/j.apsb.2022.02.002.
10. Velcich A., Yang W., Heyer J. et al. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2 // Science. 2002. Vol. 295. N. 5560. P. 1726–1729. DOI: 10.1126/science.1069094.

11. von Kortzfleisch V.T., Karp N. A., Palme R. et al. Improving reproducibility in animal research by splitting the study population into several “mini-experiments” // Sci. Rep. 2020. Vol. 10. N. 1. P. 16579. DOI: 10.1038/s41598-020-73503-4.
12. Vinkers C.H., Tijdink J.K., Otte W.M. Use of positive and negative words in scientific PubMed abstracts between 1974 and 2014: retrospective analysis // BMJ. 2015. Vol. 351. P. h6467. DOI: 10.1136/bmj.h6467.
13. Waibler Z., Sender L.Y., Kamp C. et al. Toward experimental assessment of receptor occupancy: TGN1412 revisited // J. Allergy Clin. Immunol. 2008. Vol. 122. N. 5. P. 890–892. DOI: 10.1016/j.jaci.2008.07.049.
14. Ходько С.В., Макарова М.Н., Шабанов П.Д. Валидация новой экспериментальной фармакологической модели острого шейного лимфаденита у крыс // Клиническая медицина. 2015. Т. 2. № 55. С. 106–112.

Особенности доклинических исследований высокотехнологичных лекарственных препаратов

https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-9-7-s4

К.Л. Крышень[1], С.В. Андреев[2], А.В. Дейкин[3], А.А. Дмитриева[4], Н.И. Енукашвили[5], Е.И. Леонова[6], М.О. Попова[7], С.В. Сенников[8], В.С. Сергеев[7], Е.А. Слободкина[9], А.А. Таубэ[10], Е.В. Филатова[11], А.И. Шакирова[7], Ю.В. Юркевич[5]

[1] *АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,*

[2] *Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр ЛОТИОС»,*

[3] *Объединенный центр генетических технологий НИУ «БелГУ»,*

[4] *АО «Р-Фарм»,*

[5] *Центр клеточных технологий «Покровский»,*

[6] *Центр трансгенеза и редактирования генома Санкт-Петербургского государственного университета,*

[7] *НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России,*

[8] *ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,*

[9] *Институт регенеративной медицины МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова,*

[10] *ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России,*

[11] *ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН*

Введение

В настоящее время развитие передовых технологий генной и клеточной терапии является одним из приоритетных направлений медицины во всем мире. Внедрение новых технологий в медицинскую практику вселяет большие надежды на лечение многих наследственных патологий, а также онкологических, сердечно-сосудистых, аутоиммунных, нейродегенеративных, инфекционных заболеваний и др. (рис. 1).

Благодаря развитию молекулярной генетики, технологий редактирования генома, а также методам доставки целевых генов в ткани-мишени стало возможно лечение многих моногенных заболеваний, которых на сегодняшний день известно более 6000[1].

[1] OMIM Gene Map Statistics https://www.omim.org/statistics/geneMap.

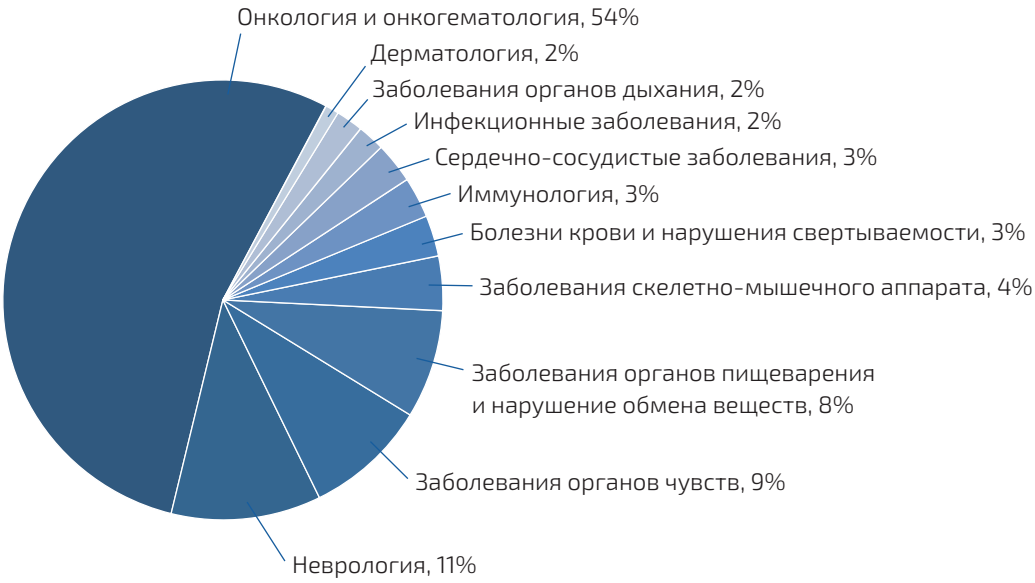


Рис. 1. Распределение разрабатываемых генотерапевтических препаратов по нозологическим направлениям (Меркулов В.А., Ягудина Р.И. и др., 2024)

Разработанные к настоящему времени препараты клеточной терапии для лечения повреждений эпидермиса (ожоги и травмы) и роговицы глаза (ожоги, травмы, дистрофические поражения), а также препараты тканевой инженерии, направленные главным образом на регенерацию тканей опорно-двигательного аппарата (поражения костной ткани и хрящевой ткани суставов), позволили создать принципиально новый класс лекарственных средств для персонализированной терапии, имеющих значительные преимущества по сравнению с применением высокоинвазивных хирургических методов лечения (Галицына Е.В., Куликова Е.А. и соавт., 2024).

Представляя собой симбиоз генной терапии и клеточных технологий, технология CAR-T может считаться вершиной иммунотерапии онкологических заболеваний. Применение этой технологии привело к революции в лечении резистентных к химиотерапии некоторых видов гемобластозов. В настоящее время исследуются возможности использования этой технологии в лечении солидных опухолей и аутоиммунных заболеваний. Большое количество лабораторных и клинических исследований в настоящее время направлено на создание, модификацию и оценку эффективности CAR-T (Попова М.О., Маркелов В.В., 2024). Еще одним ярким примером симбиоза технологий генной и клеточной терапии является лечение ВИЧ-инфекций. Как отметила в своем докладе «Опыт доклинической разработки продуктов на основе гемопоэтических стволовых клеток с редактированием генома» Марина Олеговна Попова, руководитель направления генной и клеточной терапии НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, в по-

следние годы с появлением технологии редактирования генома аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток с нокаутом по гену *CCR5* становится одним из самых перспективных методов лечения ВИЧ-инфекции.

Внедрение технологий генной и клеточной терапии, передовых методов лечения включено в стратегию развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 г. в качестве приоритетной задачи.

Учитывая высокую степень инновационности и гетерогенности данной группы медицинских продуктов, растущие с каждым годом темпы разработок в этой области, стоит признать недостаточность опыта подготовки программ доклинических исследований, формирования дизайна экспериментов, оценки полноты результатов этих исследований для представления в регуляторные органы. Необходимы постоянный диалог разработчиков, представителей регулятора и исследовательских центров, обсуждение актуальных проблем и вопросов, возникающих на сложном пути ранней разработки и регистрации препаратов передовой терапии.

В рамках проведенной сессии «Доклинические исследования отдельных групп биологических лекарственных средств» были затронуты вопросы государственного регулирования высокотехнологичных лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов, особенности подготовки программ доклинических исследований, отдельные методические аспекты изучения эффективности, безопасности и биораспределения, обсуждены проблемы выбора и релевантности используемых тест-систем.

Особенности государственного регулирования высокотехнологичных лекарственных средств

Термин «высокотехнологичные лекарственные препараты» (ВТЛП) был введен Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 22 мая 2023 г. № 60 «О внесении изменений в Правила регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения», а также № 1-ФЗ от 30.01.24 «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств».

Высокотехнологичные лекарственные препараты представляют гетерогенную группу медицинских продуктов, объединенную необходимостью особого регулирования их обращения. Согласно нормативным актам РФ[2] и ЕАЭС[3], к высокотехнологичным лекарственным препаратам относят:

- генотерапевтические лекарственные препараты (ГТЛП);
- препараты на основе соматических клеток;
- тканеинженерные лекарственные препараты (препараты тканевой инженерии).

[2] Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.10 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

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

Генотерапевтический лекарственный препарат — это **биологический лекарственный 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; терапевтический, профилактический или диагностический эффекты которого напрямую обусловлены последовательностью рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которую он содержит, или с продуктом генетической экспрессии этой последовательности[4].

Лекарственный препарат на основе соматических клеток (для терапии соматическими клетками) — **биологический лекарственный препарат**, содержащий клетки или ткани, обладающие следующими характеристиками (или состоящий из таких клеток или тканей): подвергшиеся существенным манипуляциям, в результате которых их биологические характеристики, физиологические функции или структурные свойства, значимые для клинического использования, были изменены. Не рассматриваются в качестве таких манипуляций: разрезание, измельчение, придание формы, центрифугирование, обработка растворами антибиотиков или антисептиков, стерилизация, облучение, разделение клеток, их концентрирование или очистка, фильтрование, лиофилизация, замораживание, криоконсервация, витрификация; не предназначенные для применения с целью осуществления одних и тех же основных функций у реципиента и донора; применяющиеся у человека с целью лечения, профилактики или диагностики заболевания посредством фармакологического, иммунологического или метаболического действия входящих в состав лекарственного препарата клеток или тканей[5].

Высокотехнологичный лекарственный препарат (ВТЛП), содержащий как аутологичные (происходящие от самого пациента), так и аллогенные (поступающие от другого человека) клетки или ткани, должен рассматриваться как лекарственный препарат, предназначенный для аллогенного применения. Высокотехнологичный лекарственный препарат, который может подпадать под определение препарата тканевой инженерии и определение лекарственного препарата на основе соматических клеток, должен рассматриваться в качестве препарата тканевой инженерии. Высокотехнологичный лекарственный препарат, который может подпадать под определение лекарственного препарата на основе соматических клеток или определение препарата тканевой инженерии и генотерапевтического лекарственного препарата, должен рассматриваться в качестве генотерапевтического лекарственного препарата[6].

Тканеинженерный лекарственный препарат (препарат тканевой инженерии) — **биологический лекарственный препарат**, содержащий подвергшиеся инженерии клетки или ткани человеческого либо животного происхождения, либо состоящий из таких клеток или тканей, который предназначен для применения в целях регенерации, репарации или замены ткани человека.

---

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

[5] Там же.

[6] Там же.

Тканеинженерный лекарственный препарат, наряду с жизнеспособными клетками, может содержать и нежизнеспособные клетки. Такой препарат также может содержать дополнительные вещества (например, клеточные продукты, биомолекулы, биоматериалы, химические вещества, каркасы и матрицы). Препараты, содержащие нежизнеспособные клетки и/или ткани человека либо животного или состоящие исключительно из таких клеток и/или тканей, основное действие которых не является следствием фармакологического, иммунологического или метаболического действия, не являются тканеинженерными лекарственными препаратами. Клетки или ткани считаются подвергшимися инженерии, если выполняется по меньшей мере одно из следующих условий: клетки или ткани подверглись существенным манипуляциям, позволившим получить биологические характеристики, физиологические функции или структурные свойства, релевантные для регенерации, репарации или замены.

Согласно решению ЕЭК № 78, ряд продуктов классифицируются как *комбинированные высокотехнологичные лекарственные препараты*[7]. Под комбинированным высокотехнологичным лекарственным препаратом понимается высокотехнологичный лекарственный препарат, удовлетворяющий следующим условиям: он должен включать в себя в качестве составной части препарата одно или более медицинских изделий или одно или более активных имплантируемых медицинских изделий; его клеточная или тканевая часть должна содержать жизнеспособные клетки или ткани; его клеточная или тканевая часть, содержащая нежизнеспособные клетки или ткани, должна в организме человека обладать способностью оказывать действие, которое можно рассматривать в качестве первичного по отношению к упомянутым изделиям.

Как отметила Натэлла Иосифовна Енукашвили, руководитель отдела научных исследований и разработок Центра клеточных технологий «Покровский», в своем докладе «Методы оценки биораспределения высокотехнологичных лекарственных препаратов», в Российской Федерации биомедицинские клеточные продукты описываются также Федеральным законом № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах»[8] (далее 180-ФЗ). Так, согласно 180-ФЗ, биомедицинский клеточный продукт — комплекс, состоящий из клеточной линии (клеточных линий) и вспомогательных веществ либо из клеточной линии (клеточных линий) и вспомогательных веществ в сочетании с прошедшими государственную регистрацию лекарственными препаратами для медицинского применения (далее — лекарственные препараты) и/или фармацевтическими субстанциями, включенными в государственный реестр лекарственных средств, и/или медицинскими изделиями.

Владислав Сергеевич Сергеев, научный сотрудник НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, в своем докладе «Исследования *in vivo* в разработке CD19 CAR-T» сделал важное замечание, что согласно Федеральному закону № 466 от 04.08.23[9], а также постановлениям правительства

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

[8] Федеральный закон от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

[9] Федеральный закон от 04 августа 2023 г. № 466-ФЗ «О внесении изменений в статью 4 Федерального закона «Об обращении лекарственных средств» и Федеральный закон «О биомедицинских клеточных продуктах».

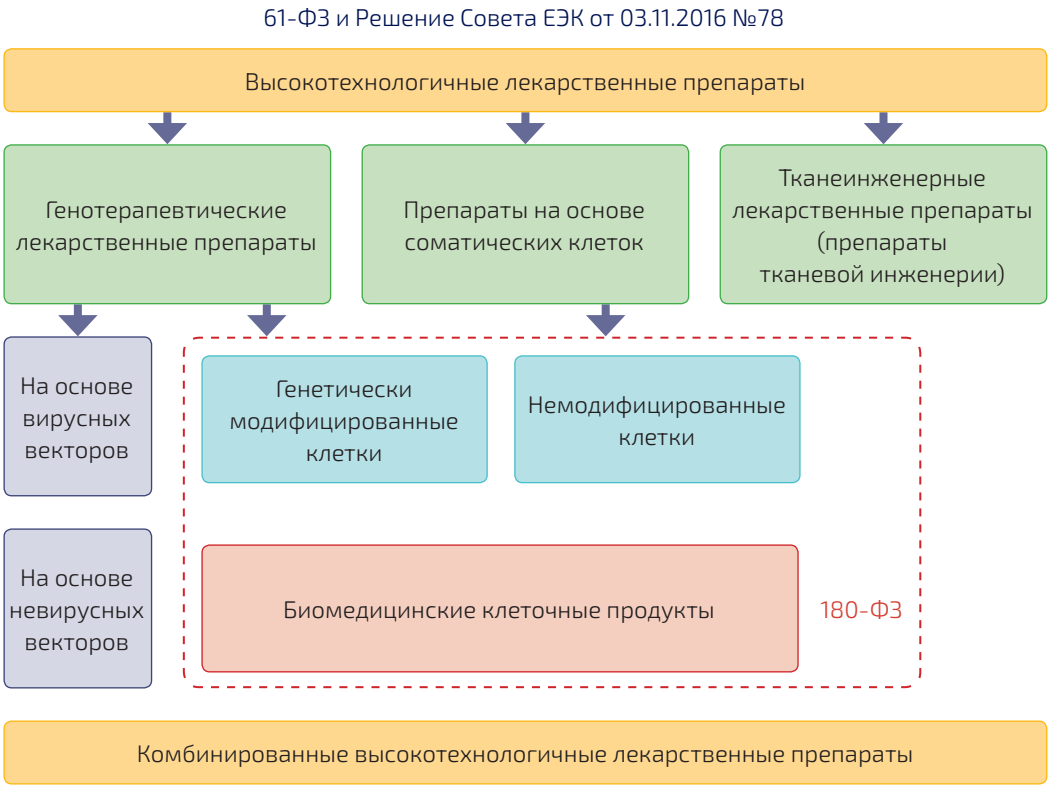


Рис. 2. Особенности государственного регулирования высокотехнологичных лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов.

№ 384 и № 385 от 28.03.24[10,11], в настоящее время по 180-ФЗ применение биомедицинского клеточного продукта (БМКП) ограничивается возможностью использования только в качестве так называемого госпитального исключения или индивидуального БМКП (иБМКП).

Особенности государственного регулирования высокотехнологичных лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов представлены на рис. 2.

[10] Постановление Правительства Российской Федерации от 28.03.24 № 384 «Об утверждении Правил обращения биомедицинских клеточных продуктов, предназначенных для исполнения индивидуального медицинского назначения биомедицинского клеточного продукта, специально произведенного для отдельного пациента непосредственно в медицинской организации, в которой применяется данный биомедицинский клеточный продукт».

[11] Постановление Правительства Российской Федерации от 28.03.24 № 385 «Об утверждении Правил предоставления, подтверждения и отмены разрешения на производство и применение биомедицинских клеточных продуктов, предназначенных для исполнения индивидуального медицинского назначения».

Программа доклинических исследований. Риск-ориентированный подход

С одной стороны, поскольку ВТЛП относят к биологическим лекарственным препаратам, при планировании доклинических исследований необходимо ориентироваться на решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза»; с другой — необходимо учитывать отдельные рекомендации и руководства, например, недавно изданное руководство по экспертизе иБМКП (руководство под ред. В.А. Меркулова).

Как отметила в своем докладе «Доклинические исследования генотерапевтических препаратов» Анастасия Андреевна Дмитриева, старший специалист отдела доклинических исследований АО «Р-Фарм», существует большое количество документов Европейского агентства лекарственных средств (EMA), Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA), регулирующих оценку безопасности как ВТЛП в целом, так и для отдельных видов ВТЛП в частности, а также рисков, связанных с их применением. Подробное обсуждение существующих нормативных документов представлено в ряде последних публикаций регулятора (Астапова О.В., Берчатова А.А., 2023; Рачинская О.А., Мельникова Е.В. и соавт., 2023; Тихомирова А.В., Горячев Д.В. и соавт., 2018). Например, в публикации О.В. Астаповой представлены специальные руководства EMA для ГТЛП (табл. 1).

Александра Альбертовна Таубэ, доцент кафедры экономики и управления ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, в своем сообщении «Этап доклинической разработки препаратов клеточной терапии» подчеркнула, что ввиду специфической природы высокотехнологичных лекарственных препаратов при формировании программы доклинических исследований должен применяться подход, основанный на анализе рисков[12].

Под риском понимается потенциальный нежелательный эффект, который может быть связан с клиническим применением ВТЛП и вызывать беспокойство при клиническом применении[13]. На рис. 3 представлена базовая классификация рисков[14] (Таубэ А.А., Аляутдин Р.Н. и соавт., 2021).

К рискам для пациента относят любые нежелательные реакции, включая отсроченные, например, развитие новообразований, аутоиммунных патологий, генетическая трансформация и др. Рисками для третьих лиц являются риски для медицинских работников, лиц, осуществляющих уход и проч. Выделяются также риски для окружающей среды, например, генотерапевтический лекарственный препарат, содержащий реплицирующийся вирус, может представлять существенную опасность для окружающей среды.

---

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

[13] EMEA Guideline on the risk-based approach according to annex I, part IV of Directive 2001/83/EC for ATMPs EMA/CAT/CPWP/686637/2011.

[14] Guidelines on safety and efficacy follow-up and risk management of Advanced Therapy Medicinal Products (EMEA/149995/2008.

Таблица 1

Специальные руководства EMA

Аспекты программы доклинических исследований ГТЛП	Документ
Биораспределение	ICH guideline S12 on nonclinical biodistribution considerations for gene therapy products (EMA/CHMP/ICH/318372/2021). General principles to address virus and vector shedding. ICH considerations (EMEA/CHMP/ICH/449035/2009)
Перед первым применением у человека	Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products (EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006, 30 May 2008)
Репродуктивная токсичность	Guideline on non-clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectors (EMEA/273974/2005, 16 November 2006). General principles to address the risk of inadvertent germline integration of gene therapy vectors. ICH considerations (CHMP/ICH/469991/2006)
Риск для окружающей среды	Guideline on scientific requirements for the environmental risk assessment of gene therapy medicinal products (EMEA/CHMP/GTWP/125491/2006, 30 May 2008). General principles to address virus and vector shedding. ICH considerations (EMEA/CHMP/ICH/449035/2009)
Модификация продукта разработки	Reflection paper on design modification of gene therapy medicinal products during development (CAT/GTWP/44236/2009, 14 December 2011)
Рекомбинантные аденоассоциированные вирусные векторы	Reflection paper on quality, non-clinical and clinical issues related to the development of recombinant adeno-associated viral vectors (EMEA/CHMP/GTWP/587488/2007 Rev. 1, 24 June 2010)
Онколитические вирусные векторы	Oncolytic viruses (EMEA/CHMP/ICH/607698/2008)
Лентивирусные векторы	Guideline on development and manufacture of lentiviral vectors (CHMP/BWP/2458/03, 26 May 2005)

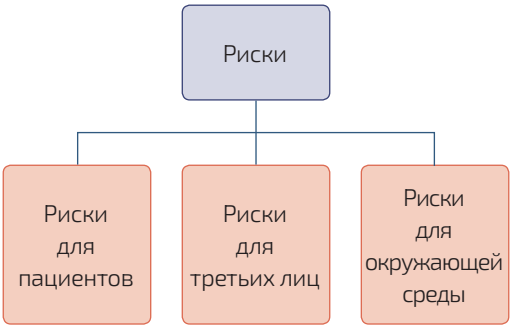


Рис. 3. Классификация рисков клинического применения ВТЛП (Таубэ А.А., Аляутдин Р.Н. и соавт., 2021)

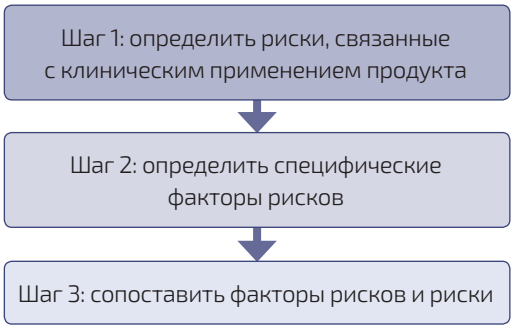


Рис. 4. Пошаговый подход по управлению рисками (на основании руководства EMEA с изменениями)

Для управления рисками клинического применения ВТЛП, а также оценки необходимости проведения отдельных доклинических исследований может быть полезен подход, описанный в руководстве EMEA[15] и представленный в работах Р.Н. Аляутдина и А.А. Таубэ (Аляутдин Р.Н., Романов Б.К. и соавт., 2012; Таубэ А.А., Аляутдин Р.Н. и соавт., 2021), и состоящий из нескольких основных этапов (шагов) (рис. 4).

Шаг 1. Определить риски, связанные с клиническим применением продукта.

Например, в публикации О.А. Рачинской, 2023 (Рачинская О.А., Мельникова Е.В., 2023) подробно рассмотрены следующие риски применения препаратов на основе технологий редактирования генома.

1. *Риски, связанные с использованием векторов и других способов доставки компонентов систем редактирования генома в клетку:*
   - риск трансдукции нецелевой популяции клеток;
   - инсерционный мутагенез;
   - риск модификации генов в клетках зародышевой линии.
2. *Риск подавления экспрессии трансгена.*
3. *Риски, связанные с целевым действием систем редактирования:*
   - возникновение хромосомных перестроек;
   - инициация апоптоза клеток и др.
4. *Риски, связанные с нецелевыми эффектами:*
   - нецелевое действие систем редактирования генома (нежелательный мутагенез).

Марина Олеговна Попова, руководитель направления генной и клеточной терапии НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, в докладе «Опыт доклинической разработки продуктов на основе гемопоэтических стволовых клеток с редактированием генома», посвященном доклинической разработке продуктов на основе гемопоэтических стволовых клеток с редактированием генома, отметила, что нецелевая

[15] EMEA Guideline on the risk-based approach according to annex I, part IV of Directive 2001/83/EC for ATMPs EMA/CAT/CPWP/686637/2011.

активность программируемых нуклеаз является одним из ключевых рисков клинического применения гемопоэтических стволовых клеток с редактированием генома.

5. Риск иммуногенности.

Шаг 2. Определить специфические факторы рисков.

Факторы риска, которые могут рассматриваться на данном этапе, включают: происхождение клеток (аутологичные, аллогенные, ксеногенные), способность к пролиферации и/или дифференцировке, способность вызывать иммунный ответ, манипуляции с клетками, комбинация клеток с биоактивными молекулами или медицинскими изделиями, 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 и способ введения или использования[16].

Шаг 3. Сопоставить соответствующие факторы и риски.

Для изучения вклада каждого фактора предлагается использовать двухмерную таблицу. Пример таблицы представлен в табл. 2.

С помощью подобной матрицы может быть установлена связь между отдельными факторами и рисками. Например, способность клеток к миграции и дифференцировке является фактором риска туморогенности (то есть формирование новообразований из клеток, входящих в состав БМКП), а наличие некоторых вирусов является фактором риска онкогенного потенциала (канцерогенности). Для таких комбинаций фактор — риск, где была выявлена взаимосвязь, необходимо подробно ее описать, а также сопоставить с собственными данными или данными литературы.

Таблица 2

Пример таблиц по управлению рисками для ВТЛП
на основе соматических клеток без генетической модификации

Фактор риска	Риск				
	Туморогенность	Онкогенность	Иммунотоксичность	Иммуногенность	…
Условия культивирования					
Способность к дифференцировке					
Вирусная контаминация					
Биораспределение					
…					

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

Результатом предложенного подхода является систематизация рисков, что может существенно помочь в подготовке программы оценки качества и доклинических исследований эффективности и безопасности ВТЛП.

В докладе Анастасии Андреевны Дмитриевой, старшего специалиста отдела доклинических исследований АО «Р-Фарм», «Доклинические исследования генотерапевтических препаратов» также прозвучал важный тезис, в котором подчеркивается, что при подготовке программы исследований необходимо использовать индивидуальный подход, основанный в первую очередь на структуре, нозологии препарата и анализе возможных рисков клинического применения. Анастасия Андреевна в своем сообщении поделилась практическим применением риск-ориентированного подхода на примере двух оригинальных препаратов Лукстурна® (rAAV2-вектор, содержащий ген белка пигментного эпителия сетчатки глаза человека *hRPE65*) и Collategene® (плазмида, содержащая фактор роста гепатоцитов HGF). Так, например, учитывая вирусную природу препарата Лукстурна®, в программу доклинических исследований входила оценка иммуногенности (формирование гуморального и клеточного ответа к капсиду). Поскольку плазмида препарата Collategene® кодирует фактор роста HGF, один из основных индукторов ангиогенеза, были проведены дополнительные исследования влияния внутримышечного введения препарата на рост ксенографтов, солидных опухолей человека у иммунодефицитных мышей.

Отдельное внимание в своем докладе Анастасия Андреевна уделила оценке биораспределения ГТЛП, поскольку стандартные исследования фармакокинетики для данного класса препаратов не применимы. Анастасия Андреевна отметила, что необходимо оценивать распределение таких препаратов не только в органах-мишенях, но и в нецелевых органах и тканях, а также по необходимости в биологических жидкостях. Причем при подготовке дизайна таких экспериментов необходимо учитывать потенциальную длительность экспрессии трансгена в клетках-мишенях.

Методические подходы к оценке эффективности, безопасности и биораспределения

Подходы к оценке биораспределения биомедицинских клеточных продуктов

Биомедицинские клеточные продукты содержат живые клетки человека, которые после введения в организм способны полностью встраиваться в жизненный цикл тканей и органов. Характер воздействия клеточных продуктов на организм значительно отличается от такового для лекарственных препаратов на основе низкомолекулярных субстанций, а терапевтический эффект чаще всего обусловлен паракринными механизмами или прямыми клеточными взаимодействиями. С этой точки зрения базовый принцип фармакокинетики — взаимосвязи эффекта от концентрации в биологических жидкостях для биомедицинских клеточных продуктов,

не работает. Так, согласно решению Совета ЕЭК от 03.11.16 № 78 (приложение № 1)[17], для высокотехнологичных препаратов на основе соматических клеток и препаратов тканевой инженерии стандартные фармакокинетические исследования по изучению абсорбции, распределения, метаболизма и экскреции не требуются. Для данного типа препаратов необходимо представить данные по биораспределению, то есть жизнеспособности, долговечности, распределению, росту, дифференцировке и миграции клеток.

В соответствии с правилами надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами[18] в ходе проведения кинетических исследований необходимо продемонстрировать:

а) обоснованность способа введения (для БМКП, когда место действия БМКП отличается от его места введения);
б) миграцию клеток клеточной линии (клеточных линий) БМКП из места введения БМКП;
в) длительность существования БМКП в организме (если предполагается его полная или частичная элиминация) или его присутствие в организме в течение времени, необходимого для оказания терапевтического эффекта.

Для оценки биораспределения БМКП используются различные подходы. Наиболее достоверными маркерами для отслеживания клеток являются их «внутренние, собственные» нормальные компоненты клеток. К таким маркерам можно отнести гены Y-хромосомы при сингенной трансплантации клеток самцов-доноров самкам-реципиентам. Y-хромосома (ее гены) детектируется методом ПЦР (полимеразной цепной реакции) или флюоресцентной гибридизацией *in situ* (Соловьева А.О., Зубарева К.Э. и соавт., 2013). Эти методы являются инвазивными и требующими эвтаназии животных, но при этом высокочувствительными. К перспективным (особенно с точки зрения клинических исследований) способам визуализации относят магнитно-резонансную томография (МРТ), однофотонную эмиссионную компьютерную томографию (ОФЭКТ) и позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ). Важным преимуществом данных методов является их возможность визуализировать БМКП прижизненно. Для проведения данных диагностических исследований клетки должны быть мечены ядерной меткой (в случае ОФЭКТ и ПЭТ) или парамагнитными частицами (в случае МРТ) (Kamiyama Y., Naritomi Y. и соавт., 2021). Каждый метод мечения и визуализации клеток имеет свои достоинства и недостатки (Shan Y., Zhang M. и соавт., 2024) (табл. 3).

Одним из перспективных методов, позволяющих оценить биораспределение клеток прижизненно как у животных, так и у человека является метод магнитно-резонансной томографии, основанный на измерении электромагнитного отклика ядер атомов водорода. МРТ практически не имеет ограничений по объему и глубине изучаемого объекта, поэтому отлично подходит для исследования целого организма. Пространственное разрешение МРТ составляет около 10 мкм, а средний размер клеток — 5–50 мкм, поэтому этот способ может применяться для исследования миграции

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

[18] Приказ Минздрава России от 08.08.18 № 512н «Об утверждении Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами».

Таблица 3

Преимущества и недостатки различных методов оценки биораспределения БМКП (Shan Y., Zhang M. и соавт., 2024)

Методы	Нижний предел обнаружения	Преимущества	Недостатки
МРТ	10^4 клеток	Неинвазивность; высокое пространственное разрешение; сканирование всего тела	Низкая чувствительность; не поддается количественному определению
ПЭТ/ОФЭКТ	10^4 клеток	Неинвазивность; высокая чувствительность; сканирование всего тела; поддается количественной оценке	Низкое пространственное разрешение; короткий период полувыведения
Биолюминесцентная визуализация	10^3 клеток	Неинвазивность; высокая чувствительность; длительное обнаружение; возможность различать живые и мертвые клетки	Ограничение по глубине обнаружения; нет разрешения для одной ячейки
Флюоресцентная визуализация	10^3 клеток	Возможность различать живые и мертвые клетки	Инвазивность; ограниченная глубина обнаружения; высокие операционные требования
Проточная цитометрия	10^3 клеток	Возможность различать живые и мертвые клетки	Метка множественными антителами; низкая точность; низкая стабильность
Количественная ПЦР	10^2 клеток	Высокая чувствительность; высокая специфичность	Невозможно отличить живые клетки от мертвых; ограниченная область обнаружения
Иммуногистохимия	10^2 клеток	Высокая чувствительность; высокая специфичность; возможность визуализации даже одной клетки	Ограниченная область обнаружения; селективная визуализация специфического белка; отсутствие возможности динамического обнаружения

трансплантированных клеток (Соловьева А.О., Зубарева К.Э. и соавт., 2013). Для отслеживания клеток с помощью МРТ требуется маркировать клетки контрастными веществами, такими как суперпарамагнитные наночастицы оксида железа, парамагнитные металлы (Gd^{3+} и $Mn^{2+/3+}$) или частицы оксида железа микронного размера.

Натэлла Иосифовна Енукашвили, руководитель отдела научных исследований и разработок Центра клеточных технологий «Покровский», старший научный сотрудник НИЛ клеточных технологий СЗГМУ им. И.И. Мечникова, в своем докладе «Методы оценки биораспределения высокотехнологичных лекарственных препаратов» представила результаты разработки метода мечения клеток наночастицами оксида железа Fe_3O_4 для последующей визуализации БМКП/ВТЛП с помощью МРТ. На примере мезенхимальных стволовых клеток и фибробластов показано, что клетки поглощали такие частицы в среде без снижения пролиферативной активности, жизнеспособности и без изменений набора поверхностных маркеров, характерного для данного типа клеток (Енукашвили Н.И., Коткас И.Е. и соавт., 2020). С использованием томографа мощностью 1,5Т продемонстрирована возможность визуализации меченных наночастицами железа клеток на крысах и карликовых свиньях (Novosad Y.A., Shabunin A.S. и соавт., 2024). На томограммах клетки в месте введения визуализируются в виде затемненных областей на фоне тканей белого цвета (рис. 5).

У представленного метода есть и свои ограничения. Они определяются исключительно разрешающей способностью томографа и исследуемыми тканями. Так, например, предложенный метод не подходит для тех тканей, которые на МРТ будут выглядеть темными (например, кости). Разрешающую способность метода можно повысить с использованием томографов более высокой мощности.

Как отметила Натэлла Иосифовна, на томограммах могут также визуализироваться и сами маркирующие агенты, вытекающие из клеток вследствие экзоцитоза или гибели. Чтобы заметить такие явления на доклинической стадии требуются не только исследования по визуализации БМКП при помощи методов с мечением клеток, но и другие

Рис. 5. Результаты трансмиссионной электронной микроскопии частиц оксида железа после интернализации фибробластами (а); демонстрация проведения МРТ карликовой свинье после инъекции меченных наночастицами оксида железа клеток с помощью аппарата Philips Achieva 1,5T (Philips, Нидерланды) в клинике доктора Сотникова (ООО «Ветеринарная медицина») (б); демонстрация визуализации клеток, введенных подкожно в области внутренней поверхности бедра карликовой свинье с помощью МРТ (затемненная область на фоне тканей белого цвета отмечена стрелкой) (в)

традиционные методы, например, иммуногистохимия, количественная ПЦР и др. Использование разных подходов позволяет более объективно охарактеризовать все необходимые параметры, включая миграцию клеток от места введения, их выживаемость и др.

Методические подходы к экспериментальной оценке эффективности генотерапевтических препаратов для стимуляции ангиогенеза

Основным физиологическим ответом на гипоксию и ишемию является стимуляция роста кровеносных сосудов, ангиогенез. Однако при длительном или чрезмерно сильном нарушении кровоснабжения ангиогенный ответ оказывается недостаточным, либо возникает дефицит эндогенных факторов, стимулирующих рост сосудов. Оправданным решением в данном случае является экзогенная стимуляция роста сосудов, получившая название «терапевтический ангиогенез». Эта область медицины, основанная на лечении ишемических заболеваний путем стимуляции роста кровеносных сосудов для восстановления кровоснабжения к тканям или органам.

Первыми препаратами, которые разрабатывались для терапевтического ангиогенеза, были рекомбинантные белки фактора роста сосудов. В клинике данная стратегия оказалась неудачной, поскольку для поддержания терапевтически значимых концентраций ангиогенных факторов в зоне ишемии необходимо введение больших количеств белка, который имеет непродолжительное время жизни в организме, в то время как процесс ангиогенеза длится дни и даже недели. Такие количества белка могут давать нежелательные эффекты и имеют высокую стоимость. Возможное решение — применение генной терапии, которое заключается в доставке в вышеанализированные ткани генетических конструкций, кодирующих ангиогенные факторы роста для создания локальной и продолжительной концентрации ангиогенных факторов роста.

В своем сообщении «Бицистронный плазмидный генотерапевтический препарат для стимуляции ангио- и нейрогенеза в скелетных мышцах» Екатерина Александровна Слободкина, младший научный сотрудник лаборатории медицинской биоинженерии Института регенеративной медицины МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова, поделилась опытом разработки и экспериментальной оценки эффективности бицистронного плазмидного генотерапевтического препарата[19] для стимуляции ангио- и нейрогенеза в скелетных мышцах.

Для объективного подтверждения биологической и фармакологической эффективности целесообразно использовать различные экспериментальные подходы. Например, для исследования биологической активности *in vitro* разрабатываемого ГТЛП коллеги использовали модель ангиогенеза — способности эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) образовывать капилляроподобные структуры; для оценки фармакологической активности *in vivo* — экспериментальную модель ишемии задней конечности мыши с измерением плотности капилляров и артериол в образцах ишемизированных скелетных мышц.

Как отметила в своем сообщении Екатерина Александровна, наиболее сложным этапом при разработке генотерапевтических препаратов является переход от клеточной модели *in vitro* к моделям *in vivo*.

[19] Патент РФ №2737481 C1, 01.12.20 «Генно-инженерная конструкция для стимуляции ангиогенеза».

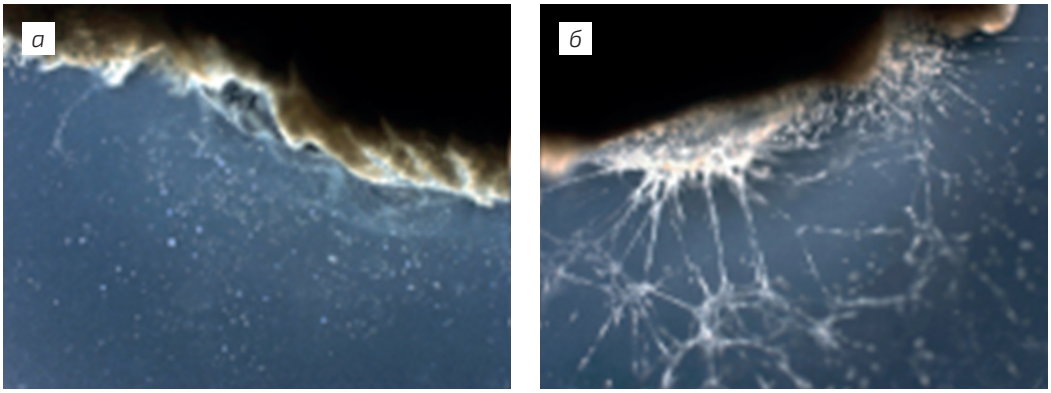


Рис. 6. Иллюстрация прорастания клеток из мышечной ткани (б) при введении в мышцу плазмиды, кодирующей фактор роста сосудов VEGF и контрольной плазмиды (а). Заимствовано из публикации Jang и соавт., 2004 (Jang H., Kim H. и др., 2004)

На данном этапе при разработке генотерапевтического препарата для стимуляции ангиогенеза использовали интересный подход *ex vivo* по методу Jang и соавт., 2004 (Jang H., Kim H. и соавт., 2004). Метод заключается во внутримышечном введении исследуемой плазмиды мышам в малую большеберцовую мышцу с последующим (через 2 сут) выделением участка мышечной ткани в месте введения и его культивированием на матригеле. В течение нескольких дней культивирования можно наблюдать прорастание и миграцию клеток из мышцы с образованием сети трубчатых структур, похожих на капилляры (рис. 6). Оценку эффективности исследуемых генотерапевтических препаратов можно проводить в динамике по площади образовавшейся сети капилляров, а также выработке продуктов трансгена.

Представленный в докладе Екатерины Александровны поэтапный подход позволил, с одной стороны, всесторонне изучить первичную фармакодинамику разрабатываемого ГТЛП, а с другой — обосновать терапевтический (эффективный) диапазон доз, что является ключевым аспектом для безопасного и эффективного применения препарата в клинической практике.

Подробное описание методов и результатов проведенных экспериментальных работ представлено в ряде последних публикаций и диссертации Е.А. Слободкиной (Stafeev I.S., Boldyreva M.A. и соавт., 2022; Slobodkina E.A., Boldyreva M. и соавт., 2020; Слободкина Е.А., Карагяур М.Н. и соавт., 2021).

Подходы к оценке нецелевой активности программируемых нуклеаз

Алена Игоревна Шакирова, заведующая лабораторией генной и клеточной терапии НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, в своем сообщении «Объективные методы оценки нецелевой активности программируемых нуклеаз в доклинической разработке продуктов генной клеточной терапии на основе редактирования» рассказала об объективных методах

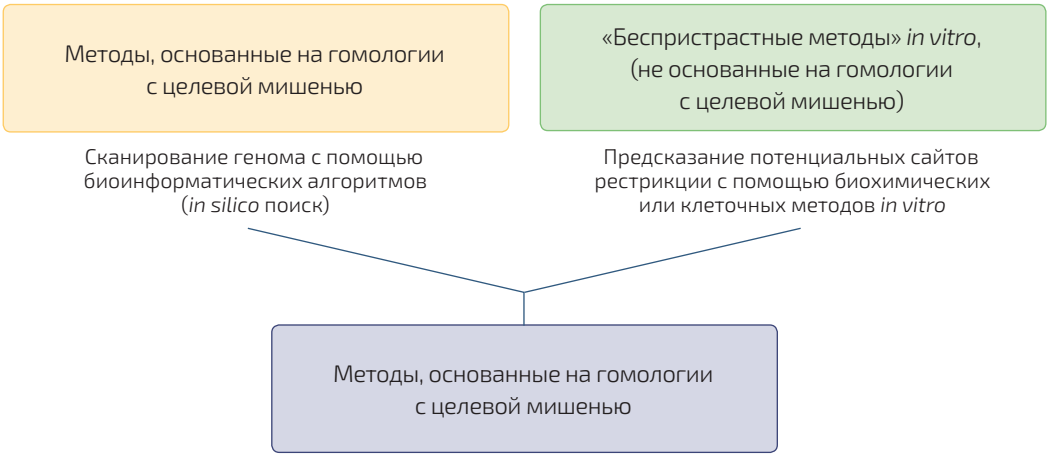


Рис. 7. Методы оценки внецелевой активности программируемых нуклеаз

оценки нецелевой активности программируемых нуклеаз (на примере CRISPR/Cas9) в доклинической разработке высокотехнологичных лекарственных препаратов.

Эффективность и специфичность — два важнейших параметра, определяющих успешность редактирования генома с помощью CRISPR/Cas9. Огромный потенциал редактирования генома для генной терапии побуждает ученых решать проблемы, связанные с безопасностью, в частности, с нецелевыми эффектами. За последнее десятилетие методы оценки нецелевых эффектов CRISPR/Cas9 быстро развивались. Однако по-прежнему существуют ограничения в балансе между точностью и чувствительностью этих новых методов. Прямая оценка нецелевых эффектов *in vivo*, и тем более у пациентов, является особенно сложной задачей.

Как отмечает Алена Игоревна, способы оценки внецелевой активности программируемых нуклеаз можно подразделить на методы, основанные на гомологии с целевой мишенью (*in silico* сканирование генома с помощью алгоритмов биоинформатики), а также *in vitro* «беспристрастные» (то есть не основанные на гомологии с целевой мишенью) методы оценки (предсказание потенциальных локусов внецелевой активности с помощью биохимических или клеточных методов *in vitro*). Оба этих подхода могут давать достаточно широкий спектр ложнопозитивных результатов, что требует дальнейшего глубокого таргетного подтверждающего секвенирования предсказанного сайта на клинически релевантных популяциях клеток (рис. 7).

В обзорной статье C. Guo и соавт. (2023) показано, что в настоящее время существует достаточно широкий спектр методов оценки внецелевой активности программируемых нуклеаз (Guo C., Ma X. и соавт., 2023). В своем сообщении Алена Игоревна подробно рассказала о принципах, преимуществах и недостатках методов *in silico*, *in vitro* «беспристрастных» методах, таких как GUIDE-seq и DISCOVER-seq. Важно отметить, что для каждого инструмента редактирования генома оценка потенциальных локусов внецелевой активности индивидуальна и необходимо тщательно подбирать и обосновывать используемый метод.

Методические подходы к фармакотоксикологической оценке БМКП на основе фибробластов

Общие требования и принципы доклинических исследований БМКП отражены в приказе Минздрава России от 08.08.18 № 512н «Об утверждении Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами»[20]. Согласно этому документу, в общем случае доклинические исследования БМКП должны включать:

- определение специфического действия на организм;
- определение общей и местной токсичности;
- кинетические исследования;
- установление туморогенности;
- установление онкогенности;
- репродуктивной токсичности.

Юрий Васильевич Юркевич, профессор-консультант ООО «Покровский банк стволовых клеток», в своем докладе «Экспериментальная оценка ранозаживления гомологичными фибробластами в рамках доклинических исследований специфической активности» поделился опытом экспериментальной оценки специфического действия БМКП на основе фибробластов в геле гидроксиэтилцеллюлозы на модели термического ожога у крыс.

Необходимость разработки эффективных ранозаживляющих средств для лечения ожогов кожи остается серьезной и актуальной проблемой. Фибробласты дермы остаются наиболее перспективным инструментом для лечения ожоговых травм. Заживляющее действие культивируемых фибробластов объясняется их способностью синтезировать компоненты внеклеточного матрикса и факторы роста, которые способствуют пролиферации аутологичных фибробластов и кератиноцитов. Кульминацией этого процесса является формирование полноценной дермальной стромы и эпидермализация (Novosad Y.A., Shabunin A.S. и соавт., 2024).

Так, клеточный препарат на основе фибробластов в геле гидроксиэтилцеллюлозы на модели глубокого термического ожога у крыс показал выраженное ранозаживляющее действие. Аппликация БМКП на ожоговую рану способствовала снижению признаков воспаления, ускоренному уменьшению площади ожога, полному заживлению повреждения. Подробнее с результатами проведенного доклинического исследования можно ознакомится в публикации Y.A. Novosad и др. (2024) (Novosad Y.A., Shabunin A.S. и соавт., 2024).

Важной особенностью проведенного исследования являлось использование гомологичного клеточного продукта на основе фибробластов не человека, а крысы, что позволило более корректно показать специфическое действие разрабатываемого продукта. Так, согласно Приказу 512н[21] при проведении доклинических исследований допускается использование БМКП, в состав которого входит клеточная линия животного происхождения, сходного с БМКП, предназначенного для использования у человека. Ясно, что использование клеток человека на модели ожога в силу очевид-

[20] Приказ Минздрава России от 08.08.18 № 512н «Об утверждении Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами».

[21] Там же.

ных генетических отличий привело бы к нежелательному иммунному ответу у крыс, к частичному либо полному отсутствию эффекта, а само исследование обладало бы слабой трансляционностью. Подобные подходы к использованию гомологичных продуктов широко применяются не только в отношении БМКП, но и при необходимости — к другим высокотехнологичным лекарственным препаратам, включая ГТЛП.

Еще одной особенностью, которую также необходимо подчеркнуть, является включение в дизайн эксперимента дополнительных контрольных точек по оценке системного воздействия БМКП, в том числе гематологического/биохимического анализа крови, измерения массы тела в динамике. Это позволило оценить не только фармакологическую активность, но и сделать определенные выводы о безопасности использования клеточного продукта, причем в условиях, приближенных к клиническим.

Методические подходы к оценке зрительной функции у грызунов

Рассматривая вопросы моделирования наследственных заболеваний сетчатки у грызунов и оценки потенциальной эффективности препаратов генной терапии, Елена Владимировна Филатова, ведущий научный сотрудник ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, сделала сообщение «Использование Лабиринта-Трансформера для оценки зрительной функции при оптогенетическом протезировании клеток сетчатки у грызунов».

В подобных экспериментах оценка структурных изменений глаза ведется на разных уровнях с использованием стандартных гистологических, а также инструментальных офтальмологических методов (флуоресцентная ангиография, оптическая когерентная томография, электроретинография и др.). Однако окончательный ответ на вопрос, видит ли животное, можно получить только по поведенческой реакции. Таких тестов достаточно много.

К широко используемым физиологическим тестам оценки зрительной функции относят методы, основанные на оптомоторном кинетическом рефлексе стабилизации изображения. Принцип метода заключается в оценке поворота туловища и головы при вращении вокруг животного барабана с вертикальными полосками (Prusky G.T., Alam N. M. и соавт., 2004). Существуют различные лабиринтные методики с обучением, выбором нужного рукава и др. Например, широко используется тест 4-лучевого лабиринта, где животному предлагают разные уровни освещенности или цветовые задачи (Vit J., Fuchs D. и соавт., 2021). Существуют и оригинальные интересные тесты. Например, тест Looming Visual Stimuli, когда сверху проецируется темная тень, имитирующая хищника, и если животное видит, то прячется в норку (Koehler C.C., Hall L.M. и соавт., 2019).

В качестве модели нарушения зрительной функции в представленной Еленой Владимировной работе использовали модель туникамицин-индуцированной фоторецепторной дегенерации у мышей. Известно, что при интравитреальной инъекции туникамицин нарушает процесс гликозилирования опсина и формирования мембранных дисков в наружных сегментах фоторецепторов, что приводит к их деградации в течение примерно 15–25 дней. Из-за потери фоторецепторных клеток прекращается передача информации в мозг, то есть утрачивается зрительная функция (Ротов А.Ю., Астахова Л.А. и соавт., 2018).

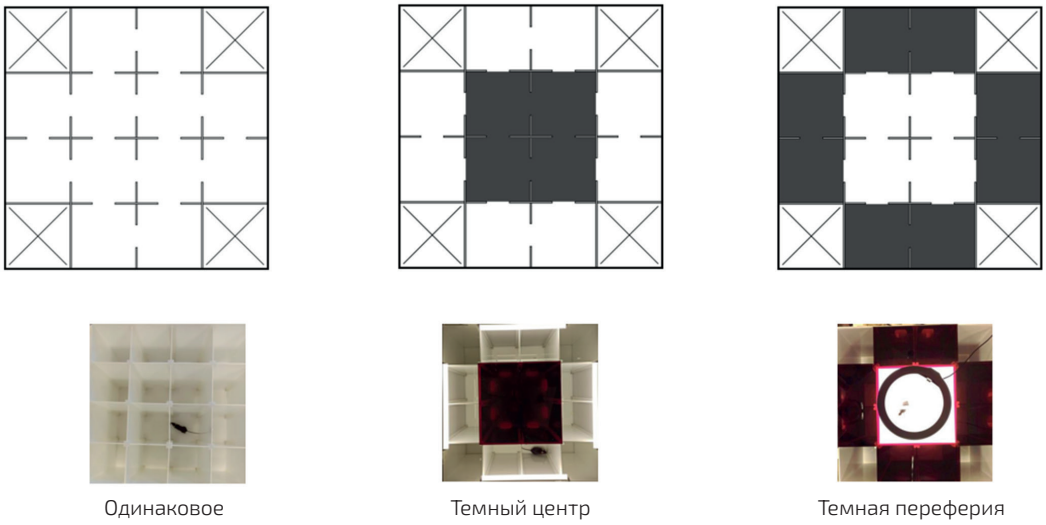


Рис. 8. Пример теста с использованием лабиринта-трансформера. Темно-светлый выбор в трех разных вариантах освещения периферических и центральных отсеков

Лабиринт-трансформер (Filatova E.V., 2022) представляет собой конструкцию из непрозрачного белого оргстекла. Съемные перегородки крепятся с помощью пазов на внутренней поверхности боковых стенок, позволяя проводить различные варианты тестов. На рис. 8 представлен вариант теста с различным чередованием освещения в центре и периферических отсеках. Здоровые зрячие животные бóльшую часть времени проводили в темных отсеках вне зависимости от их расположения.

При потере зрения была обнаружена смена стратегии исследования пространства — животные бóльшую часть времени начинали проводить на периферии, вне зависимости от освещения. Через 1 мес после введения ГТЛП на основе аденоассоциированного вируса наблюдался отказ от стратегии предпочтительного исследования периферии, что предположительно связано с началом экспрессии фоточувствительного белка в клетках сетчатки и поступлением в мозг возбуждающих сигналов. Таким образом, новый тест позволяет обнаружить наличие экспрессии и ее начало неинвазивно.

Тест-системы

Иммунодефицитные мыши

В доклинических исследованиях высокотехнологичных лекарственных препаратов выбор тест-систем имеет решающее значение. Владислав Сергеевич Сергеев, научный сотрудник НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России и Сенников Сергей Витальевич, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фун-

даментальной и клинической иммунологии», поделились опытом использования мышей с тяжелым иммунодефицитом для оценки эффективности иммунотерапии онкогематологических и солидных злокачественных новообразований с помощью генетически модифицированных Т-лимфоцитов.

Иммунодефицитный статус животных-реципиентов является обязательным условием для предотвращения отторжения опухолевого материала другого биологического вида, в связи с чем в настоящее время разработано большое количество различных линий мышей, характеризующихся различной степенью дефектов иммунной системы. Понимание особенностей и важных черт той или иной линии экспериментальных животных позволяет правильно выбрать объект для создания адекватной опухолевой модели, учитывая при этом ее преимущества и ограничения. В настоящее время существует множество линейных животных, полученных для реализации самых разнообразных научных задач (Миндарь М.В., Лукбанова Е.А. и соавт., 2020).

В табл. 4 представлена характеристика некоторых линий мышей, используемых в моделях опухолевых ксенотрансплантатов.

Как отметил Владислав Сергеевич Сергеев, научный сотрудник НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, в мировой практике для доказательства эффективности терапии CAR-T в лечении онкологических гематологических заболеваний «золотым стандартом» является использование высокоиммунодефицитных мышей.

Одной из самых перспективных в этом отношении является линия мышей NOD,B6.SCID Il2rγ−/−KitW41/W41 (NBSGW). Животные этой линии — мыши с глубоким комплексным иммунодефицитом представляют собой модификацию линии NSG. Их особенность заключается в дополнительной точечной мутации в гене *KIT* (аллель Kit^{W41}), кодирующем трансмембранный тирозинкиназный рецептор c-Kit III типа. Белок экспрессируется в нескольких типах клеток кроветворного ряда, в том числе в гемопоэтических предшественниках, а его активация необходима для регуляции нормального кроветворения. Инактивирующая мутация нарушает развитие этих типов клеток, создавая условия для конкурентного преимущества популяций гемопоэтических клеток донора после ксенотрансплантации. Таким образом, степень иммунодефицита животного-хозяина, а также запустение ниш в костном мозге способствуют приживлению и устойчивой экспансии донорских клеток (Шакирова А.И., Лаушкина В.О. и соавт., 2024).

Классический эксперимент по оценке эффективности терапии CAR-T онкологических гематологических заболеваний заключается во внутривенной трансплантации иммудефицитным мышам опухолевых клеток (например, В-клеточной линейности Raji-luc, NALM6-luc), экспрессирующих люцеферазу. По уровню хемилюминесценции у животных можно говорить об изменении опухолевой массы в динамике и соответственно эффективности иммунотерапии.

Рассматривая вопросы безопасности терапии CAR-T, Владислав Сергеевич подчеркнул, что не все риски клинического применения можно оценить на иммунодефицитных мышах. В табл. 5 представлена оценка наличия моделей *in vivo* на иммунодефицитных мышах для отдельных рисков терапии CAR-T онкологических гематологических заболеваний.

Таблица 4

Характеристика линий мышей, используемых в модели опухолевых ксенотрансплантатов (заимствовано Терещенко В.П., Сенников С. В., 2021)

Линия мышей	Описание	Успешность трансплантации опухоли	Особенности
Nude (nu/nu)	Мутация гена *Foxn1*, нарушение в развитии железистого эпителия, отсутствие тимуса, сниженное число функциональных Т-лимфоцитов	Более 75%	Отсутствие шерсти удобно для измерения размеров опухоли вручную и методами визуализации *in vivo*
SCID, NOD/SCID	Мутация гена *Prkdc*, продукт которого ответственен за восстановление двухцепочечных разрывов ДНК. Т- и В-клеточный дефицит в связи с нарушенной рекомбинацией V(D)J-генов	20–50% для солидных опухолей до 100% для гематологических опухолей	Наличие небольшого количества Т- и В-лимфоцитов с олигоклональным репертуаром рецепторов. Нарушение репарации ДНК во всех клетках организма. Высокая вероятность успешной трансплантации гематологических опухолей
NOD/SCID/IL2Rγnull (NSG)	То же, что и SCID, NOD/SCID с дополнительным нокаутом γ-цепи рецептора ИЛ-2. Т- и В-клеточный дефицит, отсутствие созревания NK-клеток	95–100%	Длительная персистенция адаптивно внесенных клеток. Нарушение репарации ДНК во всех клетках организма. Наличие небольшого количества Т- и В-лимфоцитов с олигоклональным репертуаром рецепторов
RAG–/– (RAG1–/– и/или RAG2–/–)	Нокаут генов активации рекомбинации RAG1 и RAG2 вместе или по отдельности. Отсутствие функциональных Т- и В-лимфоцитов	95–100%	Полное отсутствие функциональных Т- и В-клеток. Сохранность репарации ДНК в остальных клетках организма

Таблица 5

Риски клинического применения CAR-T и тест-системы для их обнаружения

Риск	Наличие модели *in vivo*
«Off-tumor on-target» эффекты	Нет
Синдром выброса цитокинов	Есть (сложные) — широко не используются
Нейротоксичность	Нет
Гематотоксичность	»
В-клеточная аплазия/гипогаммаглобулинемия	»
Вторичные злокачественные новообразования	»

Сергей Витальевич Сенников, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», в своем докладе «Доклинические исследования противоопухолевых Т-лимфоцитов с генетически модифицированным антиген распознающим рецептором» также поделился данными экспериментов оценки эффективности иммунотерапии солидных опухолей с помощью модифицированных Т-клеток трех вариантов.

- CAR Т-клеток, специфичных к GD2-ганглиозидному гликолипиду. Известно, что данная молекула экспрессируется в большом количестве при ряде опухолевых заболеваний, включая глиобластому, астроцитому, нейробластому, меланому и др.
- TCR-подобных CAR-T-клеток, специфичных к эпитопам опухолеассоциированного раково-тестикулярного антигена MAGE-A4. В TCR-подобных CAR-T-клетках рецептор CAR распознает пептид в контексте молекул главного комплекса гистосовместимости.
- TCR-T-клеток, специфичных к NY-ESO-1 — опухолеассоциированному антигену, экспрессирующемуся в клетках эпителиальных форм рака. В этом подходе Т-клетки, экспрессирующие трансдуцированный TCR, распознают пептид опухолеассоциированых антигенов в контексте молекул главного комплекса гистосовместимости.

Исследования *in vitro* включали в себя функциональные и фенотипические тесты, подтверждающие цитотоксическую активность по отношению к клеткам-мишеням, экспрессию различных маркеров, необходимых для эффективного уничтожения опухолевых клеток, а также повышение метаболической активности Т-клеток при взаимодействии с мишенью.

В рамках проведенных экспериментов *in vivo* показано, что линия мышей NRG (NOD.Cg-Rag1tm1Mom Il2rgtm1Wjl/SzJ) обладает высокой способностью по приживлению опухолевых клеточных линий, а сами клеточные линии отличаются по уровням экспрессии опухолеассоциированных белков и формируют ксенотрансплантат с разной эффективностью. Оптимальным оказалось использование мышей линии NRG и клеточной линии SK-MEL-37 (меланома) с высоким уровнем экспрессии целевых антигенов GD2, MAGE-A4 и NY-ESO-1 (Лопатникова Ю.А., Шевченко Ю.А. и соавт., 2023). Эксперименты по терапии солидной опухоли SK-MEL-37, полученной после трансплантации

животным, показали снижение размеров опухолевого узла при внутривенном и внутриопухолевом введении модифицированных Т-клеток человека всех трех вариантов. Максимальный цитотоксический противоопухолевый эффект был обнаружен при использовании генетически модифицированных лимфоцитов TCR-T против NY-ESO-1.

Генно-модифицированные мыши

Неоспоримую роль в исследованиях патогенеза наследственных генетических заболеваний, а также в разработке новых методов терапии играют генно-модифицированные мыши. Алексей Васильевич Дейкин, директор Объединенного центра генетических технологий НИУ «БелГУ», в своем сообщении «Доклинические исследования препаратов для терапии миодистрофии Миоши» поделился опытом доклинических исследований ГТЛП для лечения миодистрофии Миоши с использованием трансгенных мышей B6.A-Dysf^{prmd}/GeneJ (Bla/J).

Миодистрофия Миоши относится к поясно-конечностным мышечным дистрофиям, обширной группе наследственных заболеваний с выраженным клиническим полиморфизмом и значительной генетической гетерогенностью. Миодистрофия Миоши является орфанным заболеванием и относится к дисферлинопатиям (частота 7,4:1 000 000) с разнообразными мутациями в гене дисферлина *DYSF* (DYStrophy-associated Fer-1-like) (Федотов В.П., Рыжкова О.П. и соавт., 2016). Ключевая роль дисферлина — Ca^{2+} зависимая репарация участков повреждения сарколеммы.

Существует несколько подходов, направленных на лечение дисферлинопатий, в частности, такие как иммуномодулирующая терапия, использование стволовых клеток, заместительная и лекарственная терапия, а также генотерапевтические методы (Иванова А.В., Смирнихина С. А. и соавт., 2021; Деев Р.В., Мавликеев М.О. и соавт., 2014; Покровский М.В., Корокин М.В. и соавт., 2022). Особое внимание в настоящее время уделяется разработке препаратов именно генной терапии. В исследовании, представленном Алексеем Васильевичем, изучали эффективность двух оригинальных ГТЛП двухвекторной системы AAV.DYSF.OVERLAP с перекрывающимися последовательностями ДНК и ГТЛП на основе плазмидной ДНК, несущей полноразмерный ген дисферлина под специфическим промотором.

Для оценки эффективности разработанных оригинальных ГТЛП использовали трансгенных мышей B6.A-Dysf^{prmd}/GeneJ (Bla/J), которые несут ретротранспозон в 4-м интроне гена дисферлина, нарушающий процесс сплайсинга и синтез дисферлина. Было показано, что ультраструктурные изменения, наблюдаемые у мышей Bla/J с дефицитом дисферлина, коррелируют с таковыми, наблюдаемыми у пациентов с дисферлинопатией: распад сарколеммы, субсарколеммальные вакуоли накопления, дефекты в саркоплазматическом компартменте и липидные отложения в миофибриллах (Chernova O.N., Chekmareva I.A. и соавт., 2022). С использованием таких тестов, как «Перевернутая сетка», «Сила хватки», «Удержание на проволоке», «Вынужденное плавание с грузом», «Удержание животного на скользком вертикальном стержне», было установлено, что отсутствие экспрессии гена *Dysf*–/– у мышей сублинии Bla/J B6.ADysfprmd/GeneJ (Bla/J) может приводить к мышечной дистрофии. Фенотипические признаки патологии развивались с 12-й недели, максимум проявлений приходился на 24-ю неделю жизни животных. Патогистологические

фенотипические проявления болезни в целом неспецифичны и соответствовали данным прижизненного патолого-анатомического исследования у пациентов с дисферлинопатией (Корокин М.В., Кузубова Е.В. и соавт., 2022).

В использовании и создании трансгенных мышей есть и свои «подводные камни». Об ограничениях генной терапии, о проблемах создания подходящих генетических моделей заболеваний человека поделилась в своем докладе «Животные модели заболеваний человека для доклинических исследований генотерапевтических препаратов: проблемы и решения» Елена Ивановна Леонова, директор центра трансгенеза и редактирования генома Санкт-Петербургского государственного университета. Так, генная заместительная терапия в настоящее время не может быть применена к сложным многофакторным заболеваниям сетчатки, включая возрастную дегенерацию желтого пятна, глаукому и диабетическую ретинопатию, которые характеризуются полигенным типом наследования. К ограничивающим факторам генной терапии с помощью аденоассоциированных векторов относятся также их малая емкость, иммуногенность, а также трудности таргетной доставки в некоторые органы, например, в почки (Chen J., Liao S. и соавт., 2022).

Генетическая гетерогенность заболеваний накладывает существенные ограничения на разработку и применение стратегий для таргетной генной терапии. Например, разные гены могут давать один фенотип, а мутация в одном гене, которая располагается в разные его частях, абсолютно разные фенотипы. Примером является гемофилия В, рецессивное сцепленное с Х-хромосомой заболевание, вызванное мутацией в гене *f9*, кодирующем фактор свертывания крови IX (FIX). FIX представляет собой сериновую протеазу плазмы крови, которая отвечает за преобразование фактора X в его активную форму, тем самым запуская каскад коагуляции. Интересно, что клиническая картина заболевания может быть легкой, средней или тяжелой в зависимости от типа и положения мутации.

Доступность подходящих и легко генерируемых моделей на животных важна для доклинической оценки потенциальных методов лечения. Елена Ивановна поделилась опытом создания модели пигментного ретинита с нокаутом в гене *pde6b*. Пигментный ретинит — это тип наследственного заболевания сетчатки, которое вызывает медленную прогрессирующую дегенерацию сетчатки и потерю зрения. Причиной могут быть мутации во многих генах (порядка 300). Частота заболевания варьирует среди различных популяций от 1:3000 до 1:7000 человек. Известно, что субъединица Pde6b функционирует как часть гетеротетрамерного фермента, состоящего из α, β и двух γ-субъединиц ($\alpha\beta\gamma 2$), которые в норме регулируют уровень внутриклеточного циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) за счет его гидролиза. Поскольку Pde6b играет ключевую роль в фототрансдукции — процессе преобразовании света фоторецепторами в нервные импульсы, предполагается, что мутации в гене *pde6b* приводят к постоянному открытию катионных каналов, управляемых цГМФ, в мембране фоторецепторов, позволяющих избытку внеклеточных ионов кальция проникать в клетку и вызывать ее гибель в результате апоптоза. Полученная генетически сконструированная мышиная модель продемонстрировала клинические признаки пигментного аутосомно-рецессивного ретинита из-за делеции двух нуклеотидов в гене *pde6b*, приводящей к сдвигу рамки считывания и подавлению продукции данного белка. Поскольку ген *pde6b* мыши имеет ортологичные

отношения интрон-экзон, сравнимые с таковыми для человеческого гена *pde6b*, использование полученной мышиной модели заболевания пигментного аутосомно-рецессивного ретинита хорошо подходит для изучения нейропатологических процессов и механизмов заболевания, а также для разработки, тестирования и совершенствования терапевтических подходов[22].

Становится очевидным, что определение конкретной мутации в гене имеет решающее значение для понимания спектра симптомов и возможностей лечения. С этой точки зрения для разработки препаратов генной терапии необходимы персонализированные терапевтические стратегии, в том числе и создание соответствующих моделей для каждого отдельного пациента. Как подчеркнула Елена Ивановна, персонализированная модель генетического заболевания позволит оценить вклад обнаруженной мутации в фенотип, а также оценить потенциальную эффективность передовых технологий генной терапии. Конечно, это требует отдельного финансирования, в том числе грантов на разработку таких моделей, создание и поддержание соответствующих коллекций.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen J., Liao S., Xiao Z. et al. The development and improvement of immunodeficient mice and humanized immune system mouse models // Front. Immunol. 2022. N. 13. P. 1007579. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1007579.
2. Chernova O.N., Chekmareva I.A., Mavlikeev M.O. et al. Structural and ultrastructural changes in the skeletal muscles of dysferlin-deficient mice during postnatal ontogenesis // Ultrastruct. Pathol. 2022. Vol. 46. P. 359–367.
3. Filatova E.V. Transformer maze for the evaluation of the learning and memory in rodents // Heliyon. 2022. Vol. 21. N. 8(10). P. e11211. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e11211.
4. Guo C., Ma X., Gao F., Guo Y. Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing // Front. Bioeng. Biotechnol. 2023. N. 11. P. 1143157. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1143157.
5. Jang H., Kim H., Kim J. et al. A novel *ex vivo* angiogenesis assay based on electroporation-mediated delivery of naked plasmid DNA to skeletal muscle // Mol. Ther. 2004. N. 9 (3). P. 464–474. DOI: 10.1016/j.ymthe.2003.12.002.
6. Kamiyama Y., Naritomi Y., Moriya Y. et al. Biodistribution studies for cell therapy products: Current status and issues // Regenerative Therapy. 2021. N. 18. P. 202–216. DOI: 10.1016/j.reth.2021.06.005.
7. Koehler C.C., Hall L.M., Hellmer C.B. et al. Using Looming Visual Stimuli to Evaluate Mouse Vision // Journal of visualized experiments: JoVE. 2019. Vol. 148. P. 10.3791/59766. DOI: 10.3791/59766.
8. Novosad Y.A., Shabunin A.S., Enukashvily N. I. et al. The Wound-Healing Effect of a Novel Fibroblasts-Impregnated Hydroxyethylcellulose Gel in a Rat Full-Thickness Burn Model: A Preclinical Study // Biomedicines. 2024. N. 12. P. 2215. DOI: 10.3390/biomedicines12102215.

[22] Патент RU2791687C1 от 13.03.2023 г. «Метод создания и применение модели мышей с нокаутом гена PDE6B Российский патент 2023 года по МПК A01K67/27».

9. Prusky G.T., Alam N.M., Beekman S. Rapid quantification of adult and developing mouse spatial vision using a virtual optomotor system // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2004. N. 45(12). P. 4611–4616. DOI: 10.1167/iovs.04-0541.
10. Shan Y., Zhang M., Tao E. et al. Pharmacokinetic characteristics of mesenchymal stem cells in translational challenges // Signal Transduct. Target. Ther. 2024. N. 9(1). P. 242. DOI: 10.1038/s41392-024-01936-8.
11. Slobodkina E.A., Boldyreva M.A., Karagyaur M.N. et al. Therapeutic Angiogenesis by a "Dynamic Duo": Simultaneous Expression of HGF and VEGF165 by Novel Bicistronic Plasmid Restores Blood Flow in Ischemic Skeletal Muscle // Pharmaceutics. 2020. N. 12 (12). P. 1231. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121231.
12. Stafeev I.S., Boldyreva M.A., Michurina S.S. et al. The Efficacy of HGF/VEGF Gene Therapy for Limb Ischemia in Mice with Impaired Glucose Tolerance: Shift from Angiogenesis to Axonal Growth and Oxidative Potential in Skeletal Muscle // Cells. 2022. N. 11. P. 3824. DOI: 10.3390/cells11233824.
13. Vit J., Fuchs D., Angel A. et al. Visual-stimuli Four-arm Maze test to Assess Cognition and Vision in Mice // Bio Protoc. 2021. N. 11(22). P. e4234. DOI: 10.21769/BioProtoc.4234.
14. Аляутдин Р.Н., Романов Б.К., Яворский А.Н. и др. Оценка факторов риска средств передовой терапии // Безопасность и риск фармакотерапии. 2015. № 1. С. 7–12.
15. Астапова О.В., Берчатова А.А. Генотерапевтические препараты: аспекты доклинического изучения безопасности // Безопасность и риск фармакотерапии. 2023. № 11(1). С. 73–96. DOI: 10.30895/2312-7821-2023-11-1-329.
16. Деев Р.В., Мавликеев М.О., Бозо И.Я. и др. Генно-клеточная терапия наследственных заболеваний мышечной системы: современное состояние вопроса // Гены и клетки. 2014. № 9(4). С. 6–33.
17. Енукашвили Н.И., Коткас И.Е., Боголюбов Д.С. и др. Детектирование клеток, содержащих интернализованные мультидоменные магнитные наночастицы оксида железа (II, III), методом магнитно-резонансной томографии // Журнал технической физики. 2020. Т. 90. № 9. С. 1418–1427. DOI: 10.21883/JTF.2020.09.49671.402-19.
18. Иванова А.В., Смирнихина С.А., Лавров А.В. Перспективы этиотропного лечения дисферлинопатий // Вестник Российской академии медицинских наук. 2021. Т. 76. № 3. С. 307–316. DOI: 10.15690/vramn1379.
19. Корокин М.В., Кузубова Е.В., Радченко А.И. и др. Мыши B6. A-DYSFPRMD/GENEJ как генетическая модель дисферлинопатии // Фармация и фармакология. 2022. Т. 10. № 5. С. 483–496. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-5-483-496.
20. Леонова Е.И., Ротов А.Ю., Сопова Ю.В. Патент RU2791687C1 Метод создания и применение модели мышей с нокаутом гена pde5B.
21. Лопатникова Ю.А., Шевченко Ю.А., Филиппова Ю.В. и др. Разработка экспериментальных моделей ксенотрансплантата опухолей человека на мышах для доклинических исследований *in vivo* препаратов для клеточной иммунотерапии // Иммунология. 2023. Т. 44. № 6. С. 709–720. DOI: 10.33029/0206-4952-2023-44-6-709-720.
22. Меркулов В.А., Ягудина Р.И., Серпик В.Г. Глобальный спектр разработки инновационных лекарственных препаратов: описательный обзор // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2024. Т. 14. № 1. С. 14–28. DOI: 10.30895/1991-2919-2024-14-1-14-28.

23. Миндарь М.В., Лукбанова Е.А., Кит С.О. и др. Значение иммунодефицитных мышей для экспериментальных и доклинических исследований в онкологии // Сибирский научный медицинский журнал. 2020. Т. 40. № 3. С. 10–20. DOI: 10.15372/SSMJ20200302.
24. Покровский М.В., Корокин М.В., Краюшкина А.М. и др. Конвенциональные подходы к терапии наследственных миопатий // Фармация и фармакология. 2022. Т. 10. № 5. С. 416–431. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-5-416-431.
25. 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. DOI: 10.30895/2221-996X-2023-23-3-247-261.
26. Ротов А.Ю., Астахова Л.А., Ситникова В.С. и др. Новые экспериментальные модели фоторецепторной дегенерации сетчатки для скрининга молекулярных фотохромных блокаторов ионных каналов // Acta Naturae (русскоязычная версия). 2018. Т. 10. № 1(36). С. 79–89.
27. Руководство по биомедицинской экспертизе биомедицинских клеточных. Издание 2-е / под редакцией В.А. Меркулова. Москва: Мелга, 2023.
28. Слободкина Е.А., Карагяур М.Н., Балабаньян В.Ю. и др. Генная терапия в регенеративной медицине: последние достижения и Актуальные направления развития // Гены и клетки. 2020. Т. 15. № 1. С. 6–16. DOI: 10.23868/202003001.
29. Соловьева А.О., Зубарева К.Э., Повещенко А.Ф. и др. Способы мечения клеток для визуализации *in vivo* // Гены и клетки. 2013. Т. 8. № 4. С. 33–38.
30. Таубэ А.А., Аляутдин Р.Н., Меркулов В.А. и др. Разработка регуляторных подходов к управлению рисками применения биомедицинских клеточных продуктов в Российской Федерации // Фармация. 2021. Т. 70. № 5. С. 5–14. DOI: 10.29296/25419218-2021-05-01.
31. Терещенко В.П., Сенников С. В. Опухолевые ксенотрансплантаты как модель для доклинических испытаний генетически модифицированных клеточных препаратов // Иммунология. 2021. Т. 42. № 6. С. 730–741. DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-6-730-741.
32. Тихомирова А.В., Горячев Д.В., Меркулов В.А. и др. Доклинические и клинические аспекты разработки биомедицинских клеточных продуктов // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2018. Т. 8. № 1. С. 23–35. DOI: 10.30895/1991-2919-2018-8-1-23-35.
33. Федотов В.П., Рыжкова О.П., Поляков А.В. Миопатия Миоши: диагностика семейного случая дисферлинопатии // Нервно-мышечные болезни. 2016. Т. 6. № 1. С. 82–88.
34. Шакирова А.И., Лаушкина В.О., Гапоненко И.Н. и др. Ксенотрансплантация гемопоэтических стволовых клеток человека мышам линии NBSGW: базовая модель для доклинической разработки подходов генной терапии // Клиническая онкогематология. 2024. Т. 17. № 2. С. 82–93.
35. Попова М.О., Маркелов В.В. CAR-T: от идеи до применения // Онкогематология. 2024. Т. 19. № 3. С. 185–198. DOI: 10.17650/1818-8346-2024-19-3-185-198.
36. Галицына Е.В., Куликова Е.А., Павельев Ю.А. и др. Лекарственные препараты клеточной терапии: современное состояние исследований // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2024. DOI: 10.30895/2221-996X-2024–557.

Методология в доклинических исследованиях

https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-9-7-s5

А. А. Матичин[1], М. А. Абакумов[2], Д. В. Абрамочкин[3], И. В. Андреева[4], Л. О. Ахуба[5], А. Ю. Бородина[1], Д. А. Борозденко[2,6], Е. В. Виноградова[7], В. Г. Джинджолия[5], М. В. Журавлева[1], М. Н. Залялов[8], И. А. Зелинская[9], С. В. Зиновьев[10], И. Н. Исакова-Сивак[11], В. Н. Коробова[12], К. Л. Крышень[1], К. Н. Лапин[13], В. А. Пугач[8], Е. В. Симонова[1], А. А. Трунов[14], А.-П. С. Шурыгина[15]

[1] *АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,*
[2] *ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н. И. Пирогова» Минздрава России (Пироговский Университет),*
[3] *МГУ им. М. В. Ломоносова,*
[4] *ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского,*
[5] *ГНУ «Институт экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии»,*
[6] *ООО «Пептид Про»,*
[7] *АО «БИОКАД»,*
[8] *ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ,*
[9] *ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России*
[10] *ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России,*
[11] *ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,*
[12] *НИИ общей патологии ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России,*
[13] *НИИ ОР им. В. А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии,*
[14] *Ветеринарная клиника доктора Сотникова,*
[15] *ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России*

Не существует универсальной экспериментальной модели, которая подходила бы для всех видов исследований. Каждая модель разрабатывается для конкретной цели и обладает своими преимуществами и ограничениями. Чтобы результаты исследований на животных были воспроизводимыми, необходима стандартизация экспериментальных моделей. Это достигается путем соблюдения одинаковых условий проведения эксперимента и применения стандартных методов (Jilka R.L., 2016). Стандартизация позволяет не только повысить качество исследований, но и расширить, а также углубить научные данные. Например, правильно подобранная стандартизированная экспериментальная модель помогает лучше понять стадии разви-

тия патологии и исследовать ее на различных уровнях. Кроме того, стандартизация условий эксперимента повышает информативность методических приемов и исключает факторы, которые могут увеличить разброс экспериментальных данных.

В рамках конференции были рассмотрены различные методологические подходы к планированию экспериментов на животных и способов оценки физиологических функций организма, что позволяет обеспечивать сопоставимость результатов оценки качества данных, получаемых в разных учреждениях.

Важность проведения исследований, направленных на изучение потенциальных нежелательных эффектов веществ со стороны физиологических функций на доклиническом этапе разработки лекарственных средств, была отмечена руководителем отдела специфической токсикологии и фармакодинамики АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» Александром Алексеевичем Матичиным в докладе «Исследования фармакологической безопасности». Докладчик отметил, что для корректного проведения такого рода исследований необходим адекватный подход к выбору тест-систем, которыми могут выступать биологическая, химическая, физическая системы или аналитическое оборудование. Основным условием выбора лабораторных животных является их релевантность: схожесть строения и функций органов и систем с таковыми у человека, которые определяют метаболические пути и метаболиты, размер животных (возможность введения вещества путем, аналогичным используемому в клинической практике, проведения инструментальных и лабораторных исследований в необходимом объеме). Например, исследование готовой лекарственной формы без разрушения ее целостности можно провести только на крупных животных. Также немаловажным является размер выборки, подобранный с должным обоснованием, который позволит корректно оценить и интерпретировать результаты.

В рамках сессии «Практические вопросы исследования фармакологической безопасности» были рассмотрены методологические подходы по изучению функционального состояния сердечно-сосудистой системы (ССС). Была отмечена необходимость изучения таких параметров, как частота сердечных сокращений (ЧСС), артериальное давление (АД), результаты электрокардиографии (ЭКГ), а также оценки реполяризации и проводимости миокарда (*in vitro* и *ex vivo*).

Абрамочкин Д.В., заведующий кафедрой физиологии человека и животных МГУ им. М.В. Ломоносова, в своем докладе «Оценка воздействия соединений на каналы Kv11.1 (hERG) методом whole-cell пэтч-кламп» описал метод *whole-cell* пэтч-кламп, позволяющий регистрировать как ионные токи, так и мембранный потенциал в нативных, в первую очередь в возбудимых, клетках (кардиомиоцитах, нейронах, гладкомышечных клетках), так и в гетерологических экспрессионных системах, и являющийся в настоящее время основным методом клеточной электрофизиологии. Метод идеально подходит для оценки влияния различных соединений на каналы KV11.1 (hERG). Каналы hERG ионного тока Ikr — основная мишень для антиаритмических препаратов III класса. Однако избыточное подавление тока IKr в желудочковых кардиомиоцитах, приводящее к замедлению реполяризации, выражающемуся на ЭКГ как удлинение интервала QT, увеличивает вероятность индукции жизнеугрожающих желудочковых аритмий по механизму триггерной активности. Поэтому все вещества-кандидаты должны проходить проверку на способность подавлять активность каналов hERG. Наилучшим решением этой задачи является использование *whole-cell*

пэтч-кламп для регистрации тока, переносимого каналами hERG, в трансфицированных геном *KCNH2* клетках стандартных клеточных линий (CHO-K1, HEK и др.), либо в аналогичных клетках, обладающих стабильной экспрессией каналов hERG.

В докладе «Крысы как тест-система оценки функционального состояния сердечно-сосудистой системы» научного сотрудника отдела экспериментальной фармакологии и токсикологии АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» Антонины Юрьевны Бородиной были рассмотрены методы оценки функционального состояния ССС на крысах, их релевантность как тест-системы, а также результаты собственных исследований по определению данных показателей при разном наркозе. У данных животных можно установить ЧСС, измерить АД, регистрировать ЭКГ, а также проводить уточняющие исследования — эхокардиографию (ЭхоКГ) с оценкой сердечного выброса и сократимости желудочков. А.Ю. Бородина отметила, что чаще всего ЧСС у крыс определяют в комплексе с измерением ЭКГ, но также возможен подсчет с помощью пальпации боковой части грудной клетки с левой стороны. Регистрацию АД и ЭКГ на грызунах можно проводить инвазивными методами с помощью телеметрических систем и неинвазивными способами с применением тканевых жилеток с датчиками, которые надевают на грызунов, или фиксаторов с установленными датчиками. Широкое распространение получили методы неинвазивных подходов регистрации параметров ССС. Так, для рутинного измерения систолического АД используется специализированное оборудование, оснащенное хвостовой манжетой.

В своем докладе Антонина Юрьевна подчеркнула, что использование анестезированных животных дает некоторые преимущества по сравнению с животными, находящимися в сознании, — это позволяет снижать межиндивидуальную вариативность параметров, обусловленных стрессом и двигательной активностью животных. В случае использования наркоза рекомендуется регистрировать исходные значения, что дает возможность определить особенности конкретного животного. Также при выборе анестезирующих средств необходимо осуществить поиск источников литературы и исторических данных с целью определения препарата и его дозы, имеющих достаточную эффективность при наименее выраженном влиянии на ССС. Несмотря на то что ионные механизмы реполяризации у взрослых крыс и мышей отличаются от таковых у человека и более крупных видов животных, у которых отсутствует фаза плато, использовать крыс в доклинических исследованиях допустимо, поскольку строение сердца и основные физиологические механизмы, обеспечивающие функционирование ССС, сходны с таковыми у человека и крупных животных.

Виктория Николаевна Коробова, доцент кафедры патофизиологии, заведующая лабораторией патофизиологии сердца НИИ общей патологии ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, в своем докладе «Использование показателей вариабельности сердечного ритма в оценке нейрогуморальной регуляции у крыс Вистар» подняла вопрос оценки нейрогуморальной регуляции у крыс на основе вариабельности сердечного ритма (ВСР) при различной физической нагрузке. ВСР — это физиологическое явление, проявляющееся в изменении интервала *RR* между двумя соседними сердечными циклами. Однако имеется другое определение, которое включает более глобальные состояния — это физиологический гомеостатический процесс функционирования системы кислородообеспечения, заключающийся в изменении соб-

ственной ритмической активности синусового узла в ответ на действие комплекса нервных и гуморальных метаболических факторов. В проведенном исследовании был применен принцип экстраполяции методики оценки функционального состояния человека на крыс, при этом физическую нагрузку обеспечивали при помощи тредмила. На основе изученных показателей были выявлены животные с высокими и низкими значениями спектра (ВЗС и НЗС соответственно). Для животных с ВЗС были характерны преобладание парасимпатических влияний и высокая мобилизация автономного контура саморегуляции сердечного ритма, что свидетельствует о высоких адаптационных возможностях организма. Животные с НЗС характеризовались выраженной симпатикотонией на фоне физической нагрузки и активной мобилизацией центрального контура управления сердечным ритмом. При этом половых различий выявлено не было. Полученные результаты позволяют спланировать дальнейшие исследования, связанные с ВСР.

Также на конференции был рассмотрен доклад «Электрокардиограмма крысы в постреанимационном периоде после асфиксической остановки кровообращения» Лидии Александровны Варнаковой, младшего научного сотрудника лаборатории экспериментальных исследований НИИ ОР им. В.А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии, целью которого было выявить нарушения при ЭКГ у крыс при асфиксической остановке кровообращения и оценить их динамику и эффективность реанимационных мероприятий в раннем постреанимационном периоде. На фоне реанимационных мероприятий наблюдали восстановление показателей кислотно-основного состояния крови, нормального АД и параметров ЭКГ, что свидетельствовало об успешно проведенных реанимационных мероприятиях у животных после экспериментальной асфиксической остановки кровообращения.

Как дополнительный метод оценки фармакологической безопасности ССС возможно проведение ЭхоКГ у лабораторных видов животных. ЭхоКГ можно выполнять как у крупных видов животных, так и мелких, например, грызунов. В своем докладе «Эхокардиография в ветеринарии» Артем Альбертович Трунов, ветеринарный врач-кардиолог Ветеринарной клиники доктора Сотникова, поделился опытом проведения ЭхоКГ в ветеринарной практике. В докладе были рассмотрены основные патологии сердца у собак и кошек, такие как эндокардиоз (изменение клапанов), дилатационная и гипертрофическая кардиомиопатия.

Системы неинвазивной визуализации, в частности, магнитно-резонансная томография (МРТ) у лабораторных животных, были представлены в докладе «Системы неинвазивной визуализации лабораторных животных в доклинических исследованиях» доцента ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (Пироговский Университет) Максима Артемовича Абакумова. Сейчас выпускается отдельная линейка приборов МРТ для животных, их разрешение превосходит таковое у оборудования, используемого в клинической практике. Применение данного метода позволяет сократить количество животных, используемых в экспериментах, поскольку для оценки состояния внутренних органов не требуется эвтаназия животных, а конкретные данные можно изучать в динамике. Кроме того, появляется возможность учесть индивидуальные особенности животных на момент начала эксперимента, что помогает правильно интерпретировать результаты. Наконец, существует воз-

можность проведения МРТ сердца в режиме реального времени, что дает возможность фиксировать определенные фазы или весь цикл его сокращения. В ходе исследования могут быть измерены такие показатели сердца, как толщина стенок желудочков, объем желудочков, фракции выброса и сократимость, визуализирован артериальный кровоток (ангиография).

Еще один метод визуализации кровотока представлен научным сотрудником лаборатории экспериментальных исследований НИИ ОР им. В.А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии Константином Николаевичем Лапиным. В докладе «Метод лазерной спекл-контрастной визуализации (ЛСКВ) в исследованиях периферического кровотока у мелких лабораторных животных» приведены примеры использования метода лазерной спекл-контрастной визуализации (ЛСКВ) в исследованиях периферического кровотока у мелких лабораторных животных. При помощи данного метода можно исследовать морфологические и функциональные изменения кровотока и перфузии биологических тканей *in vivo*. ЛСКВ позволяет исследовать большую площадь поверхности, что снижает пространственную вариабельность изменений, и оценить перфузию разных участков органа или смежных органов. Докладчик представил результаты исследований, в ходе которых наблюдали снижение кровотока в коже конечностей при геморрагическом шоке и остром гипоксическом нарушении в коре головного мозга после остановки сердцебиения у крыс. Метод ЛСКВ применяется при церебральных ишемиях и ишемических инсультах, черепно-мозговых травмах, ангиогенезе, диабете, ишемии конечностей и др.

В докладе «Влияние пищевого нагрузочного теста на показатели гемодинамики крыс различного возраста» профессора кафедры клинической ультразвуковой и функциональной диагностики ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского Ирины Владимировны Андреевой рассмотрено влияние пищевого нагрузочного теста на показатели гемодинамики крыс различного возраста. В настоящее время хорошо изучены возрастные изменения в артериальной системе, при этом в венозной недостаточно, поскольку отсутствуют критерии различий между нормальным процессом возрастной перестройки сосудистой системы и патологическими изменениями макро- и микрогемодинамики. В ходе исследования проводили определение показателей гемодинамики печени, ее функционального резерва и влияние пищевого нагрузочного теста на них, изучены возрастные изменения стенки воротной и каудальной полой вен, а также брюшного отдела аорты животных.

Болезни органов дыхания являются одной из главных причин смертности во всем мире. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2019 г. наиболее смертельной группой инфекционных заболеваний были пневмония и другие инфекции нижних дыхательных путей, занявшие четвертую строчку в списке ведущих причин смерти. Основной вклад в структуру смертности от болезней органов дыхания вносят хронические болезни нижних дыхательных путей (Клокова Т.А., Какорина Е.П. и др., 2020). В Российской Федерации с начала XXI века заболеваемость органов дыхания значительно выросла с 317,2 случая на 1000 населения в 2000 г. до 407,1 случая в 2021 г. (26,8%) (Антонов Н.С., Сахарова Г.М. и др., 2023). Данная тенденция сохраняется, что подтверждается более новыми данными Росстата: к 2022 г. количество случаев заболеваний органов дыхания составило 469,5

на 1000 населения. Основными заболеваниями дыхательной системы являются пневмония, астма и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ). В работе И.В. Самородской и соавт. (2023 г.) были рассчитаны стандартизированные коэффициенты смертности (СКС) на 100 000 населения России за 2019–2021 гг. от болезней органов дыхания по регионам, которые описывают структуру респираторной заболеваемости. Среднерегиональное значение СКС по всем заболеваниям органов дыхания (МКБ-10 J00-J99) на 2021 г составило 71,04 случая на 100 000 населения. Примерно половину из этих заболеваний (на 100 000 населения) занимает пневмония без уточнения возбудителя (31,9 случая), далее следуют ХОБЛ (15,31), вирусная пневмония (11,83), бактериальная пневмония (5,2), гнойные и некротические состояния нижних дыхательных путей (2,15), респираторные болезни, поражающие главным образом интерстициальную ткань (2,1), острые пневмонии (0,83), астма (0,62) и др. В сравнении с 2019 г. авторы отмечали прирост СКС при пневмонии без уточнения возбудителя и вирусной пневмонии, связанный с начавшейся пандемией COVID-19. При этом СКС от самого COVID-19 на 2021 г. составил 222,41 случая на 100 000 населения (Самородская И.В., Болотова Е.В. и др., 2023).

Причины развития заболеваний органов дыхания могут быть следующие:

- инфекционные — всевозможные вирусы, бактерии, грибы, попадая в организм, могут вызывать воспалительные заболевания органов дыхания (бронхит, пневмонию);
- аллергические — множество аллергенов (пыльцевые, пищевые, бытовые), с которыми ежедневно приходится контактировать, способствуют развитию реакции организма на некоторые аллергены и, как следствие, заболеваниий органов дыхания (бронхиальная астма);
- наследственные — предрасположенность к развитию некоторых заболеваний может заключаться и в наследственном аппарате (генах).

Не стоит забывать и о вредных привычках (курение, злоупотребление алкоголем), которые также способствуют развитию заболеваний органов дыхательной системы.

Переохлаждение и снижение иммунитета могут стать причинами возникновения заболеваний органов дыхания.

Согласно данным ВОЗ, показатели выявления и лечения таких заболеваний, как астма и ХОБЛ, находятся на недостаточно высоком уровне в странах с низким и средним уровнем дохода, к которым относят и Российскую Федерацию. В связи с этим для эффективной разработки и оценки лекарственных препаратов, направленных на лечение органов дыхания, необходимы релевантные модельные патологии дыхательной системы, воспроизведенные на животных.

Как указал в своем докладе старший научный сотрудник ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, кандидат медицинских наук Сергей Викторович Зиновьев «Особенности функциональной морфологии легких у крыс» проблема релевантности заключается в наличии анатомических различий в строении органов дыхания животных, которых используют для моделирования «человеческой» патологии. На примере крысы лектор показал, что в отличие от человека, в правом легком крысы выделяется 4 доли: верхушечная, сердечная, диафрагмальная и добавочная; в левом — 2: краниальная и диафрагмальная. В каудальном отделе диафрагмальной доли левого

легкого крыс имеется каудальная легочная вена, которая отсутствует у человека. Было продемонстрировано, что по органометрическим характеристикам левое легкое крыс совпадает с параметрами вторичной дольки легкого человека. Следующая особенность строения легких крыс — это низкое количество иннервации дистальных трубчатых систем и паренхимы легкого при наличии высокого уровня иннервации корня легких. Значительным отличием в строении дыхательной системы грызунов лектор назвал моноподиальное ветвление дыхательных путей (у человека симметричное дихотомическое), а также отсутствие бронхиол, бокаловидных клеток, бронхиальных желез и хрящевых тканей в долевых внутрилегочных бронхах. Все это привело к высокой резистентности грызунов к воспалительным процессам в тканях легких, поскольку дыхательные пути крупнее и лишены слизистых желез. Однако из-за меньшего абсолютного диаметра дыхательных путей введение большего количества частиц может вызвать обструкцию дыхательных путей и смерть после введения грызунам. Отсутствие респираторных бронхиол у мышей и крыс способствует выведению нерастворимых частиц через терминальные бронхиолы. При этом лектор обратил внимание на наличие клеток бронхиального секрета или мокроты в просвете бронхов грызунов, что необходимо учитывать, поскольку данный признак является одним из симптомов заболеваний органов дыхательной системы. В сравнении с человеком у грызунов отмечается более быстрая диффузия газов и гидрофобных молекул за счет тонкого (относительно человека) воздушно-гематического барьера. В конце доклада лектор пришел к выводу, что у крыс имеются конструктивные особенности легких, изменения которых в случае патологического воздействия окружающей среды имеют медицинскую целесообразность, так как результаты их оценки можно экстраполировать на человеческий организм.

Немаловажным также является вопрос грамотного построения дизайна с точки зрения выбора оцениваемых показателей. Виктория Александровна Пугач, старший научный сотрудник ФГБУ «ГНИИИ ВМ» Министерства обороны России, в своем докладе «Клинико-лабораторные и морфофункциональные показатели при остром повреждении легких в эксперименте» акцентировала внимание на оценке информативности различных показателей на модели острого повреждения легких (ОПЛ) у кроликов. В представленном докладе ОПЛ у животных отождествляют с острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС) у человека. На конференции экспертов по ОРДС, проведенной в Берлине в 2011 г., было принято новое международное определение ОРДС. В новом определении во избежание путаницы было решено отказаться от термина ОПЛ, а ОРДС разделить на 3 степени тяжести в зависимости от индекса оксигенации (PaO_2/FiO_2) (Ярошецкий А.И., Грицан А.И. и др., 2020). Берлинские критерии включают физиологические, рентгенологические и клинические показатели, которые характеризуют наличие двустороннего отека легких и выраженность нарушения оксигенации в крови. Для экспериментальных животных подобный диагностический эквивалент отсутствует. С целью оценки состояния животных при ОПЛ обычно используются инструментальные (плетизмография, пульсоксиметрия, рентгенография), лабораторные [оценка крови и бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ)] и морфологические методы. Дизайн эксперимента, представленного в докладе, подразумевал моделирование повреждения легких у кроликов путем интратрахеального введения липополисахарида в дозе 20 мг/кг.

Таблица 1

Оцениваемые показатели на модели острого повреждения легких у кроликов

Методы исследования	Показатель
Инструментальные	• Масса тела • Температура тела • ЧДД, ЧСС • Степень угнетения
Лабораторные	• Общий и биохимический анализы крови • Газы/электролиты крови • Коагулограмма • Биомаркеры воспаления и дисфункции эндотелия (в крови и бронхоальвеолярном лаваже; всего 21 биомаркер) • Анализ протеома (в крови и бронхоальвеолярном лаваже) • Общий белок, ЛДГ (в бронхоальвеолярном лаваже)
Морфологические	• Определение массового коэффициента легких • Гистологическое исследование

Примечание. ЧДД — частота дыхательных движений, ЧСС — частота сердечных сокращений, ЛДГ — лактатдегидрогеназа.

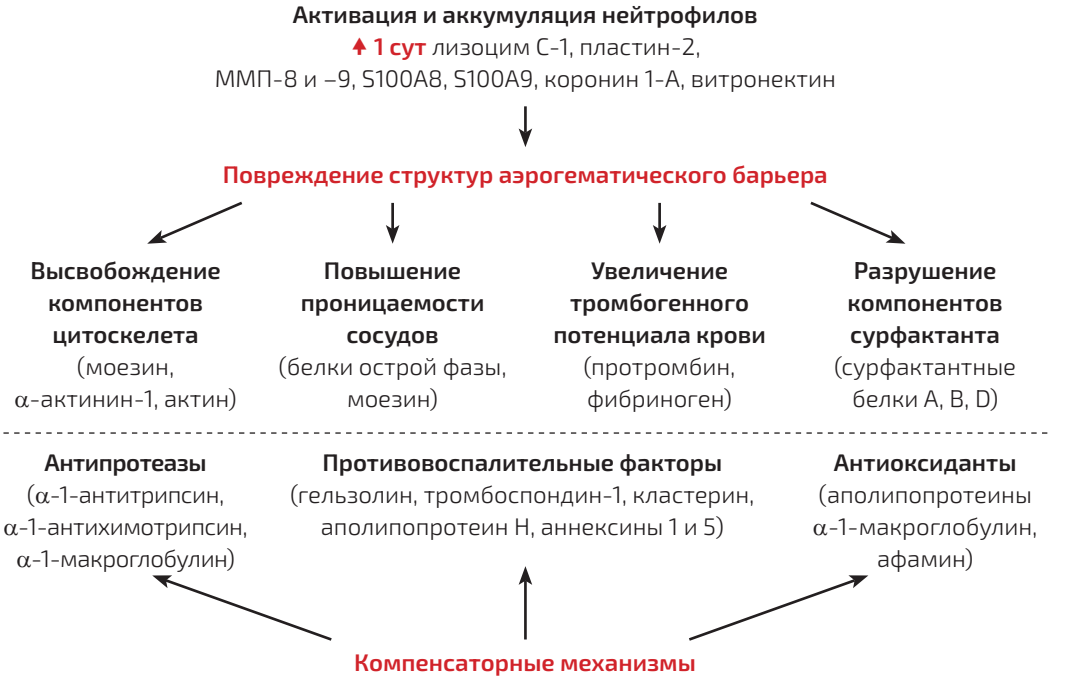


Рис. 1. Биомаркеры, характеризующие основные молекулярно-клеточные взаимодействия в ткани легких кроликов

Представленные в таблице 1 показатели не являются специфичными только для модели ОПЛ, но также могут использоваться в ходе других экспериментальных моделей поражения легких.

На фоне экспериментальной патологии высокую корреляцию с выраженностью отека легких выявляли для таких показателей, как динамика массы тела, температуры тела, изменение сатурации, уровень растворимых фибрин-мономеров (РФМК), концентрация фибриногена и лабораторных показателей БАЛЖ [содержание общего белка, лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и количество нейтрофилов]. При этом по результатам анализа зависимости чувствительности от специфичности (ROC-анализа) снижение массы тела, увеличение РФМК и фибриногена в крови, повышение общего белка, лактатдегидрогеназы и количества нейтрофилов в БАЛЖ имели максимальные значения чувствительности и специфичности по отношению к степени выраженности отека легких.

Если говорить о биомаркерах, высокую корреляцию с выраженностью отека легких в крови имели интерлейкин-18 (ИЛ-18), синдекан-1, sP-селектин и sE-селектин; в бронхоальвеолярном лаваже — ИЛ-18, синдекан-1, нейтрофильная эластаза и эндотелин-1. Диагностическая ценность данных показателей также была подтверждена результатами ROC-анализа.

Комплекс результатов протеомного анализа БЛЖ позволил выявить сочетание биомаркеров, которые характеризовали процессы активации и аккумуляции нейтрофилов в ткани легких, а также свидетельствовали о повреждении структур аэрогематического барьера (рис. 1).

Подводя итог доклада, лектор предлагает для стандартизации экспериментальных моделей ОРДС и проведения доклинических исследований использовать показатели, свидетельствующие о повышении проницаемости аэрогематического барьера (увеличение массового коэффициента легких; повышение общего белка и ЛДГ в БАЛЖ), о развитии местной воспалительной реакции (патоморфологические изменения, увеличение количества нейтрофилов в БАЛЖ) и о системных проявлениях ОРДС (снижение массы тела и сатурации; увеличение РФМК и фибриногена в крови). Нейтрофильная эластаза и эндотелин-1 обладают высоким потенциалом для оценки выраженности местной воспалительной реакции в легких, тогда как показатели адгезионной дисфункции эндотелия (sP- и sE-селектин) информативны для оценки системных проявлений ОРДС. В качестве универсальных биомаркеров местных и системных изменений при ОРДС могут быть рекомендованы ИЛ-18 и синдекан-1. Нецелевой скрининг протеома в доклинических исследованиях перспективен для идентификации новых и наиболее характерных сочетаний биомаркеров при данной патологии.

Несмотря на завершение пандемии COVID-19 в 2023 г. (WHO, 2023), до сих пор остается актуальным разработка новых терапевтических и профилактических препаратов против SARS-CoV-2, поскольку данные вирусы прочно закрепились в популяции людей и постоянно изменяют свои антигенные свойства, что позволяет вирусам избегать действия иммунитета, выработанного к предыдущим вариантам коронавируса, что приводит к регулярным сезонным вспышкам заболевания во всем мире. При этом с начала пандемии COVID-19 в срочном порядке приходилось проводить большой объем исследований, что поставило вопрос выбора и обосно-

вания простых и достаточных критериев для постоянного непрерывного скрининга новых лекарственных средств, поскольку именно такой подход лежит в основе глобальной стратегии по борьбе с инфекционными заболеваниями.

В рамках конференции был представлен доклад заведующей лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» Ирины Николаевны Исаковой-Сивак «Доклиническое исследование интраназальной вакцины для комбинированной профилактики сезонного гриппа и COVID-19», в котором был представлен возможный дизайн эксперимента по оценке эффективности комбинированных вакцин на экспериментальных животных. В качестве модельных животных в докладе были представлены сирийские хомячки и макаки-резус. Заражение животных проводили путем интраназального введения вируса через 3 недели после 2-й иммунизации исследуемой вакциной. В качестве вирусных штаммов для заражения использовали вирус гриппа H7N9 в дозе 10^6 EID_{50} для сирийских хомячков и SARS-CoV-2 в дозе 10^5 $TCID_{50}$ и 10^5 PFU для сирийских хомячков и макак-резусов соответственно. В качестве возможных оцениваемых показателей в докладе были представлены оценка массы тела, клинического состояния животных, патоморфологическое исследование тканей легких и оценка титра вируса в тканях легких и носовых ходов. Важным суррогатным критерием эффективности вакцин от гриппа и COVID-19 также могут служить уровни вирусспецифических Т-клеток памяти, формируемых в ответ на иммунизацию. В исследованиях И.Н. Исаковой-Сивак Т-клеточный ответ оценивался с использованием методов проточной цитометрии и ELISPOT, при этом иммунные клетки экспериментальных животных стимулировались *in vitro* цельными живыми вирусами гриппа и SARS-CoV-2, что обеспечивает полное покрытие эпитопного состава формируемого специфического Т-клеточного ответа на вакцинацию.

Как подчеркнул Максим Назимович Залялов, младший научный сотрудник ФГБУ «ГНИИИ ВМ» Министерства обороны России, в своем докладе «Опыт стандартизации экспериментальной модели SARS-CoV-2-инфекции на сирийских хомяках» при планировании исследования не только стоит обращать внимание непосредственно на дизайн эксперимента (выбор тест-системы, дозы заражения, схемы вакцинации, оцениваемых показателей), но также и осуществлять контроль подготовки, хранения и оценки активности культуры вируса перед каждым экспериментом. Поскольку работа может происходить с потенциально опасными агентами, необходимо производить контроль условий микроклимата (системы ИВК), строго соблюдать разграничительные меры при работе с интактными животными во избежание их случайного заражения, а также контаминации исследуемых биообразцов в процессе или после отбора. Немаловажным моментом является однотипная и согласованная со всеми исполнителями маркировка групп животных и проб биоматериала.

В рамках сессии «Методология в доклинических исследованиях» были рассмотрены вопросы касательно проведения и ключевых особенностей стандартных и модифицированных подходов к моделированию широкого спектра патологий. Так, в своем докладе «Моделирование железодефицитной анемии у крыс методом системного воспаления и субхронической кровопотери» младший научный сотрудник ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (Пироговский Университет) и менеджер по доклиническим исследованиям ООО «Пептид ПРО» Денис Андре-

евич Боровозенко представил наиболее актуальную на сегодняшний день модель для воспроизведения железодефицитной анемии на крысах, позволяющую длительно испытывать потенциальные лекарственные средства. В основе механизма хронической анемии лежит влияние гепсидина как одного из пептидов, регулирующих метаболизм железа. При воспалительном процессе или при увеличении концентрации железа идет снижение не только абсорбции железа в кишечнике, но и поступления железа в эритроциты из красного костного мозга и селезенки. Введение липополисахарида (ЛПС) приводит к увеличению экспрессии гепсидина. Было проведено сравнительное изучение субхронической (14 дней) кровопотери и кровопотери на фоне введения ЛПС, по результатам которого выявлено, что такая методика вызывает более выраженную анемию у крыс обоих полов (снижение как уровня эритроцитов, гемоглобина, так и самого железа в плазме крови), чем модель простой субхронической кровопотери. Снижение гемоглобина сохранялось в модели простой кровопотери до 14 дней, а с введением ЛПС до 28 суток после окончания моделирования. Также ЛПС вызывал снижение массы тела животных и умеренную воспалительную реакцию, что соответствует клиническим проявлениям анемии хронических заболеваний.

В докладе «Особенности моделирования дислипидемии на трех видах приматов» заведующей лабораторией биохимических исследований крови ГНУ «Институт экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии» Ларисы Отаровны Ахуба рассматривались особенности моделирования дислипидемии, лежащей в основе многих заболеваний, таких как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, ожирение, метаболический синдром и др. Экспериментальное моделирование проводили на трех видах приматов — яванских макаках, павианах гамадрилах и макаках-резусах. Ключевой особенностью исследования являлось повышение калорийности рациона от 1,5 до 2 раз с содержанием термически модифицированных и трансизомерных жиров не менее 6% от массы (17% от общей калорийности). Рацион экспериментальных животных строился на увеличении количества углеводов в пище. В него входили продукты с определенным уровнем калорий.

Результаты исследования показали, что видовая специфичность определяет диапазон и ограничения возможных исследований. Для корректной интерпретации результатов моделирования необходимо учитывать генетические, биохимические и поведенческие особенности используемых видов низших приматов. По результатам проведенного исследования было выявлено:

- у яванских макак двукратный прирост уровня общего холестерина и ЛПНП;
- у павианов гамадрилов полуторакратный прирост общего холестерина;
- у макак-резусов статистически значимое увеличения уровня глюкозы.

В рамках конференции также обсуждались особенности проведения молекулярно-генетических исследований, направленных на создание таргетных препаратов с использованием генно-инженерных технологий. Между организмом животных и человека существуют ключевые отличия в строении молекул-мишеней, на которые направлено действие препаратов иммунной терапии, в связи с чем оценка их эффективности требует более специфического подхода.

Так, в своем докладе «Сравнительная характеристика моделей для оценки специфической активности препаратов для иммунотерапии опухолевых заболеваний»

Е.В. Виноградова, старший научный сотрудник АО «Биокад», поделилась опытом проведения исследований на гуманизированных моделях с человеческими иммунными клетками (NK-клетки и миелоидные клетки), а также сообщила о ключевых особенностях, на которые стоит обратить внимание при выборе той или иной модели. Результаты исследования позволили выявить несколько параметров, которые важно учитывать при проведении исследования препаратов иммунной терапии, таких как механизм действия кандидата и его мишени, продолжительность исследования, учитывающая стремительность развития опухолевых состояний, а также выбор эффекторных клеток для действия лекарственного препарата.

Как было отмечено, чтобы добиться экспрессии человеческих иммунных клеток, необходимы дополнительные поддерживающие сигналы человеческих цитокинов. В моделях с NK-клетками необходимы сигналы от ИЛ-15 или ИЛ-2, а если эффект препарата реализуется через миелоидные клетки, то в данном случае необходимо постоянное продуцирование уже других человеческих цитокинов. В докладе продемонстрирована работа с линией мышей hNOG-EXL, в которой продуцируются человеческий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМКСФ) и ИЛ-3. В результате исследования показано, что помимо миелоидных клеток, которые приживались при экспрессии обозначенных цитокинов, в крови и селезенке отмечалось присутствие регуляторных Т-клеток, которые также способствовали инфильтрации опухолевых клеток. Учитывая данный факт, представленная модель может быть использована для препаратов, действие которых направлено против иммуносупрессивного микроокружения опухоли. У линии мышей hNSG-SGM3 экспрессируются уже 3 человеческих цитокина — ИЛ-3, ГМКСФ и фактор стволовых клеток KITLG, поэтому в данном случае возможно приживление большего набора человеческих клеток, в том числе и дендритных.

Таким образом, несмотря на все трудности и проблемы, которые все еще существуют в процессе планирования и проведения исследований на животных, результаты конференции показывают, что мы движемся в сторону большей стандартизации методов проведения экспериментов и улучшения возможности применения полученных данных в различных областях.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jilka R.L. The Road to Reproducibility in Animal Research // Journal of Bone and Mineral Research. 2016. Vol. 31. N. 7. P. 1317–1319. DOI: 10.1002/jbmr.2881.
2. Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic // WHO. 2023. URL: https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic (дата обращения: 10.2024).
3. Антонов Н.С., Сахарова Г.М., Русакова Л.И., Салагай О.О. Динамика заболеваемости болезнями органов дыхания среди населения Российской Федерации в 2010–2022 гг. // Медицина. 2023. Т. 11. № 3. С. 1–17. DOI: 10.29234/2308-9113-2023-11-3-1-17.

4. Клокова Т.А., Какорина Е.П., Мадьянова В.В. Особенности заболеваемости и смертности населения Российской Федерации от болезней органов дыхания в сравнении с зарубежными странами // Проблемы стандартизации в здравоохранении. 2020. № 7–8. С. 54–63. DOI: 10.26347/1607-2502202007-08054-063.
5. Самородская И.В., Болотова Е.В., Дудникова А.В. Динамика и структура смертности от болезней органов дыхания и COVID-19 в Российской Федерации за 2019–2021 гг. // Клиническая медицина. 2023. Т. 100. № 11–12. С. 535–539. DOI: 10.30629/0023-2149-2022-100-11-12-535-539.
6. Ярошецкий А.И., Грицан А.И., Авдеев С.Н. и др. Диагностика и интенсивная терапия острого респираторного дистресс-синдрома // Анестезиология и реаниматология. 2020. № 2. С. 5–39. DOI: 10.17116/anaesthesiology20200215.

Лабораторные животные вне эксперимента

https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-9-7-s6

М. А. Акимова[1], Е. Д. Бондарева[1], Д. Ю. Акимов[1], Н. В. Добаджян[2], Т. З. Каландия[2], Е. А. Литвинова[8], М. Л. Ловать[3], А. З. Матуа[2], К. С. Милутинович[3], А. В. Панченко[4], Д. А. Салминьш[5], Е. А. Снижко[1], В. С. Соколова[1], Е. В. Сурушкина[6], А. В. Усатов[9], А. С. Хоцкина[7]

[1] *АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,*

[2] *ГНУ «Институт экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии»,*

[3] *МГУ им. М. В. Ломоносова,*

[4] *Курчатовский комплекс медицинской приматологии ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»,*

[5] *ООО «Фармбиолайн»,*

[6] *ЗАО «Тосненский комбикормовый завод»,*

[7] *ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН»,*

[8] *ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный технический университет» (НГТУ НЭТИ),*

[9] *АНО «АВТех»*

Практически все доклады сессии «Лабораторные животные вне эксперимента» так или иначе затрагивали вопросы качества животных — от рассмотрения оборудования для содержания животных до проблем стандартизации иммунитета животных категории SPF.

Качество животных, поступающих в эксперимент, во многом зависит от правильно выстроенных процессов и механизмов управления лабораторным животноводством на доэкспериментальном этапе (Smith A.J. и соавт., 2017). Сфера доклинических исследований в этой части всегда находится в состоянии непрерывного развития, используя различные инструменты для повышения качества экспериментов и эффективности процессов, которые постоянно меняются в условиях технологического прорыва, подхватывают и учитывают современные тенденции.

Риск-ориентированный подход и стандартизация

Среди инструментов повышения качества в доклинических исследованиях удобен, экономичен и выгоден риск-ориентированный подход.

В рамках V конференции GLP-PLANET прошел мастер-класс по применению такого подхода на практике. Мастер-класс «GLP. Риск-ориентированный подход» проходил в формате ситуационной игры, и в этом году был сделан акцент на рисках, связанных с мониторингом здоровья животных. Участникам было необходимо выявить значимость рисков (различных патогенов) для конкретного региона и разработать программу мониторинга здоровья лабораторных животных. В ходе мастер-класса удалось применить метод оценки рисков — анализ видов и последствий отказов (FMEA), определить актуальный перечень патогенов для животных, выращенных в России, и предложить упреждающие меры по возникновению очагов инфекции.

На сессии «Лабораторные животные вне эксперимента» применение риск-ориентированного подхода подробнее было рассмотрено Елизаветой Александровной Снижко. В своем докладе «Риск-ориентированный подход к мониторингу здоровья лабораторных грызунов» Елизавета Александровна акцентировала внимание на перечне патогенов (бактериальных и вирусных) для проведения мониторинга здоровья лабораторных грызунов: крыс, морских свинок, хомячков. Список патогенных агентов широкий и чаще всего ориентируется на международные рекомендации, не всегда подходящие для неоднородной эпидемиологической ситуации на территории нашей страны. Более того, часто упускается из виду, что международные рекомендации призывают не следовать им вслепую, а пересматривать перечень в зависимости от своего географического положения и эпидемиологической ситуации. Применение риск-ориентированного подхода как раз позволяет сузить список патогенов для прицельного поиска более значимых и актуальных инфекционных агентов в питомниках и виварии.

Стоит отметить, что программы мониторинга здоровья не должны ограничиваться только контролем микробиологического статуса. Для поддержания здоровья животных проводятся самые разные мероприятия, среди них контроль иммунитета.

Екатерина Анатольевна Литвинова на V конференции GLP-PLANET выступала с докладом о стандартизации иммунитета лабораторных животных категории SPF (доклад «Стандартизация иммунитета spf-животных»). На иммунитет животных могут влиять различные бактерии (как их наличие, так и отсутствие), физические факторы и многое другое, поэтому иммунитет животных необходимо контролировать. Екатерина Анатольевна в своем докладе предлагает варианты мониторинга иммунитета, методы и подходы анализа иммунитета, среди них определение массы иммунокомпетентных органов, анализ формулы крови, общего количества лейкоцитов, иммуноферментный, мультиплексный анализы и др. Предложена схема для «начинающих» с этапами процесса контроля иммунитета.

Екатерина Анатольевна для стандартизации рассматривала только определенную группу лабораторных животных, свободных от специфических патогенов (specific pathogen free — SPF). Концепция стандартных SPF животных развивалась с 1960-х годов. Препятствием на пути к этому служит размытое понимание термина и отличающиеся характеристики таких животных в разных испытательных центрах. При анализе истории появления термина «SPF» (specific pathogen free), одной из самых популярных категорий лабораторных животных, означающей отсутствие специфических патогенов у лабораторных животных (доклад Бондаревой Евгении Дмитриевны «Категории животных, история появления SPF»), было выявле-

но, что этот термин скорее бытовой, чем научно-практический, и не имеет под собой никаких научных или профессиональных обоснований.

Изначально использовалось сразу несколько терминов для обозначения одних и тех же животных: «disease free» (свободные от болезней), «pathogen free» (свободные от патогенов), «specific pathogen-free — SPF» (свободные от специфических патогенов), «cesarean-derived» (животные, полученные с помощью кесарева сечения) и «clean» (чистые животные). Таким образом, исследователи сталкивались с проблемой обозначения конкретного типа животных, не имея по-настоящему описательной терминологии. Со временем прижился один из вышеперечисленных терминов, который сейчас все знают, — «specific pathogen-free» (SPF).

Технически животное, свободное даже от одного специфического патогена, можно обозначить как SPF. Наверняка в практике такое встречается редко, но вопросы все же остаются. Можно ли вообще не осуществлять контроль на основании полного перечня известных патогенов у животных? Есть ли смысл проводить мониторинг полного перечня микроорганизмов при содержании животных в закрытой барьерной системе и опираться на известную историю микробиологического статуса одной колонии? Кроме того, достаточно ли термина «SPF» для суждения о качестве лабораторных животных?

Последний вопрос подняла у себя в докладе «Категории животных, история появления SPF» Евгения Дмитриевна Бондарева. В качестве обширного дополнения к термину «SPF» (и в перспективе — метода стандартизации) было предложено использование системы идентификации качества животных для наглядной демонстрации глубины мероприятий по поддержанию и улучшению благополучия животных тест-систем. Предлагаемая система идентификации (рабочее название LAQIS — Laboratory Animals Quality Identification System) представляет собой специальную систему определения качества лабораторных животных, где оценка основана на нескольких условиях и разнообразии мониторинговых мероприятий. В качестве заключения по результатам оценки предлагается использовать шкалу качества LAQS (Laboratory Animals Quality Scale), по которой можно присвоить лабораторным животным так называемый *балл качества*, позволяющий быстро определить надежность тест-системы, основное назначение животных, подходящие экспериментальные исследования и др.

Для внедрения системы идентификации качества животных «в массы» необходимы участие профильного научного сообщества, сплоченная работа по улучшению и унификации показателей идентификации. С этой целью создана рабочая группа Quality animals, в которую приглашаются все желающие (e-mail: Sci.secretary@glp-planet.com), и начата работа по реализации соответствующих публикаций в научном журнале «Лабораторные животные для научных исследований».

Благополучие лабораторных животных

Правильно выстроенный процесс и подбор оборудования для содержания и ухода за животными необходимы для установления и поддержания надлежащего уровня их благополучия. Условия содержания могут значительно повлиять даже на самые

тщательно спланированные исследования. Поэтому важно уделять должное внимание удовлетворению потребностей животных на протяжении всей их жизни.

Вопросам содержания на конференции были посвящены несколько докладов.

Скученное содержание животных приводит к частым дракам и, как следствие, ухудшению их благополучия, что также может негативно сказаться на результатах исследований. В процессе онтогенеза животные растут и набирают массу, а следовательно, требуется их отсадка друг от друга. Предоставление достаточной площади пола позволяет реализовывать потребность животных в компании себе подобных и обеспечивает проживание гармоничными группами.

В своем докладе «EMERAT 1050. Самая компактная и вместительная клетка для крыс» продакт-менеджер ООО «Фармбиолайн» Дайнис Андрисович Салминьш сообщил, что их компания предлагает к продаже клетку EMERAT 1050, площадь пола которой была увеличена на 150 см^2, что позволяет размещать в ней в среднем на 1 крысу больше. Это важный фактор для долгосрочных исследований, когда животные набирают массу, и требуется их рассадка, но при этом может нарушаться целостность экспериментальной группы. Кроме того, клетки изготовлены из высококачественных материалов, что обеспечивает возможность их автоклавирования. Также в клетках имеются встроенные кормушки, что значительно облегчает уход за животными.

Компания AWTech (доклад «Российское оборудование для работы с лабораторными животными: от систем содержания до гуманного вывода из эксперимента» кандидата химических наук, директора НОЦ «АВТех» Усатова Александра Васильевича,) также представила серию стеллажных систем, производимых на заводе в Санкт-Петербурге, с большим выбором пластиковых клеток из полипропилена, поликарбоната и полисульфона для конвенционального содержания грызунов. В рамках проводимой компанией политики импортозамещения представлен стеллаж для содержания лабораторных кроликов «Евразия Плюс» в виде блока из трех клеток, который полностью отвечает мировым стандартам, таким как «Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и иных научных целях» (ETS 123) и Директива 2010/63/EU. Предлагаемые компанией системы для содержания животных в индивидуально-вентилируемых клетках (ИВК) включают различные виды стеллажей, рассчитанные на разное количество клеток для мышей, крыс, морских свинок, кроликов, как из пластика, так и нержавеющей стали, которые сопрягаются с вентиляционным блоком «ВЕНТ-БИО-2М», отличительной чертой которого является универсальность не только в плане совместимости со стеллажами разных производителей, но и функциональной оснащенности, обеспечивающей уникальную гибкость использования установки, что позволяет пользователю с помощью только одного устройства реализовывать или перестраивать систему ИВК под любые задачи. В этом блоке реализованы высокотехнологичная модель дистанционного контроля и управления, продуманная система предупредительной сигнализации и оповещении персонала об ошибках в системе, а также напоминания о смене поилок, о замене клеток и кормлении животных. Необходимо отметить, что на вентблок «ВЕНТ-БИО-2М» выдано заключение от Минпромторга России о подтверждении производства промышленной

продукции на территории Российской Федерации (Реестровый номер № 10532962). Кроме систем содержания теплокровных наземных животных, компания предлагает лабораторную установку «АКВАФИШ-БИО-1М», оснащенную автономным модулем циркуляции и фильтрации воды, стеллажом с резервуарами для содержания рыб и подсветкой со светодиодными светильниками, что в совокупности обеспечивает оптимальные условия содержания рыб вида Danio rerio. В качестве бонуса предлагается проект лаборатории для проведения доклинических исследований на моделях *Danio rerio*.

Поддержание надлежащего уровня благополучия лабораторных животных тесно связано с высококачественным и высокотехнологичным оборудованием для обеспечения и сопровождения рутинных манипуляций с лабораторными животными (пересадка SPF-животных в чистые клетки, введение препаратов перорально, подкожно, внутримышечно, внутрибрюшинно и внутривенно), для проведения малоинвазивных хирургических вмешательств, в том числе эндоскопических, имплантации катетеров или биомедицинских устройств и др. Для этих целей идеально подходит предлагаемая компанией AWTech (ГК «АВТех) универсальная ламинарная станция «ПРОМЕТЕЙ» с однонаправленным нисходящим потоком HEPA фильтрованного воздуха в рабочей зоне и двусторонним доступом персонала, в которой, как и в другой разработке компании — ламинарной станции для ухода за животными и чистки клеток, реализуется «золотое правило» барьерной системы — защита животных и персонала от кросс-контаминации. К станции «ПРОМЕТЕЙ» могут прилагаться подогреваемые столики, широко используемые для размещения и фиксации животных. Кроме проведения экспериментальных исследований на лабораторных животных, в этой станции удобно проводить гуманный вывод животных из эксперимента с использованием уникальной установки для проведения CO_2-эвтаназии лабораторных животных «ЭВТАНАЙЗЕР-2М», которая может применяться как для рутинной эвтаназии (по предустановленному протоколу), так и для научно-исследовательских и экспериментальных работ в испытательных центрах за счет возможности реализовывать программируемые параметры изменения концентрации CO_2, следить за протеканием процесса, создавать свои собственные протоколы эвтаназии, хранить до 12 программ с различными режимами подачи углекислого газа, что обеспечивается микроконтроллером с программным обеспечением собственной разработки компании. Все указанное оборудование исключительно российского производства.

Условия содержания могут влиять и на вариабельность формирования патологий. Лаборант, аспирант МГУ им. М.В. Ломоносова Ксения Стевановна Милутинович в своем докладе «Влияние условий содержания на проявление симптомов ВЗК (воспалительные заболевания кишечника) у самцов и самок muc2-/- мышей» рассказала о проблеме стандартизации модели колоректального рака. Проанализировав литературу, лектор пришла к выводу, что одной из возможных причин вариабельности могут являться условия содержания. Для проверки гипотезы она решила сравнить влияние условий содержания на развитие патологии, разделив животных на 2 группы: 1-я содержалась в индивидуально вентилируемых клетках, и потомство одного выводка рассаживалось, учитывая пол (самцов отдельно

от самок); 2-я — в клетках открытого типа, а потомство размещалось не только с учетом пола, но и генотипа muc2-/-. На основании соотношения длины ворсинок кишечника, длины толстого и тонкого кишечника, количества иммунного инфильтрата, уровня TNF-α в крови, наличия корреляции между уровнем TNF-α и длиной ворсинок кишечника, а также уровнем TNF-α и количеством иммунного инфильтрата установили, что содержание в клетках открытого типа и формирование групп по генотипу позволяют эффективнее контролировать развитие симптомов воспалительного заболевания кишечника. Данный факт подтверждает прямое влияние условий содержания на тест-систему.

Немаловажным аспектом зоотехнии лабораторных животных является кормление. Ведущий научный сотрудник кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова Максим Львович Ловать подвел итоги длительной работы и представил доклад «Влияние рациона кормления на биохимические и морфологические параметры мышей». Максим Львович провел исторический обзор к истокам зарождения идеи о качестве кормов. Первая работа об оценке влияния кормления на привес и качество жизни животных была опубликована в 1949 г. В ней сообщалось, что кормление сбалансированным рационом по сравнению с однородными использовавшимися тогда интуитивно подобранными смесями значительно улучшает состояние шерсти, общий внешний вид, а также привес животных (Bruce H.M., Parkes A.S., 1949). При этом комплексный анализ физиологических параметров животных не проводился. В СССР состав натурального корма для лабораторных животных был отражен в Приказе № 163 Минздрава СССР от 10 марта 1966 г. На его основе в 1976 г. был разработан сухой рацион AIN-76A, который с некоторыми модификациями был принят в большинстве стран в качестве стандартного. Тем не менее анализ данных литературы о параметрах биохимии крови, микроскопии, скорости роста животных и др. показывает, что переход к данному рациону привел к значительным изменениям метаболизма грызунов. В настоящем исследовании Максим Львович показал выраженные различия в морфологии и биохимии печени и крови в зависимости от типа кормления (стандартный рацион от разных производителей, смесь натуральных компонентов, а также влияние сытости мышей) и выдвинул следующие гипотезы:

1) стандартный корм всех исследованных производителей избыточен по калориям (и, возможно, недостаточно сбалансирован);
2) животные, получающие стандартный корм, малочувствительны к 12-часовому голоду (и, возможно, к другим метаболическим нагрузкам), а значит плохо моделируют некоторые метаболические патологии;
3) при публикации обязательно следует указывать вид корма, было ли его лишение накануне отбора проб, а также время этого лишения.

Внешняя экономическая и политическая обстановка, а также запрет Россельхознадзора на ввоз кормов из-за рубежа затрудняют доступ к специализированным кормам, что может стать проблемой для доклинических исследований, так как в ряде исследований такие диеты требуются для формирования алиментарных патологий. Однако директор по развитию ЗАО «Тосненский комбикормовый завод» Екатерина Владимировна Сурушкина в своем докладе «Специальные диеты

Таблица 1

Состав и показатели питательности типового корма для лабораторных животных

Состав	Показатели питательности	
Травяная мука Белковое сырье растительного происхождения Зерновые Продукты переработки зерна Меласса Витаминно-минеральный премикс Растительные масла Пивные дрожжи Аминокислоты	Обменная энергия	Не менее 9,0 МДж/кг
	Сырой протеин	12,5%
	Сырой жир	2,7%
	Сырая клетчатка	20,0%
	Лизин	0,75%
	Ca	0,52%
	P	0,37%
	NaCl	0,34%

для проведения экспериментальных исследований. Промышленное производство или самостоятельное приготовление. Возможности импортозамещения» поделилась опытом изготовления высокохолестериновых диет для кроликов с целью формирования модели атеросклероза. Корм был изготовлен с концентрацией 1% холестерина и 8% жиров (табл. 1).

В исследованиях показано, что повышенный уровень в крови общего холестерина, холестерина липопротеинов низкой плотности и триглицеридов наряду с низкой концентрацией холестерина липопротеинов высокой плотности увеличивает риск развития коронарной болезни сердца с атеросклерозом.

Завершая свой доклад, Екатерина Владимировна призвала представителей лабораторного животноводства к диалогу по теме импортозамещения диетических кормов.

На сегодняшний день ЗАО «Тосненский комбикормовый завод» производит линейку кормов для лабораторных крыс, мышей, морских свинок, кроликов, минипигов и приматов.

Качество жизни лабораторных животных напрямую влияет и на их воспроизводство. В своем докладе «Влияние условий содержания на уровень рождаемости и развитие потомства лабораторных мышей» младший научный сотрудник Института цитологии и генетики СО РАН Анна Станиславовна Хоцкина выделила факторы стресса, влияющие на репродукцию (табл. 2).

Лектор поделилась опытом изучения влияния содержания животных в индивидуально-вентилируемых клетках (ИВК) и клетках открытого типа на показатели их воспроизводства. Анна Станиславовна отметила, что в открытых клетках процент яловости самок ниже, чем в ИВК, на 23%, а выживаемость потомства до 21 дня оказалась значительно выше в ИВК-системе — 94% против 72% в конвенциональных клетках. Кроме того, лектор также отметила, что в ИВК-системах потомство развивалось быстрее, что обосновала полученными данными о наборе массы тела,

Таблица 2

Факторы среды обитания, влияющие на воспроизводство лабораторных животных

Источник	Влияние	Литература
Стресс	Стресс во время беременности может привести к уменьшению размера помета у мышей	V. Garcia-Flores и соавт., 2020
Обогащение среды	В обогащенных условиях снижается уровень каннибализма самками крыс новорожденных детенышей	T.F. Salisu и соавт., 2021
Шум	Возникающий из-за работы оборудования звук частотой 40 Гц нарушает материнское поведение крыс при вскармливании детенышей	J.J. Lohmiller и соавт., 2020, R.A. Carman и соавт., 2007
Частота смены клеток	Смертность детенышей была выше при частоте смены клетки раз в 7 дней по сравнению с 14 или 21 днем	C.K. Reeb-Whitaker и соавт., 2001
Гнездовой материал	Снабжение гнездовым материалом снижает смертность детенышей	B.N. Gaskill и соавт., 2013

результатами тестов на переворачивание и отрицательный геотаксис. В обоих случаях (как в открытой, так и закрытой системе) содержались SPF-животные. Выбор системы содержания остается за каждым испытательным центром, он индивидуален и зависит от производительности, доступных ресурсов центра и др.

Нечеловекообразные приматы. Выбор вида, карантин, адаптация, тренинги и формирование базы референсных интервалов на доэкспериментальном этапе

На сегодняшний день, несмотря на развитие альтернативных моделей, методов *in vitro* и *in silico*, лабораторные обезьяны остаются незаменимыми тест-системами в экспериментальной биологии и медицине. Появление биотехнологических препаратов, в том числе моноклональных антител (МАТ), потребовало внесения изменений в существующие подходы к доклинической разработке препаратов. Для многих МАТ единственной релевантной тест-системой являются Nonhuman primates (приматы, кроме человека) и, следовательно, в доклинических исследованиях может быть использован только этот вид лабораторных животных. В своем докладе «Трансляционный потенциал низших обезьян как биомоделей человека» доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии НИЦ «Курчатовский институт» Андрей Владимирович Панченко отметил, что использование низших обезьян в доклинических исследованиях должно быть рациональным с научной точки зрения и соответствовать принципу

«трех R». Андрей Владимирович говорил о том, что трансляционный потенциал лабораторных приматов имеет ряд ограничений, как и у других лабораторных животных. Лектор отмечал, что у низших обезьян значимо бóльшая степень социальной, физиологической, анатомической, генетической гомологии с человеком по сравнению с грызунами.

В докладе также было представлено сравнение некоторых эпитопов у макак и человека. Панели антител и полученные данные доступны онлайн (https://flowrepository.org/id/FR-FCM-Z2Z7) в качестве ресурса, который полезен для планирования исследований, сравнивающих иммунные реакции у разных видов при оценке терапевтических средств (Bjornson-Hooper Z.B. и соавт., 2022). В качестве примера приведен ряд иммунологических различий:

- CD16 человека (рецептор FCγ типа III) аффинен к IgG1 и IgG3. CD16 макаки аффинен к IgG1 и IgG2, отсутствует на гранулоцитах (Rogers K.A. и соавт., 2006);
- антитела к CD33 (маркер миелоидных клеток) человека связываются с гранулоцитами у макак (данные двух лабораторий), а у человека — с моноцитами и классическими дендритными клетками (Bjornson-Hooper Z.B. и соавт., 2022);
- рецептор Fcγ CD16 обнаружен на гранулоцитах у людей и черных мангабеев, но не у макак или павианов (Bjornson-Hooper Z.B. и соавт., 2022);
- CD56 — маркер NK-клеток у людей экспрессируется на моноцитах макак (Bjornson-Hooper Z.B. и соавт., 2022).

Для биотехнологических препаратов, включая МАТ к новым мишеням или с новой структурой, доклиническая оценка может быть критически важной, при соблюдении принципа релевантности исследуемый вид должен иметь специфичный эпитоп для МАТ и адекватную чувствительность к возникновению фармакологического и побочного эффектов.

Низшие обезьяны — незаменимый инструмент изучения генетически опосредованных многофакторных, нейродегенеративных и метаболических заболеваний.

В продолжении темы востребованности нечеловекообразных приматов прозвучал доклад «Стратегия выбора вида приматов для проведения доклинических исследований» заместителя директора по научной работе, заведующей лабораторией иммунологии и вирусологии ГНУ «Институт экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии» Алисы Зауровны Матуа. Лектор рассказала, что среди обезьян Старого Света хорошо адаптируются к жизни в неволе макаки-резусы, макаки яванские, павианы гамадрилы и павианы анубисы. Алиса Зауровна отметила, что павианы гамадрилы и анубисы удобны для изучения высшей нервной деятельности, сердечно-сосудистой системы, репродуктивной физиологии, контрацепции и эпидемиологии опухолевых заболеваний, тогда как макак-резусов и яванских макак преимущественно следует использовать для исследований в области инфекционных заболеваний, нейрофармакологии, токсикологии, поведения и иммунологии.

В частности, Алиса Зауровна рассказала о проблемах выбора вида и возраста узконосых обезьян, наиболее подходящих для доклинических испытаний на примере

коклюшной инфекции. Для формирования инфекционного заболевания использовали 6 особей макак-резусов в возрасте от 5 лет и по 2 особи в возрасте от 3 до 5 лет макак-резусов, яванских, японских макак и павианов гамадрилов. В эксперименте установлено, что во всех группах заболевание протекает так же, как и у человека, это говорит о высокой релевантности данных тест-систем и выбранного возраста. В конце своего доклада А.З. Матуа резюмировала: для наиболее верного выбора вида обезьян стоит исходить прежде всего из межвидовой экстраполяции и максимальной трансляционности исследования, а также из стоимости и удобства выполнения планируемого эксперимента.

Немаловажным этапом работы с лабораторными животными является хендлинг, который позволяет приучить животных на доэкспериментальном этапе к дальнейшим манипуляциям в рамках исследований, а также улучшить контроль их поведения, что в свою очередь повышает безопасность проведения экспериментов и их качество. Помимо облегчения сбора данных, которые можно было бы получить другими, возможно, более стрессовыми способами, хендлинг также позволяет собрать информацию при менее нервозной обстановке для животного. Например, сбор образцов крови у взрослых обезьян без анестезии (Schapiro S.J., Everitt J., 2006).

В своем докладе «Приучение яванских макак к экспериментальным процедурам» главный ветеринарный врач АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» Дмитрий Юрьевич Акимов поделился опытом проведения карантина адаптации и акклиматизации яванских макак, ввезенных из Вьетнама. Лектор выделил основные проблемы и пути их решения, данные приведены в табл. 3.

Кроме того, лектор подчеркнул, что проведение тренингов в течение 45 дней приводило к значимому снижению времени на выполнение процедур (табл. 4).

Дмитрий Юрьевич отметил хорошую обучаемость яванских макак, и что данный экспериментальный этап помогает улучшить качество как эксперимента, так и благополучия животных.

Как и для грызунов, для приматов среда обитания имеет большое значение. Виталий Владимирович Киселев, заместитель генерального директора по производству и получению биоматериалов ООО «КролИнфо», в своем докладе «Содержание приматов вне эксперимента» рассказал о собственном опыте. Животные в этой организации содержатся в помещениях с автоматическими регулируемыми параметрами микроклимата, при этом ведется постоянный мониторинг здоровья животных. В кормлении животных не используются антибиотики. Своевременно выполняются лечебные и профилактические мероприятия. Животные имеют доступ к вольерам для выгула (рис. 1).

Заключая свой доклад, Виталий Владимирович высказал мнение, что содержание приматов является достаточно дорогостоящим, сложным, многокомпонентным процессом, требующим глубоких знаний в приматологии, а также любви и заботы к животным.

Продолжая тему приматов, ветеринарный врач АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» Вера Сергеевна Соколова выступила с докладом «Опыт разработки методов оценки постнатального развития яванских макак в рамках изучения репродуктивной токсичности». Вера Сергеевна рассказала о процессе установления референсных

Таблица 3

Основные этапы приучения яванских макак к экспериментальным процедурам

Параметр	Этап проведения карантина					
	Адаптация				Хендлинг	Тренинг
Фактор	Формирование новой зоосоциальной группы	Цикл день/ночь	Рацион кормления	Прочие	Приучение к персоналу	Приучение к процедуре
Описание проблемы	Животные устанавливают иерархию, что ведет к травмам	Циркадные ритмы из-за смены часовых поясов не совпадают с циклом день/ночь в новом питомнике	Изменение рациона может приводить к диарее, отказу от непривычного корма	Приучение к новому типу клеток, температуре, влажности и т.д.	Животные испытывают страх и недоверие к новому персоналу	Стресс. Непокорность животных увеличивает время выполнения манипуляции
Воздействие на проблему	Превентивно: габапентин 15–30 мг/кг в сутки. Изоляция агрессивных, реже рецессивных особей. Оказание ветеринарной помощи пострадавшим животным	Изменение стандартного графика работы и освещения в месте пребывания согласно графику, который был в питомнике поставщика с постепенным смещением в стандартные параметры	Превентивно: про- и пребиотики. Постепенное включение новых ингредиентов и исключение привычных	Создание максимально приближенных к прежнему месту обитания условий с постепенным смещением в стандартные параметры	Создание условий, в которых животные чувствуют себя безопасно и могут доверять человеку	Проведение тренингов

Окончание таблицы 3

Параметр	Этап проведения карантина					
	Адаптация				Хендлинг	Тренинг
Кто выполняет	Ветеринарный врач	Ветеринарный врач/зоотехник	Зоотехник	Ветеринарный врач/зоотехник	Лаборант-исследователь, выполняющий роль тренера. Зоолаборант, осуществляющий кормление и выдачу среды обогащения	Лаборант-исследователь
Длительность приучения	У самок от 1 до 3 дней, у самцов от 3 до 5 дней с момента поступления	От 4 до 7 дней с момента поступления	От 7 до 14 дней с момента поступления	До 1–7 дней с момента поступления	С момента поступления	Начиная с 7 дня. В зависимости от обучаемости животного первые результаты могут быть на 14-й день проведения тренингов
Длительность проведения адаптации, хендлирования и тренингов	С момента поступления до 14 дней				Проводится регулярно в течение жизни	

Таблица 4

Среднее время, затраченное на выполнение процедур до и после тренингов

Манипуляция	Среднее время на выполнение манипуляций программы тренингов ± ошибка среднего, мин	
	До реализации	После реализации
Самцы		
Пероральное введение	17,8±1,2	4,7±0,44
Внутримышечное введение	19,3±0,92	9,1±0,48
Подкожное введение	19,9±1,22	7,1±0,43
Венепункция	20,8±0,72	11,6±0,42
Взвешивание	25,9±1,13	8,4±0,34
Перемещение в транспортной клетке	33±1,38	20,1±0,66
Самки		
Пероральное введение	16±0,53	3,2±0,32
Внутримышечное введение	23,6±0,55	7,4±0,54
Подкожное введение	21,1±0,6	8,8±0,6
Венепункция	21,6±0,85	10,8±0,68
Взвешивание	21,6±0,72	8±0,21
Перемещение в транспортной клетке	30,2±0,65	16,2±0,68

Рис. 1. Варианты вольерного размещения нечеловекообразных приматов в условиях ООО «КролИнфо» (официальный сайт https://кролинфо.рф/photoalbums/342878/photos/page/2)

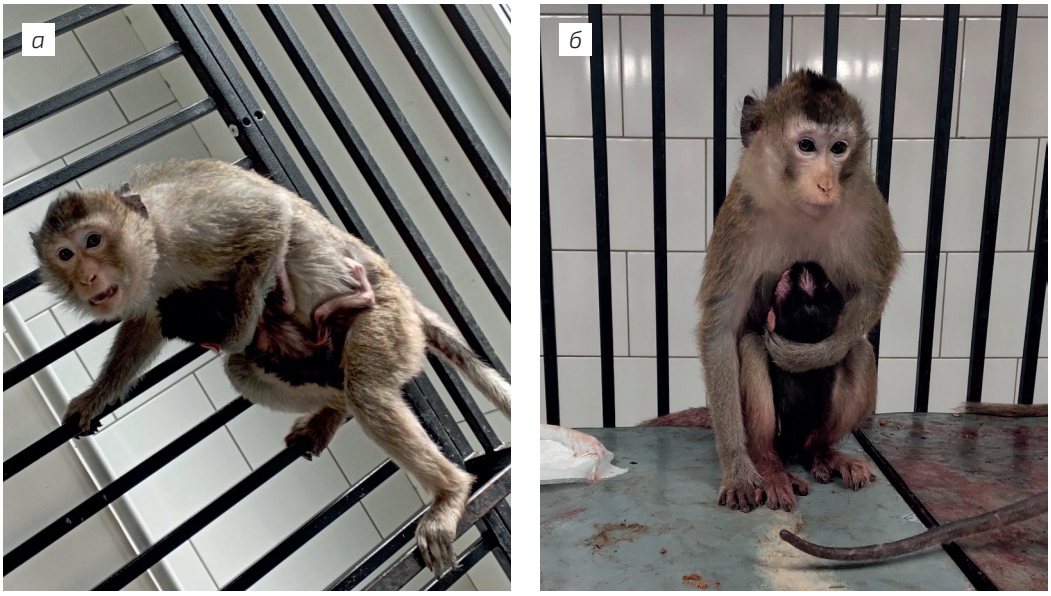


Рис. 2. Влияние тренинга на взаимодействие матери с персоналом

значений показателей развития потомства приматов. В ходе работы она выделила следующие основные этапы:

- создать безопасные и комфортные условия работы с животными;
- установить критерии развития, которые будут использоваться для оценки;
- определить методы сбора данных;
- разработать систему отслеживания и документирования результатов;
- обозначить действия ветеринарного врача при обнаруженных патологиях.

Важно, чтобы животные допускали контакт, позволяли дотрагиваться до своих конечностей, головы и живота, давали себя погладить. Это направлено на то, чтобы при исследовании детенышей самки не наносили им травм в попытке защитить потомство. В качестве примера лектор привела обезьяну, которая ранее агрессивно защищала свое потомство (рис. 2, *а*), но после тренировок стала более доброжелательной (рис. 2, *б*).

Для каждой популяции, живущей в определенной лаборатории, зачастую требуется установление референсных интервалов (РИ) для тех или иных параметров. Grasbeck R. и Saris N.-E. ввели концепцию популяционных эталонных значений в 1969 г. для описания изменений концентраций анализируемых веществ в крови в хорошо охарактеризованных группах здоровых людей. Позднее, в 80-х годах XX века, Lumsden C.J. и его коллеги начали применять данную концепцию в ветеринарии. Референсные значения обычно указываются в виде РИ, охватывающих 95% здорового поголовья (Arnold J.E. и соавт., 2019).

Теона Зурабовна Каландия, заведующая лабораторией экспериментальной гематологии ГНУ «Институт экспериментальной патологии и терапии Академии наук

Абхазии», в докладе «Сравнительный анализ гематологических показателей у двух видов низших приматов (*Macacca mulatta* и *Macacca fascicularis*), содержащихся в Сухумском питомнике», рассказала о своем опыте формирования базы норм. Кровь отбирали у 116 макак-резусов и 75 яванских макак обоего пола в возрасте от 4 до 25 лет. Теона Зурабовна рассказала, что при сопоставлении данных между двумя видами были выявлены отличия в более высоких показателях гемоглобина, MCV, MCH, MCHC у макак-резусов по сравнению с яванскими макаками. Она отметила, что у яванских макак более высокое содержание палочкоядерных нейтрофилов и лимфоцитов. При сравнении общего количества лейкоцитов статистическая разница была отмечена в группе самок, у самцов подобной разницы нет (табл. 5). Т.З. Каландия закончила свой доклад, сообщив, что обнаруженные различия могут оказать влияние на результаты экспериментов и должны учитываться при выборе вида животных.

В продолжение темы формирования базы данных и сравнения показателей приматов с человеком выступила младший научный сотрудник ГНУ «Институт экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии» Нвард Вардановна Добаджян с докладом «Сравнение биохимических референсов различных видов нечеловекообразных обезьян и человека». Нвард Вардановна рассказала, что на базе института были обследованы 193 человека, макаки-резусы — 94 головы и павианы гамадрилы — 57 голов. Лектор отметила, что у приматов значения внутриклеточных ферментов и показатели альфа-амилазы выше, чем у людей. Это

Таблица 5

Сравнительная характеристика
общего анализа крови двух видов макак

Показатель (Me)	*Macacca mulatta* (*n*=1160)	*Macacca fascicularis* (*n*=75)
Гемоглобин, г/л*	130,5	125,0
MCV, фл	72,0	68,0
MCH, пг	24,0	21,0
MCHC, г/л	33,0	32,0
Лейкоциты, $\times 10^9$/л	11,3	14,6
Лейкоциты, $\times 10^9$/л (самцы)	9,70	11,95
Лейкоциты, $\times 10^9$/л (самки)	13,51	19,37
Нейтрофилы п/я, %	2,0	4,0
Нейтрофилы п/я, $\times 10^9$/л	0,21	0,53
Лимфоциты, %	5,0	10,0
Лимфоциты, $\times 10^9$/л	0,59	1,21

*Примечание. * p=0,013; p<0,001.*

Таблица 6

Сравнительная характеристика биохимических показателей крови человека и двух видов приматов

Показатель	Человек (*n*=193)	*Macacca mulatta* (*n*=94)	*Papio hamadryas* (*n*=57)
АЛТ, Ед/л	11,3–42,5	14,7–96,7	13,8–53,6
АСТ, Ед/л	15,5–34,9	22,3–82,0	24,6–64,4
Альфа-амилаза, Ед/л	3,2–50	239–1688	135–430
Холестерин, ммоль/л	3,4–7	2,2–6,8	2,0–4,6
Триглицериды, ммоль/л	0,4–2,8	0,3–2,6	0,4–1,6

может быть связано с различием в энергетических потребностях и особенностях питания (табл. 6). Н.В. Добаджян рассказала, что необходима более широкая выборка обезьян для разработки собственных нормативных значений.

Таким образом, доэкспериментальный этап является критически важным в проведении исследований с использованием лабораторных животных. Надлежащая подготовка, включающая оценку состояния здоровья животных, установление референтных интервалов и учет факторов, влияющих на результаты, являются необходимыми условиями для обеспечения надежности получаемых данных.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arnold J.E., Camus M.S., Freeman K.P. et al. ASVCP Guidelines: Principles of Quality Assurance and Standards for Veterinary Clinical Pathology (version 3.0) // Veterinary Clinical Pathology. 2019. Vol. 48. N. 4. P. 542–618. DOI: 10.1111/vcp.12810.
2. Bjornson-Hooper Z.B., Fragiadakis G.K., Spitzer M.H. et al. A comprehensive atlas of immunological differences between humans, mice, and non-human primates // Frontiers in immunology. 2022. Vol. 13. P. 867015. DOI: 10.3389/fimmu.2022.867015.
3. Bruce H.M., Parkes A.S. Feeding and breeding of laboratory animals. IX. A complete cubed diet for mice and rats // The Journal of hygiene. 1949. Vol. 47. N. 2. P. 202–208. DOI: 10.1017/s0022172400014479.
4. Carman R.A., Quimby F.W., Glickman G.M. The effect of vibration on pregnant laboratory mice. INTER-NOISE and NOISE-CON Congress and Conference Proceedings. 2007.
5. Garcia-Flores V., Romero R., Furcron A.E. et al. Prenatal Maternal Stress Causes Preterm Birth and Affects Neonatal Adaptive Immunity in Mice // Frontiers in Immunology. 2020. Vol. 11. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00254.
6. Gaskill B.N., Karas A.Z., Garner J.P. et al. Nest building as an indicator of health and welfare in laboratory mice // Journal of Visualized Experiments. 2013. N. 82. P. e51012. DOI: 10.3791/51012.

7. Lohmiller J.J., Swing S.P., Hanson M.M. Reproduction and breeding. The laboratory rat. Academic Press, 2020. P. 157–179. DOI: 10.1016/B978-0-12-814338-4.00006-4.
8. Reeb-Whitaker C.K., Paigen B., Beamer W.G. et al. The impact of reduced frequency of cage changes on the health of mice housed in ventilated cages // Laboratory Animals. 2001. Vol. 35. N. 1. P. 58–73. DOI: 10.1258/0023677011911381.
9. Rogers K.A., Scinicariello F., Attanasio R. IgG Fc receptor III homologues in nonhuman primate species: genetic characterization and ligand interactions // Journal of immunology. 2006. Vol. 177. N. 6. P. 3848–3856. DOI: 10.4049/jimmunol.177.6.3848.
10. Salisu T.F., Ademola J.A., Adekunle O.N. et al. Breeding and Maintenance of Laboratory Rats (Rattus norvegicus) in Enriched and Un-enriched Conditions // Futo Journal Series. 2021. Vol. 7. N. 2. P. 122–131.
11. Schapiro S.J., Everitt J.I. Preparation of Animals for Use in the Laboratory: Issues and Challenges for the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) // ILAR Journal. 2006. Vol. 47. N. 4. P. 370–375. DOI: 10.1093/ilar.47.4.370.
12. Smith A.J., Clutton R.E., Lilley E. et al. PREPARE: guidelines for planning animal research and testing // Laboratory Animals. 2017. Vol. 52. N. 2. P. 135–141. DOI: 10.1177/0023677217724823.

Соотношение возраста человека и лабораторных животных — критерии и методы оценки

https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-9-7-s7

М. Н. Макарова, М. А. Ковалева, М. А. Акимова, С.В. Гущина

АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»

Каждый возрастной период жизни человека характеризуется определенными особенностями функционального состояния органов и систем организма, что влияет на чувствительность к лекарственным препаратам. Это особенно важно учитывать при разработке лекарственных препаратов для педиатрической практики. Реакция развивающегося организма на терапию может значительно отличаться от реакции взрослого человека. В зависимости от возраста пациента могут меняться фармакокинетические параметры, фармакодинамика и/или нецелевые эффекты лекарственного препарата, что потенциально может приводить к различиям в профилях безопасности и/или эффективности между пациентами разных возрастов[1].

Разработка лекарств для педиатрических пациентов сопровождается различными проблемами для фармацевтических компаний, поэтому наблюдается определенный дефицит лекарственных препаратов для детей. Клинические исследования с участием детей отличаются от таковых с участием взрослых, планирование и проведение педиатрических исследований требуют особого внимания, поскольку популяция пациентов более уязвима. Одна из основных проблем заключается в определении начальной дозы для клинических исследований (Toma M., Felisi M. и соавт., 2021).

В педиатрической практике основным источником повышенного риска применения лекарственных средств, которые разработаны и применяются у взрослых, является неожиданно высокая экспозиция у детей в результате функциональной незрелости механизмов метаболизма, распределения или выведения лекарственного средства (Barrow P.C., Schmitt G., 2017). Лекарственные препараты у детей часто метаболизируются медленнее или другими путями из-за сниженной активности ферментов, связанной с незрелостью печени. Лекарственное средство может выводиться из кровотока у ребенка медленнее из-за относительной неэффективности

[1] Guidance for Industry S11 Nonclinical safety testing in support of development of pediatric pharmaceuticals. ICH. May 2021.

незрелых почек. Фармакологическая эффективность препарата может увеличиваться или уменьшаться за счет различий в относительном количестве рецепторов, присутствующих в ткани-мишени детского организма по сравнению с взрослым (Barrow P.C., Schmitt G., 2017).

Особую группу составляют новорожденные дети. У новорожденных наблюдается ряд существенных физиологических отличий по сравнению с детьми более старшего возраста, например, сниженная функция легких. Быстрое развитие новорожденных приводит к обширной внутри- и межиндивидуальной вариабельности как фармакокинетических, так и фармакодинамических параметров, что делает экстраполяцию данных от детей старшего возраста на новорожденных затруднительной (Barrow P.C., Schmitt G., 2017). В качестве примера можно привести развитие так называемого серого синдрома, или «синдрома серого ребенка», после внутривенного введения хлорамфеникола (антибиотика широкого спектра действия). Синдром проявляется серой окраской кожи, острой сосудистой недостаточностью, многократной рвотой и неврологическими осложнениями. Состояние обусловлено критическими изменениями фармакокинетики препарата в связи с незрелостью выделительной системы у детей раннего возраста. У новорожденного отсутствует фермент уридин-5-дифосфат- глюкуронилтрансфераза, а способность почек выделять неконъюгированный хлорамфеникол недостаточна, что приводит к накоплению токсичных метаболитов (Barrow P.C., Schmitt G., 2017).

Еще один пример — развитие синдрома удушья, который регистрировали у младенцев после внутривенного введения препаратов, содержащих бензиловый спирт. Бензиловый спирт используется в качестве вспомогательного вещества в различных лекарственных формах. Симптомы вызваны метаболическим ацидозом из-за незрелости путей метаболизма, что приводит к накоплению бензойной кислоты (Barrow P.C., Schmitt G., 2017).

Более высокая экспозиция лекарственных препаратов воспроизводится и в экспериментах на неполовозрелых животных. Так, более чем в трети проанализированных исследований (43 из 102) воздействие на молодых животных было сильнее, чем можно было бы ожидать на основе фармакокинетических данных, полученных для взрослых. Эти различия были наиболее заметны у новорожденных животных (Bailey G.P., Marien D., 2011).

Отличающееся распределение лекарств в организме взрослого человека и ребенка обусловлено различиями в проницаемости мембран, связывании с белками плазмы и в общем количестве воды в организме. Например, гематоэнцефалический барьер более проницаем в возрасте примерно до 6 мес, что может привести к неблагоприятному воздействию на центральную нервную систему у младенцев при приеме препаратов, которые не проникают через гематоэнцефалический барьер у взрослых (Barrow P.C., Schmitt G., 2017).

Кроме того, отличия pH желудка и почечного кровотока у детей также могут влиять на всасывание и выведение лекарств; pH желудка практически нейтральный (pH 6,0–8,0) при рождении, затем падает примерно до 1,0–3,0 в течение первых 24 ч после рождения, а затем постепенно возвращается к нейтральному состоянию к 10-му дню, затем снова медленно снижается, достигая значений pH взрослого человека (pH 1,5–3,5) (Bartelink I.H., Rademaker C.M. и соавт., 2006). Почечный кро-

воток при рождении составляет лишь 5–6% сердечного выброса, к 1 году жизни увеличивается с 15 до 25% и достигает значений у взрослых после 2 лет (Alcorn J., McNamara P.J., 2002; Faqi A.S., 2017). Изменения в функции почек, возникающие в процессе развития, могут существенно влиять на плазменный клиренс соединений, которые выводятся почками, и могут усилить почечную и системную токсичность этих препаратов. Таким образом, параметры фармакокинетики у новорожденных отличаются от таковых у взрослых вследствие функциональной незрелости почек (Faqi A.S., 2017). Так, в исследовании токсичности при 28-дневном введении препарата «фаропенем» на неполовозрелых собаках показано, что с течением времени скорость клиренса увеличивалась, при этом снижались значения $AUC_{(0-6)}$ и T_{max} на 27-й день, при этом значение C_{max} практически не менялось. Очевидное увеличение клиренса соответствовало ожидаемым изменениям в физиологическом развитии почек у собак породы бигль в возрасте от 3 до 7 нед (Faqi A.S., 2017).

Существуют также значительные различия в активности метаболических ферментов фазы I и II между детской популяцией и взрослыми. Изменения в экспрессии ферментов фазы II, метаболизирующих лекарства, происходят в ходе развития организма, что оказывает огромное влияние на параметры распределения лекарственных препаратов и их эффекты (Faqi A.S., 2017).

Учитывая критические анатомические, физиологические и метаболические различия между взрослым и детским организмом, доклинические исследования с использованием взрослых животных или информация о безопасности, полученная от взрослых пациентов, не всегда могут адекватно прогнозировать различия в профиле безопасности лекарственного препарата в разных возрастных группах педиатрических пациентов. Особенно это касается воздействия на еще не сформировавшиеся органы и системы органов, такие как головной мозг, дыхательная система, почки, репродуктивная, иммунная и скелетная системы. Почки начинают функционировать в полном объеме примерно в возрасте 1 года, тогда как развитие нервной системы продолжается на протяжении всего подросткового периода; формирование репродуктивной системы завершается в подростковом возрасте, а созревание скелетной системы продолжается и во взрослом возрасте (Faqi A.S., 2017).

В этом плане данные по безопасности, эффективности, фармакокинетике, полученные в доклинических исследованиях, имеют важное значение. Необходимость доклинических исследований с использованием неполовозрелых (ювенильных) животных возникает в тех случаях, когда имеющихся данных по безопасности, полученных в исследованиях на половозрелых животных и в клинических исследованиях с участием взрослых пациентов, недостаточно для ее оценки при клинических испытаниях с участием детей. Для обоснования необходимости доклинических исследований и их объема используется подход, основанный на анализе имеющейся информации [Weight of Evidence (WoE), «весомость доказательства»]. Должны быть приняты во внимание результаты, полученные в экспериментах на половозрелых животных, клинические данные, класс-специфические эффекты препарата[2] (Енгалычева Г.Н., Сюбаев Р.Д., 2023).

[2] Guidance for Industry S11 Nonclinical safety testing in support of development of pediatric pharmaceuticals. ICH. May 2021.

В настоящее время развивающиеся (ювенильные) животные признаны стандартным объектом в токсикологических исследованиях лекарственных средств для педиатрической практики. Использование ювенильных животных позволяет изучать влияние препаратов в разные онтогенетические периоды развития организма и, следовательно, прогнозировать эффекты в конкретной возрастной группе пациентов (новорожденных, детей, подростков)[3].

Термин «ювенильный» означает любой незрелый организм от рождения до полового созревания (Barrow P.C., Schmitt G., 2017).

Наличие четких критериев, позволяющих соотнести возраст человека и различных видов лабораторных животных, крайне необходимо для правильного планирования доклинических исследований лекарственных средств, предназначенных для пациентов определенных возрастных групп.

При проведении доклинических испытаний безопасности на молодых животных важно, чтобы возраст (период онтогенетического развития) лабораторных животных был сопоставим с таковым в целевой педиатрической популяции.

В Руководстве ICH E11[4] возраст человека классифицируется следующим образом:

1) недоношенные новорожденные;
2) новорожденные от 0 до 27 дней;
3) младенцы от 28 дней до 23 мес;
4) дети (от 2 до 11 лет);
5) подростки (от 12 до 18 лет).

Эти возрастные группы в некоторой степени субъективны из-за широкой вариабельности массы тела внутри возрастной категории и вероятности значительного совпадения процессов взросления и развития. Следовательно, необходимо проявлять осторожность и применять гибкий подход, чтобы в дизайне исследования учитывались современные знания в области биологии развития и фармакологии.

При рассмотрении возрастных категорий человека, принимая во внимание основные этапы развития — рождение, введение в прикорм твердой пищи, отлучение от груди, половое созревание и взросление, — можно вывести определенные соотношения с возрастом лабораторных животных. В руководстве ICH S11[5] представлены таблицы, в которых указан возраст наступления основных этапов развития человека и различных видов лабораторных животных. Как поясняется в руководстве, таблицы дают лишь приблизительные данные о возрасте, когда происходят эти события. Потенциальные токсические эффекты лекарственных препаратов наиболее значимы в критические и активные периоды функционального и структурного роста и в меньшей степени в периоды медленного роста или совершенствования функций. Развитие некоторых систем органов, например, центральной нервной системы, представляет собой сложный поэтапный процесс с различными сроками созревания и формирования функций. Поэтому приведенные возрастные ориентиры представляют собой лишь общее руководство.

---

[3] Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. Под ред. А.Н. Миронова и др. Москва, 2012.

[4] ICH Topic E11. Clinical Investigation of Medicinal Products in the Pediatric Population. Step 5. January 2001.

[5] Guidance for Industry S11 Nonclinical safety testing in support of development of pediatric pharmaceuticals. ICH. May 2021.

Тем не менее рекомендованный ICH S11 широко применяется и, очевидно, является наиболее рациональным при выборе возрастного периода лабораторных животных для исследований по изучению возможных эффектов и потенциальных рисков применения лекарственного препарата в различных возрастных группах пациентов.

В токсикологических исследованиях часто используется подход, при котором для сравнения возрастных категорий между различными видами животных и человеком используются этапы развития центральной нервной системы и репродуктивных органов (Faqi A.S., 2017).

Полезно было бы также иметь систематизированные данные о соотношении одного года жизни человека к определенному промежутку времени жизни животного, которые пока носят разрозненный характер.

В данном обзоре освещены критические отличия в онтогенетическом развитии основных органов и систем человека и наиболее часто используемых видов лабораторных животных. Приведены данные о соотношении основных этапов развития. Обсуждаются подходы, применяемые для вычисления прямого соотношения возраста человека и лабораторных животных.

Этапы онтогенеза основных органов и систем

Нервная система и органы чувств

Развитие центральной нервной системы (ЦНС) представляет собой сложный поэтапный процесс с различными сроками созревания и формирования рефлексов, болевых путей, режима сна, миелинизации, координации и когнитивных функций. В каждый из этапов развития система может быть в большей или меньшей степени подвержена неблагоприятным воздействиям. Функциональное созревание некоторых аспектов развития ЦНС у людей происходит во взрослом возрасте и не может быть полностью смоделировано на животных[6].

Человек и другие высшие приматы Старого Света уникальны тем, что у них период взросления длительный и неврологическое развитие также продолжительно. К сожалению, не существует простой математической зависимости, связывающей развитие животных и человека, что усложняет экстраполяцию от экспериментального животного к человеку. Человек является альтрициальным видом, то есть имеющим относительно незрелую ЦНС при рождении, которая должна пройти значительный постнатальный этап развития, чтобы достичь характеристик взрослого организма. Многие виды лабораторных животных, такие как мыши, крысы, кошки, собаки и кролики, похожи на людей в этом отношении. Однако некоторые виды, например морские свинки и овцы, рождаются с довольно зрелой нервной системой, развитие в постнатальном периоде незначительно. Эти виды менее практически

[6] Guidance for Industry S11 Nonclinical safety testing in support of development of pediatric pharmaceuticals. ICH. May 2021.

Таблица 1

День внутриутробного развития, когда происходит закрытие нервной трубки у человека и различных видов лабораторных животных

Вид	Человек	Мышь	Крыса	Хомяк	Песчанка	Морская свинка	Кролик	Хорек	Кошка	Обезьяна
День ВУР	28-й	9–9,5-й	10,5–11-й	8,25–8,5-й	13-й	14–18-й	9,5–10,5-й	16–17-й	14–15-й	26-й*

*Примечание. * — предположительно.*

применимы в качестве модели изучения влияний на развивающуюся ЦНС человека (Wood S.L. и соавт., 2003; Watson R.E. и соавт., 2006).

В период внутриутробного развития (ВУР) образуется нервная трубка — эмбриональный предшественник головного и спинного мозга. У эмбрионов человека нервная трубка образуется путем слияния двусторонних нервных складок по средней линии на 4-й неделе ВУР (табл. 1). Закрытие нервной трубки у эмбриона человека непрерывный процесс, который инициируется в нескольких сайтах и продолжается как рострально, так и каудально. У мышей и других животных также обнаруживаются множественные сайты инициации закрытия нервной трубки, но способ ее закрытия у людей отличается от такового у многих других видов животных. Поэтому следует быть осторожными при экстраполяции данных от других животных на человека (Nakatsu T. и соавт., 2000).

У песчанок на 12-й день ВУР нервная трубка уже частично сформирована, а на 13-й день закрыта, за исключением дистального нейропора (см. табл. 1) (Smith R.A., Glomski C.A., 1977).

У крыс закрытие нервной трубки происходит примерно через 10,5–11 дней ВУР, у мышей — через 9–9,5 дня, у кроликов — через 9,5–10,5 дня, у хомяков — через 8,25–8,5 дня. У морских свинок закрытие нервной трубки происходит на более поздних стадиях по сравнению с другими видами — между 14-м и 18-м днем ВУР (см. табл. 1) (Silva F.M.O. и соавт., 2016).

У морских свинок развитие спинного мозга и дифференцировка примитивных пузырьков ЦНС происходит на 20-й день. Гистологически недифференцированная ткань головного мозга определяется между 18-м и 20-м днем ВУР. На 30-й день дифференцируется ткань головного мозга, на 45-й день визуализируются полушария головного мозга с четким разделением на белое и серое вещество. Морские свинки являются хорошей моделью для трансляционных исследований развития нервной системы благодаря высокой степени неврологической зрелости по сравнению с другими грызунами, имеющими короткий период беременности (Silva F.M.O. и соавт., 2016).

Закрытие нервной трубки у эмбриона кошки происходит на 14–15-й день ВУР (см. табл. 1). На 19-й день ВУР начинается формирование сосудистого сплетения, а на 20-й макроскопически хорошо определяется головной мозг и ствол мозга. На 24-й день ВУР дифференцируется 4 слоя клеток коры головного мозга, а на 60-й день — 6 слоев клеток. На этой стадии кора мозжечка имеет 3 слоя. Морфологические аспекты эмбрионального и внутриутробного развития кошек очень схожи с этапами развития нервной системы человека (de Morais-Pinto L. и соавт., 2021).

У хорька, у которого нормальная беременность длится 42 дня, закрытие нервной трубки происходит на 16–17-й день ВУР (см. табл. 1) (Williams B.H. и соавт., 1994).

У обезьян закрытие нервной трубки происходит предположительно на 26-й день ВУР (см. табл. 1) (Monie I.W., 1976).

Общие особенности неврологического развития человека достаточно хорошо изучены. Размер мозга по отношению к массе тела взрослого человека достигает своего пика при рождении (Dobbing J., Sands J., 1979). В перинатальном периоде у человека формируются ядра головного мозга, корковые структуры, важнейшие связи и преходящая тонкая организация этих связей. Фундаментальные процессы образования, миграции и гибели нейронов происходят согласованно. Считается, что кортикальный нейрогенез и миграция завершаются к 1-й неделе после рождения (но могут продолжаться до 18-месячного возраста в префронтальной коре). Последующее развитие неокортекса во многом зависит от прогрессивного созревания или уничтожения существующих синапсов, а также от избирательной гибели нейронов (Haberny K.A. и соавт., 2002). Синаптическая обрезка (прунинг) — процесс удаления ненужных нейронов и синапсов, поскольку количество сформированных при рождении нейрональных связей излишнее, обычно это происходит в возрасте 2–10 лет. Пик формирования синапсов приходится на возраст 2–3 года. Точно также длительно постепенно идет миелинизация; оба процесса завершаются последними в филогенетически молодых структурах, таких как префронтальная кора. Созревание префронтальной коры с полным синаптогенезом и миелинизацией завершается примерно в возрасте 17–25 лет (Levitt P., 2003; Zeiss C.J., 2021).

Среди лабораторных животных сроки нейрогенеза, синаптогенеза и миелинизации наиболее подробно изучены на грызунах. Показано, что у мышей кортикальный нейрогенез и миграция нейронов завершаются к 10-му дню ВУР (Chiang S.Y. и соавт., 2021).

При изучении миелинизации мозолистого тела головного мозга мышей в период от рождения до 240-дневного возраста показано, что миелиновые оболочки впервые обнаруживаются на 11-й день. Наиболее интенсивная миелинизация происходит между 14-м и 45-м днем, к этому сроку миелинизировано 13,5% аксонов, далее миелинизация продолжается более медленно, до 240 дней, когда миелинизировано 28% аксонов (Sturrock R.R., 1980). У мышей клетки головного мозга подвергаются массовой элиминации во время двух волн апоптоза, которые происходят на эмбриональной стадии (14-й день ВУР) и между 6-м и 10-м днем постнатального периода (Dehorter N., Del Pino I., 2020).

У разных видов созревание головного мозга происходит с разной скоростью и на различных этапах жизненного цикла. У человека скорость роста мозга является самой высокой в период между последним триместром ВУР и первыми тремя годами жизни. У крыс и мышей рост мозга наиболее быстрый в течение первых 2 нед постнатального периода. Состояние созревания мозга мышей на 7-й день постнатального периода сравнимо с состоянием 7-дневных крыс и соответствует степени зрелости мозга у недоношенных младенцев (Loepke A.W. и соавт., 2009).

Результаты МРТ показали, что объем мозга мыши почти стабилен уже через 3 нед, но толщина коры продолжает непрерывно уменьшаться с максимальными изменениями в течение первых 3 мес. Миелинизация все еще увеличивается в пе-

риод от 3-го до 6-го месяца, хотя наиболее существенные изменения происходят к 3-му месяцу (Hammelrath L. и соавт., 2016).

У песчанок максимальная скорость развития мозга регистрируется в первые 7–8 дней постнатального периода. При рождении масса тела песчанки составляет всего 4% массы тела взрослой особи, а головной мозг и мозжечок — лишь 24 и 9,9% соответственно от массы взрослой особи. Головной мозг при рождении более зрелый, чем мозжечок. К 21-му дню рост головного мозга практически завершается. Содержание холестерина в головном мозге приближается к уровню взрослого животного 60-дневного возраста. Миелинизация, измеряемая по накоплению холестерина, завершается приблизительно в возрасте от 90 до 180 дней (Watanabe K.S., Schain R.J., 1980).

Масса головного мозга песчанок очень быстро увеличивается до 18-го дня, а затем к 70-дневному возрасту происходит постепенное увеличение до асимптоты (Wilkinson F., 1986).

У морских свинок значительная миелинизация в срединном возвышении появляется на 3-й день постнатально, но не завершается до 10-го дня. Несмотря на относительно длительный период беременности морской свинки (68–72 дня), формирование нейроваскулярной регуляции функции передней доли гипофиза еще не закончено (Silverman A.J., Desnoyers P., 1975).

Синаптогенез у морских свинок длится примерно 10 нед и в отличие от такового у человека происходит преимущественно во время пренатального периода. Он начинается на ранних стадиях ВУР, достигает пика между 35-м и 40-м днем беременности и практически завершается к рождению (68–70 дней) (Rizzi S. и соавт., 2010).

Если у мышей нейрогенез длится около 10 дней, то у приматов — в 10 раз дольше, а у хорьков — приблизительно 5 нед. У хорька неокортикальный нейрогенез начинается примерно на 22-й день ВУР с образованием нейронов VI слоя в теменной доле. По сравнению с грызунами нейрогенез у хорьков происходит раньше. Глиогенез у хорьков начинается в течение последних 4 дней эмбрионального развития (38–41 день) одновременно с пиком нейрогенеза. В соматосенсорной коре нейрогенез в основном завершается при рождении, в зрительной коре нейрогенез длится до 2 нед после рождения. Однако миграция нейронов продолжается постнатально во всех областях мозга. Большинство пренатально образовавшихся нейронов достигает своего окончательного положения в течение первой постнатальной недели, тогда как миграция постнатально сформированных нейронов продолжается и на 2-й неделе постнатального периода. Синаптогенез у хорьков начинается, как только мигрирующие нейроны достигают своего окончательного положения. Хорек — хорошая модель для изучения развития областей коры и нейрональных путей. На хорьках изучалось развитие и созревание процессов сенсорной обработки. Во многом это связано с тем, что открытие глаз и появление слуха у хорька происходят через 1 мес, что обеспечивает длительный период для изучения сенсорного развития. Это позволяет изучать на хорьках постнатально процессы, которые у человека и грызунов происходят внутриутробно. Кроме того, у хорька наблюдаются определенные особенности созревания мозга и характеристики нейронов, которые сходны с человеческими, но отличаются от таковых у грызунов (Gilardi C., Kalebic N., 2021).

У свиней по данным МРТ общий объем мозга увеличивается на 130% (±12) и 121% (±7) в течение 2–24 нед у самцов и самок соответственно. Максимальное увеличение общего объема мозга происходит примерно в возрасте 4 нед, а 95% роста всего мозга — к возрасту 21–23 нед. Пол влияет на рост мозга, например, у самок кора меньше. Кроме того, максимальный рост гиппокампа происходил примерно на 5 нед раньше у самок, чем у самцов. Эти половые различия схожи с теми, что наблюдаются у людей. Значительное увеличение объема мозга в постнатальном периоде аналогично таковому у новорожденных детей и позволяет предположить, что свиней можно использовать для изучения развития мозга (Conrad M.S. и соавт., 2012).

Основные различия при рождении между экспериментальными животными и человеком описаны для зрительной системы. Младенцы человека рождаются с открытыми глазами и относительно хорошо развитой зрительной системой. Напротив, большинство экспериментальных животных рождаются с закрытыми глазами и менее развитой зрительной системой, которая более восприимчива к агентам, потенциально способным нанести вред зрению. Например, воздействие избытка кислорода на новорожденных крыс, кошек и собак может безвозвратно повредить развивающуюся зрительную систему, но на доношенных младенцев это не повлияет (Noell N. W., 1955). Однако тот факт, что экспериментальные животные чувствительны к избытку кислорода, может указывать на уязвимость недоношенных детей с менее развитой зрительной системой. Количество дней, в течение которых недоношенный ребенок получает дополнительную кислородную терапию, в значительной степени обусловливает развитие ретинопатии (Hussain N. И соавт., 1999).

Видовые различия в постнатальном созревании гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) могут привести к видоспецифичному изменению количества лекарственного средства, способного достичь и сконцентрироваться в головном мозге в разные периоды развития (Scheuplein R. и соавт., 2002).

Непроницаемость ГЭБ к различным веществам возникает в разное время, поэтому выводы исследователей о развитии ГЭБ зависят как от изучаемого вида, так и от используемой методики эксперимента. Считается, что развитие ГЭБ начинается вскоре после интраневральной неоваскуляризации (Bauer H.C., Bauer H., 2000). У людей сведения о коротком периоде повышенной уязвимости ГЭБ немногочисленны, но в целом считается, что проницаемость ГЭБ выше, чем у взрослого, в течение 6 мес после рождения.

Для того чтобы в исследованиях на лабораторных животных можно было достоверно прогнозировать токсические эффекты на развитие ЦНС человека, у используемых в эксперименте животных должны быть характерные для человека процессы развития.

Хотя может показаться интуитивно понятным, что приматы, кроме человека, должны быть лучшей моделью для изучения влияния на постнатальное развитие человеческого мозга, но это не всегда так. В некоторых случаях крыса может быть наиболее подходящим видом для изучения нейротоксичности, хотя бы потому, что информации о развитии ЦНС других лабораторных животных существенно меньше или нет вовсе.

Основные этапы развития ЦНС видов лабораторных животных в сравнении с человеком представлены в табл. 2.

Основные этапы развития ЦНС

Параметр	Человек
Достижение «взрослой» массы мозга	11 лет
Максимальная скорость развития мозга	Пик роста при рождении, продолжается до возраста 2–3 года
ГЭБ	Начинает формироваться внутриутробно и продолжается до возраста 6 мес
Зрелый обмен веществ мозга (аэробный метаболизм)	1 год
Взрослый паттерн медленных волн и фазы быстрого сна	10 лет
Полностью зрелая префронтальная кора (завершены синаптогенез и миелинизация)	17–25 лет
Постнатальный нейрогенез	20% нейрогенеза в зубчатой извилине происходит после рождения; нейрогенез замедляется с возрастом, но в небольшом количестве продолжается на протяжении всей жизни. Нейрогенез в мозжечке завершается в возрасте 1 года

Таблица 2

у человека и лабораторных животных

Крыса	Обезьяна	Другие виды
ПНД 60 (но продолжает увеличиваться в течение всей жизни)	7 лет (шимпанзе)	Мышь — 3 мес, песчанка — 70 дней
Пик роста (в процентах от массы тела) на ПНД 8, продолжается до возраста 2 нед	НД	Мышь — от рождения до 14 дней, песчанка — от рождения до 7–8 дней, свинья — 4–12 нед постнатально
Проницаемость снижается в течение первых недель после рождения	НД	
ПНД 21	НД	
ПНД 32–34	НД	
ПНД 90	4–7 лет (макак-резус)	
85% нейрогенеза в зубчатой извилине происходит после рождения. Нейрогенез в обонятельной луковице продолжается на протяжении всей жизни	20% нейрогенеза в зубчатой извилине происходит после рождения; нейрогенез замедляется с возрастом, но в небольшом количестве продолжается на протяжении всей жизни (макак-резус). Нейрогенез в мозжечке завершается в течение 2–3 мес	У мышей кортикальный нейрогенез и миграция нейронов завершаются к 10-му дню ВУР

Параметр	Человек
Мозжечок	При рождении размер мозжечка человека составляет примерно 18% от размера такового у взрослого человека. В возрасте 1 года мозжечок достигает примерно 50% размера взрослого, прогрессивно развиваются моторика, координация. Скорость роста человеческого мозжечка, измеряемая по увеличению объема, достигает максимума примерно в возрасте 4–7 мес
Паттерн синаптогенеза	Разрастание синапсов, затем плато в их формировании. Затем фаза реорганизации (количесво синапсов уменьшается). У 2-летнего ребенка примерно в 2 раза больше синапсов в коре головного мозга, чем у взрослого. Синаптогенез происходит взрывообразно в зрительной и слуховой коре, достигая максимума у человека к возрасту 3–4 мес. Синаптогенез в префронтальной коре происходит медленнее, начиная с 6-го месяца внутриутробного развития и примерно до 15-месячного возраста
Пик синаптогенеза в головном мозге	34-я неделя внутриутробного развития и до возраста 2–3 года

Продолжение таблицы 2

Крыса	Обезьяна	Другие виды
У крыс 50% взрослого размера мозжечка достигается к возрасту 15 дней. Пик роста мозжечка крыс приходится на возраст 5–10 дней	50% взрослого размера мозжечка достигается при рождении у макак-резусов	
Синаптогенез продолжается примерно 3 нед после рождения	Период быстрого синаптогенеза, затем плато формирования синапсов в детском периоде, когда плотность синапсов значительно превышает уровень у взрослых. Максимальная синаптическая плотность у макак-резусов сходна с показателями человека — 55 синапсов на 100 мкм^3 всего объема коры. Плотность синапсов в первичной зрительной коре увеличивается до возраста 3 мес, затем снижается примерно до 2 лет, после чего следует более медленное снижение в возрасте от 2 до 5 лет. В моторной коре макак-резусов синаптогенез продолжается в течение нескольких месяцев после рождения, а затем снижается примерно до 10-летнего возраста. Синаптогенез в префронтальной и соматосенсорной коре продолжается в раннем постнатальном периоде, после чего в зрелом возрасте снижается	Синаптогенез у морских свинок длится примерно 10 нед и в отличие от такового у человека происходит преимущественно во время пренатального периода. Начинается на ранних стадиях ВУР, достигает пика между 35-м и 40-м днем ВУР и практически завершается к рождению (68–70-й день)
С 12-го дня внутриутробного развития и до ПНД 16	С 40-го дня внутриутробного развития и до ПНД 61 (макак-резус)	Морская свинка 35–40-й день ВУР

Параметр	Человек
Паттерн миелинизации	Миелинизация продолжается в детском и подростковом возрасте, общий объем белого вещества постепенно увеличивается. Одновременно происходит непрерывное увеличение серого вещества от рождения до 4–5 лет с последующим постепенным уменьшением серого вещества в течение 3-го десятилетия жизни. Некоторая миелинизация происходит внутриутробно, периферические нервы, мост и ножки мозжечка у человека достаточно хорошо миелинизированы при рождении. Миелинизация лобной, парциальной и затылочных долей происходит в возрасте 8–12 мес. Объем белого вещества стабильно увеличивается примерно на 12% в возрасте от 4 до 22 лет. В префронтальной коре миелинизация не завершается до подросткового/раннего взрослого возраста. В возрасте 8 мес достигается 50% миелинизации от степени миелинизации взрослого мозга
Завершение миелинизации	20–30 лет
Активность глутаматдекарбоксилазы (ГАД)	При рождении у человека активность ГАД составляет примерно 16,2% по сравнению со средним значением у взрослого человека
Активность холин-ацетилтрансферазы (ХАТ)	
Паттерны электрической активности мозга, характерные для разных фаз сна	Электрическая активность, типичная для различных фаз сна, появляется у человека примерно на 35–37-й неделе внутриутробного развития

Примечание.
ПНД — день постнатального развития (от англ. postnatal day — PND); НД — нет данных.

Окончание таблицы 2

Крыса	Обезьяна	Другие виды
Низкая степень миелинизации внутриутробно, но быстрая постнатальная миелинизация. 50% уровня миелинизации мозга взрослого животного достигается к возрасту 25 дней	У макак-резусов терминальная полоска начинает миелинизироваться в возрасте 1 года; в 2 года происходит умеренная миелинизация терминальной полоски; а к 13 годам терминальная полоска достигает взрослого уровня миелинизации и у нечеловекообразных приматов	Мышь — начало миелинизации ПНД 11. Миелиновые оболочки мозолистого тела впервые обнаруживаются на 11-й день. Наиболее интенсивная миелинизация происходит между 14-м и 45-м днем — миелинизировано 13,5% аксонов, далее миелинизация продолжается более медленно, до 240 дней, при этом миелинизировано 28% аксонов. В целом миелинизация все еще увеличивается в период от 3 до 6 мес, хотя наиболее существенные изменения проходят к 3-му месяцу. Песчанка — миелинизация, измеряемая по накоплению холестерина, завершается приблизительно в возрасте 90–180 дней. Морская свинка — начало миелинизации на ПНД 3
ПНД 90–100	13 лет (макак-резус)	Мышь — ПНД 240, песчанка — ПНД 90–180
НД	16,2% активность ГАД взрослого животного наблюдается в возрасте 7,4–9 дней	
	У крысы в возрасте 20,4 дня уровни ХАТ, сравнимы с таковыми новорожденного человека	
	Электрическая активность, типичная для различных фаз сна, на электроэнцефалограмме наблюдается между 12–13-м днем после рождения	

Одна из областей, в которой обезьяны больше похожи на людей, — это паттерн синаптогенеза. Уникальным для коры приматов является процесс, при котором за разрастанием синапсов следует плато в их формировании, за которым следует регрессивная фаза, когда синапсы реорганизуются, и их количество уменьшается. У 2-летнего ребенка примерно в 2 раза больше синапсов в коре головного мозга, чем у взрослого (Johnson M.H., 2001). Пик пролиферации и ветвления синапсов приходится на 2–3-й год, но половина этих синапсов теряется к 15–16 годам. Приматы, кроме человека, также демонстрируют быстрый синаптогенез, за которым следует плато, когда плотность синапсов значительно превышает уровень у взрослых; однако подобная картина не наблюдается у крыс. Максимальная синаптическая плотность одинакова как у макака-резуса, так и у человека: 55 синапсов на 100 мкм^3 всего объема коры (Rakic P. и соавт., 1986). У макак-резусов пик формирования синапсов происходит между 40-м днем внутриутробного развития и 61-м днем после рождения (Huttenlocher P.R., Dabholkar A.S., 1997).

Плотность синапсов в первичной зрительной коре увеличивается до 3-го месяца после рождения, затем снижается примерно до 2 лет, после чего следует более медленное снижение в возрасте от 2 до 5 лет (Rakic P. и соавт., 1986). У крыс синаптогенез продолжается примерно 3 нед после рождения, достигая пика в течение первых 2 нед после рождения (Zagon I.S., McLaughlin P.J., 1977).

Однако есть некоторые аспекты развития ЦНС, которые у крыс происходят сходным с человеком образом.

Пик роста наблюдается в период пренатального развития у макак-резусов, но постнатально у крыс и людей. Например, мозжечок, поздно развивающаяся область мозга, которая предположительно может постнатально подвергаться более высокому риску воздействия нейротоксикантов. Крыса представляется лучшей моделью для оценки воздействия нейротоксических эффектов на развивающийся организм. Мозжечок ребенка в возрасте 1 года составляет примерно 50% размера мозжечка взрослого человека (Howard E., 1973), максимальная скорость роста наблюдается в возрасте 4–7 мес. У крыс ориентир размера взрослой особи 50% достигается на 15-й день после рождения с пиковой скоростью роста на 5–10-й день (Rodier P.M., 1980). Для сравнения ориентир 50% размера взрослой особи у макак-резусов достигается уже при рождении (Howard E., 1973).

Считается, что снижение количества нейронов посредством апоптоза необходимо для правильного развития нервной системы. Запрограммированная гибель клеток в неокортексе грызунов достигает максимума в возрасте 4–7 дней после рождения, количество нейронов уменьшается примерно на 20–30%. Помимо потери нейронов, потеря синапсов происходит до раннего взросления, даже позже, чем апоптоз. Однако информации об этих процессах у приматов мало, бóльшая часть получена в исследованиях на грызунах (Zeiss C.J., 2021; Watson R.E. и соавт., 2006).

Постнатальное развитие нейротрансмиттерных систем явно важно для правильного функционирования ЦНС, а рецептор NMDA является одним из примеров потенциальной восприимчивости нейромедиаторной системы развивающегося организма к токсическим воздействиям. В отношении этого конкретного рецептора крыса представляется подходящей моделью для оценки влияния на развитие ЦНС

человека, однако не означает, что это распространяется и на другие рецепторы и нейромедиаторные системы. Для изучения влияния на другие нейромедиаторные системы, для подбора релевантной модели необходим тщательный обзор научной литературы. (Zeiss C.J., 2021; Watson R.E. и соавт., 2006).

Первичными процессами, происходящими у человека постнатально, являются миелинизация, образование синапсов и обрезка нейронов и синапсов. В целом те же процессы происходят и у крыс, например, максимальная скорость роста мозга наблюдается при рождении или вскоре после рождения, как и у людей, миелинизация происходит преимущественно постнатально, значительная часть синаптогенеза продолжается постнатально. Это не означает, что постнатальное развитие ЦНС у крыс и человека идентично. Существует множество примеров различий в скорости и паттерне созревания структурных элементов ЦНС. Например, нейрогенез в зубчатой извилине (у человека около 20% популяции гранулярных клеток формируется после рождения по сравнению с 480% у крысы) и миелинизация (при рождении у человека периферические нервы, мост и ножки мозжечка довольно хорошо миелинизированы, но у крыс внутриутробно миелинизация происходит в меньшей степени). Поскольку эти процессы развития происходят на более ранних стадиях развития человека, не ожидается, что различия в сроках созревания повлияют на трансляционную ценность исследований на крысах (Zeiss C.J., 2021; Watson R.E. и соавт., 2006).

Для определения возраста, в котором развитие ЦНС крысы соответствует стадии развития ЦНС новорожденного человека, предложено использовать 4 параметра. К этим параметрам относятся: 1) синаптогенез; 2) развитие активности глутаматдекарбоксилазы (ГАД), ключевого фермента синтеза основного тормозного нейромедиатора гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК); 3) развитие холинацетилтрансферазы (ХАТ), ключевого фермента синтеза нейромедиатора ацетилхолина; 4) паттерны электрической активности мозга, характерные для разных фаз сна. При оценке количества синапсов в разных слоях полосатого тела человека показано, что 63,2% синапсов новорожденного присутствуют у 26-летнего взрослого человека. Для сравнения, у 14,9-дневной крысы количество синапсов составляет 63,2% по сравнению с взрослой 90-дневной крысой. По показателям активности ГАД человека на различных стадиях развития обнаружили, что при рождении у человека активность ГАД составляет примерно 16,2% по сравнению со средним значением у взрослого. У крысы этот процент активности ГАД наблюдается на 7,4–9-й день постнатально. Что касается фермента ХАТ, крыса в возрасте 20,4 дня имеет уровни ХАТ, сравнимые с таковыми у новорожденного человека. Электрическая активность, типичная для различных фаз сна, появляется у человека примерно на 35–37-й неделе внутриутробного развития. Для сравнения, у крыс эти электрические паттерны на электроэнцефалограмме наблюдаются между 12–13-м днем после рождения. В совокупности, используя эти различные параметры развития мозга, исследователи пришли к выводу, что приблизительным эквивалентом новорожденного человека является детеныш крысы в возрасте 12–13 дней (Romijn H.J. и соавт., 1991; Watson R.E. и соавт., 2006).

Определение функционального состояния ЦНС в исследованиях часто проводится по оценке локомоторной функции. Нормальный паттерн локомоции у крыс

устанавливается в течение первых нескольких недель после рождения. Детеныши могут передвигаться, используя передние конечности, верхнюю часть туловища и голову, начиная с 3–4-го дня после рождения. Это поведение «ползания» достигает максимума примерно к 7-му дню и исчезает в возрасте 15 дней. Только через 8–10 дней после рождения крысята могут стоять, полностью оторвав живот от пола. На 12–13-й день после рождения крысята могут ходить, поддерживая свой полный вес, но задние конечности обычно развернуты наружу. У человеческих младенцев этап «ползания» обычно заканчивается в возрасте 13 мес (Pressler R., Auvin S., 2013).

В табл. 3 приведены сравнительные данные по локомоторному развитию человека и лабораторных животных (Wood S.L. и соавт., 2003).

Таким образом, у альтрициальных грызунов, таких как крысы и мыши, многие из фундаментальных процессов развития ЦНС происходят в период между рождением, отъемом и половой зрелостью, примерно в возрасте 6 нед. У этих видов нейрогенез все еще достаточно активен в первые 2 нед постнатального развития. Миелинизация находится в зачаточном состоянии при рождении, но быстро прогрессирует и почти полностью завершается к моменту половой зрелости. Точно также формирование и обрезка синапсов почти завершаются к молодому взрослому возрасту. Эти основные процессы развития происходят за очень короткий период до возраста 3–4 нед. Из-за этого у новорожденных грызунов при моделировании инсульта в этот период наблюдаются более глубокие и разнонаправленные повреждения (Zeiss C.J., 2021).

Наиболее изученными с точки зрения развития ЦНС видами животных являются крысы, НЧП, собаки и карликовые свиньи. ЦНС НЧП более зрелая при рождении, чем ЦНС человека, поэтому НЧП могут быть менее чувствительны к воздействиям на ЦНС в неонатальном периоде. В целом, крыса считается приемлемой моделью для большинства аспектов изучения постнатального развития ЦНС. Однако постнатальный синаптогенез и реорганизация синапсов уникальны для человека и НЧП (Barrow P. C., Schmitt G., 2017).

Общее эмпирическое правило предполагает, что развитие мозга 7–10-дневных альтрициальных грызунов, таких как крыса, примерно эквивалентно развитию мозга ребенка при рождении, причем последний триместр беременности челове-

Таблица 3

Локомоторное развитие человека, крысы, собаки и нечеловекообразных приматов (НЧП)

Показатель	Человек	Крыса	Собака	НЧП
Локомоторное развитие: ползание	ПНД 270 (около 9 мес)	ПНД 3–12	ПНД 4–20	ПНД 4–49 (макак-резус)
Локомоторное развитие: нормальное передвижение	ПНД 396 (около 13 мес)	ПНД 12–16	ПНД 20–28	ПНД 49 (макак-резус)

Примечание. ПНД — день постнатального развития (от англ. postnatal day — PND).

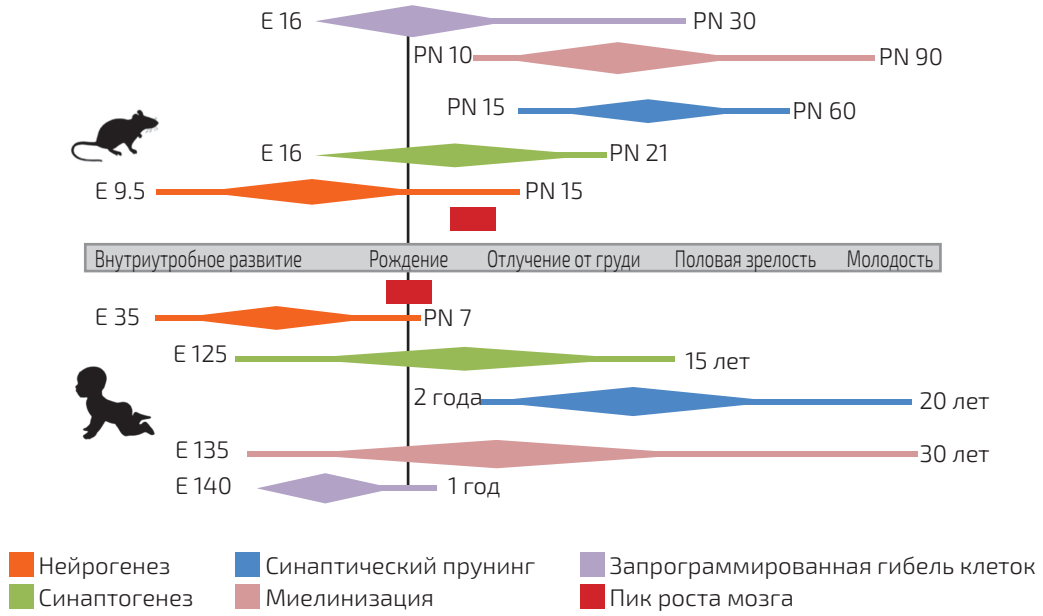


Рис. 1. Основные этапы развития ЦНС крысы и человека. Приблизительные временные рамки этих процессов показаны в отношении периодов онтогенеза: рождение, прекращение грудного вскармливания, половая зрелость, взрослый организм. Всплески роста головного мозга показаны красным. Отдельные процессы имеют цветовую маркировку, при этом пик активности обозначен самой широкой частью ромба: E — дни внутриутробного развития; PN — дни после рождения (Zeiss C.J., 2021)

ка соответствует периоду от 1 до 10 дней постнатального у крыс (Clancy B. и соавт., 2007).

На рис. 1 графически представлены основные этапы развития ЦНС крысы и человека (Zeiss C.J., 2021).

Сердечно-сосудистая система

Постнатальное морфофункциональное развитие сердца, по-видимому, относительно одинаково у всех видов млекопитающих (Barrow P.C., Schmitt G., 2017).

Переход от пренатального кровообращения к послеродовому включает три основных этапа: 1) прекращение плацентарного кровообращения; 2) передача функции газообмена от плаценты к легким; 3) закрытие пренатальных шунтов (артериального протока, овального отверстия сердца) сначала функционально, а затем структурно. Переключение с фетального на взрослый тип кровообращения происходит не сразу. В неонатальном периоде наступает переходный промежуточный период, характеризующийся снижением легочного сосудистого сопротивления,

увеличением легочного кровотока, объема крови в левом предсердии и системного сосудистого сопротивления. В этот период происходит сужение артериального протока и закрытие овального окна.

Человек

У человека функциональное закрытие овального окна происходит очень быстро вместе с первым вдохом в результате гемодинамических изменений, которые удерживают клапан овального окна закрытым. Анатомическое закрытие овального окна представляет собой медленный процесс, который обычно еще не завершается полностью до конца 1-го года жизни (Walsh S.Z. и соавт., 1974) и начинается путем сужения вскоре после первого вдоха. Функциональное закрытие завершается примерно через 15 ч после рождения. Анатомическое закрытие происходит в период до 1 года (Hew K.W., Keller K.A., 2003).

Скорость роста сердца в постнатальный период зависит от вида. У людей относительная масса сердца существенно не меняется от младенчества к взрослому возрасту, а наибольшая вариабельность массы наблюдается у новорожденных (табл. 4) (Hew K.W., Keller K.A., 2003).

Напротив, относительная масса сердца у большинства экспериментальных животных значительно уменьшается с возрастом, а наибольшая вариабельность массы сердца наблюдается у взрослых. У человека и лабораторных животных массовая доля правого желудочка при рождении больше, чем у взрослых, и в постнатальном периоде эта величина меняется на доминирование левого желудочка. Постнатальные изменения формы и размеров сердца варьируют в зависимости от вида (табл. 5) (Hew K.W., Keller K.A., 2003).

На клеточном уровне рост сердца обусловлен как клеточной пролиферацией, так и увеличением клеточного объема. Гипертрофия миоцитов сопровождается увеличением клеточной ДНК. Кардиомиоциты при рождении содержат одно диплоидное ядро. Количество двуядерных клеток быстро увеличивается на ранних постнатальных стадиях. В миоцитах человека большинство этих ядер впоследствии сливаются, что приводит к увеличению полиплоидии. Сердце новорожденного содержит около половины общего количества миоцитов, присутствующих в сердце взрослого человека. Значения взрослых достигаются, вероятно, в возрасте до 4 мес (Hew K.W., Keller K.A., 2003).

При рождении сердечно-сосудистая система резко меняется; артериальное давление, частота сердечных сокращений и сердечный выброс увеличиваются, а распределение кровотока претерпевает региональные изменения. В раннем постнатальном периоде увеличение частоты сердечных сокращений, а не ударного объема, является основным механизмом увеличения сердечного выброса в неонатальном периоде (Hew K.W., Keller K.A., 2003).

У человека средняя базальная частота сердечных сокращений при рождении составляет примерно 120–130 в минуту. Резкое увеличение частоты сердечных сокращений происходит между 5-м и 10-м днем постнатального периода, достигая максимального уровня приблизительно 140–150 в минуту, который затем постепенно снижается до 120 в минуту в течение первых 100 дней после рождения по мере

Таблица 4

Абсолютная и относительная масса сердца человека

Возраст	Средняя масса сердца, г		% от массы тела	
	Пол			
	Мужской	Женский	Мужской	Женский
С рождения и до 1 года	45	35	0,62	0,55
2–4 года	69	55,5	0,43	0,37
5–7 лет	87,7	94	0,35	0,37
8–12 лет	149	120	0,44	0,42
13–17 лет	225	180	0,43	0,38
18–21 год	308	245	0,42	0,42

Таблица 5

Относительная масса сердца лабораторных животных (% от массы тела)

Вид	Новорожденные, %	Взрослые, %
Крыса	0,52–0,57	0,17–0,22
Мышь	0,46	0,44
Кролик	0,49	0,20
Морская свинка	0,39–0,51	0,19–0,23
Собака	0,93	0,76

развития парасимпатических влияний. Частота сердечных сокращений у взрослых (55–85 в минуту) достигается примерно к 12 годам (Hew K.W., Keller K.A., 2003).

Нечеловекообразные приматы

Макаки-резусы и люди имеют одинаковые этапы развития сердечно-сосудистой системы. О развитии сердечно-сосудистой системы яванских макак в литературе имеется мало информации (Li X. и соавт., 2023).

Критическое развитие происходит в период внутриутробного развития и при рождении, тогда как активное развитие — в младенческий период. Критические физиологические изменения, такие как легочное и системное сосудистое сопротивление, регистрируются в неонатальном периоде. Адаптивные изменения миокарда и сосудов, а также увеличение кардиомиоцитов происходят в течение первых 3–6 мес постнатального возраста с прогрессивным ростом и усовершенствованием вплоть до созревания к 4-летнему возрасту (Li X. и соавт., 2023).

У возрастных самок яванских макак наблюдаются изменения в интервалах *QT* и активности вегетативной нервной системы. Интервал *QT* у возрастных самок яванских

макак (25,1±1,1 года) короче, чем у молодых (4,4±0,2 года) в темное время суток. Спектральный анализ электрокардиограммы выявил разницу в активности вегетативной нервной системы у пожилых и молодых яванских макак (Ishizaka T. и соавт., 2009).

Собака, свинья, овца

У ягнят анатомическое закрытие артериального протока завершается после рождения через 1–5 дней, у собак — примерно через 7–8 дней (Hew K.W., Keller K.A., 2003).

У собак количество миоцитов остается относительно постоянным, поскольку сердце увеличивается с возрастом, но резко изменяются форма и размеры миоцитов, межклеточные связи. Значительное повышение артериального давления и снижение частоты сердечных сокращений происходит в период от 1 нед до 6 мес (Adelman R.D., Wright J., 1985). Эти изменения качественно аналогичны тем, которые наблюдаются у младенцев и детей раннего возраста. Рефлекторный контроль барорецепторов у новорожденного развит меньше, чем у сердца взрослого человека.

Частота сердечных сокращений у свиней существенно не меняется с возрастом. Систолическое и диастолическое артериальное давление увеличивается (с 57 до 94 мм рт.ст. и с 38 до 55 мм рт.ст. соответственно) в течение первых 6 дней после рождения (Satoh K. и соавт., 2001).

У овец частота сердечных сокращений, сердечный выброс, желудочковый выброс и ударный объем выше у новорожденных по сравнению со взрослыми особями (Berman W.Jr., Musselman J., 1979). Сердечный выброс у новорожденного ягненка в 4 раза больше, чем у взрослого. При рождении рефлексы барорецепторов проявляют пониженную чувствительность с постепенным постнатальным созреванием до уровня взрослых животных (Dawes G.S. и соавт., 1980).

Грызуны и кролики

У крысы овальное окно уменьшается в первые 2 сут после рождения и полностью закрывается через 3 дня после рождения (Momma K. и соавт., 1992). Анатомическое закрытие овального окна у морских свинок происходит на 26-й день, у хомяков — на 11-й день постнатально (Monie I.W., 1976).

Артериальный проток у млекопитающих закрывается в две стадии — первая функциональная, вторая — анатомическая. Первая стадия происходит в течение нескольких минут после рождения у морских свинок и кроликов и через 10–15 ч после рождения у человека. Функциональное закрытие артериального протока завершается через 2–5 ч после рождения у крыс и мышей (Jarkovska D. и соавт., 1989; Tada T., Kishimoto H., 1990).

Вторая стадия наступает через 1–5 дней у крыс, кроликов, морских свинок и овец, тогда как у человека этот процесс занимает несколько недель (Clyman R.I., 1987; Hew K.W., Keller K.A., 2003; Monie I.W., 1976).

У грызунов на протяжении всей жизни остаются преобладающими двуядерные кардиомиоциты (Hew K.W., Keller K.A., 2003). У крысы, как и у человека, объем клеток миоцитов увеличивается почти в 25 раз, а количество клеток миоцитов — в 3–4 раза от рождения до 2-месячного возраста. Увеличение массы сердца происходит за счет пролиферации клеток до 3–6 дней постнатального периода, за счет гиперплазии

и гипертрофии — до 14-го дня постнатального периода, а затем процесс идет исключительно благодаря гипертрофии.

У кроликов диаметр миоцитов прогрессивно увеличивается (от приблизительно 5 мкм) до взрослых значений (14 мкм), начиная с 8-го дня постнатального развития (Hoerter J. и соавт., 1981). Исследования на новорожденных кроликах показывают, что, как и в случае с младенцами человека, клеточный саркоплазматический ретикулум резко меняется в перинатальный период.

Частота сердечных сокращений у новорожденных крыс увеличивается в раннем постнатальном периоде, а затем остается относительно постоянной во взрослом возрасте. Это увеличение частоты, по-видимому, обратно пропорционально уменьшению интервала *QT*, наблюдаемому в этот период, и может быть объяснено возрастающим влиянием симпатической системы. Оценка коронарного кровотока не выявила существенных различий между неполовозрелыми и взрослыми крысами (Quigley K.S. и соавт., 1996).

Основные особенности развития сердечно-сосудистой системы человека и лабораторных животных представлены в табл. 6.

Дыхательная система

Некоторое структурное развитие легочной ткани и воздухоносных путей происходит после рождения. У человека альвеолярное развитие происходит в основном постнатально, тогда как у яванского макака формирование альвеол завершено при рождении. Несмотря на ограниченность межвидовых сравнительных данных, предполагается, что крыса и собака являются наиболее подходящими животными моделями при исследовании постнатального развития легких (Barrow P.C., Schmitt G., 2017).

Человек

Развитие легких человека — относительно устойчивый и непрерывный процесс, условно разделенный на 6 стадий (Zeltner T.B., Burri P.H., 1987). Первые 4 стадии развития завершаются во время внутриутробного развития. Легкие на момент рождения находятся на 5-й, альвеолярной, стадии развития. Более 85% альвеол формируется уже после рождения (Zoetis T., Hurtt M.E., 2003). Структурные изменения происходят непрерывно с увеличением длины дыхательных путей и количества альвеол по мере взросления ребенка (Thurlbeck W.M., 1975).

Площадь поверхности легких увеличивается в результате повышения числа альвеол. Увеличение площади поверхности легких на поздних стадиях развития в основном заключается в расширении воздушного пространства легких. С возрастом количество альвеол и площадь их поверхности увеличиваются, а к 2–4 годам они начинают выравниваться (Thurlbeck W.M., 1975). Это сопровождается уменьшением интерстициальной ткани. Данные относительно времени завершения формирования альвеол у человека варьируют от 2 лет (Zeltner T.B., Burri P.H., 1987) до 8 лет (Thurlbeck W.M., 1975).

При естественных родах происходит разрыв плодных оболочек, сокращения миометрия матки и прохождение через родовые пути приводят к потере околоплодных

Особенности постнатального развития сердечно-сосудистой системы

Показатель	Человек	Крыса
Форма и размер сердца	Взрослое расположение достигается в возрасте 2–6 лет. При рождении объемы желудочков равны. Объем правого желудочка удваивается к 12 мес, объем левого желудочка не изменяется. Соотношение R/L достигает 2:1 к 2 годам	С возрастом изменяются размеры желудочков, при этом форма сердца становится более сферической
Масса сердца	Относительно постоянная масса сердца. Абсолютная масса увеличивается вдвое к 6 мес и утраивается 1 году; достигает взрослой массы по отношению к массе тела примерно к 21 году	С возрастом снижается относительная масса сердца. Масса увеличивается на 1–5-й день после рождения, в последующем рост замедляется. Сердце увеличивается пропорционально массе тела в 1-й месяц жизни. Позже скорость роста сердца замедляется по сравнению с ростом тела, что приводит к постепенному уменьшению относительной массы сердца
Кардиомиоциты	Количество миоцитов при рождении составляет 50% от взрослого с пролиферацией, значение взрослой особи достигается к 4 мес. Рост в дальнейшем происходит за счет гипертрофии миоцитов: 5 мкм при рождении, 8 мкм в 6 нед, 11 мкм в 3 года, 13 мкм в 15 лет и 14 мкм у взрослых. Миоциты диплоидны при рождении по сравнению с 60% диплоидными и 40% полиплоидными у взрослых	Пролиферация миоцитов (увеличение числа в 3–4 раза) и гипертрофия от рождения до 2-месячного возраста. Увеличение массы сердца обсусловлено пролиферацией клеток до возраста 3–6 дней, гиперплазией и гипертрофией до возраста 14 дней, а впоследствии только гипертрофией. Диаметр миоцитов 5,5 мм через 14 дней, 10,5–11,8 мм через 30 дней и 15–16 мм у взрослых. Миоциты преимущественно диплоидны как у новорожденных, так и у взрослых
Сосуды сердца	Первичные артерии формируются еще до рождения, диаметр коронарных артерий увеличивается вдвое на 1-м году жизни, достигая максимума к 30 годам. Некоторый капиллярный ангиогенез происходит постнатально. Плотность капилляров уменьшается с возрастом	Более незрелые при рождении. Капиллярный и артериальный ангиогенез происходит постнатально. Созревание артерий к 1 месяцу. Объемная доля капилляров достигает максимума 16% к 28-му дню. В дальнейшем плотность капилляров снижается с возрастом

Таблица 6

человека и различных видов лабораторных животных

Собака	Другие виды
С возрастом изменяются размеры желудочков, при этом форма сердца становится более сферической	У кролика и морской свинки основная геометрия сердца не меняется с возрастом
С возрастом снижается относительная масса сердца. Соотношение объема и массы левого желудочка с возрастом не меняется	Скорость роста сердца у мышей пропорциональна росту тела от рождения до 24-недельного возраста. Масса левого желудочка увеличивается с возрастом. Относительная масса сердца у морских свинок колеблется от 0,39–0,51% при рождении до 0,19–0,23% у взрослых с уменьшением относительной доли массы правого желудочка до 57–55% массы левого желудочка. Относительная масса сердца у кроликов снижается с 0,49% при рождении до 0,20% у взрослых
Число клеток миокарда относительно постоянно. Рост преимущественно за счет гипертрофии миоцитов: 7 мм в возрасте 100 дней, 13 мм в 0,5–0,9 года и 14 мм в 1–4,2 года	У мышей объем миоцитов остается относительно постоянным, несмотря на увеличение массы сердца, что указывает на то, что деление клеток происходит в первые 4 дня после рождения. После 5-го дня объем миоцитов заметно увеличивается до 14-го дня постнатального периода, когда рост замедляется. Миоциты достигают своего взрослого объема примерно в 3-месячном возрасте. У кроликов диаметр миоцитов прогрессивно увеличивается (от около 5 мм) до взрослых значений (14 мм), начиная с 8-го дня
Мало доступной информации. Капиллярный ангиогенез происходит постнатально	У кроликов в течение 1-й недели постнатального периода наблюдается быстрый рост капилляров сердца, у взрослых особей роста не обнаружено

Показатель	Человек	Крыса
Иннервация сердца	Морфологически и функционально незрелая при рождении. Число нейронов постепенно увеличивается и достигает максимальной плотности и взрослого состояния в детстве	Морфологически и функционально незрелая при рождении. Адренергическая иннервация формируется к 3-й неделе. Холинергическая и другие типы иннервации также созревают постнатально. Содержащие нейропептид Y и тирозингидроксилазу нервные волокна быстро развиваются в течение первых 2 нед постнатального периода и достигают уровня взрослого животного
Биохимия сердца	Небольшое снижение содержания воды, но концентрация электролитов относительно постоянна. Концентрация цитохромов и митохондриальных белков увеличивается в раннем постнатальном периоде	Быстрое снижение содержания воды до 23-дневного возраста. Увеличение Na и K с максимальным уровнем через 16 дней. Уровень Cl и Ca снижается с возрастом. У неполовозрелых крыс концентрация миоглобина миокарда ниже, чем у взрослых. В отличие от человека, у которого изменения изофермента фосфофруктокиназы, ответственного за переход миокарда с использования в качестве источника энергии углеводов (глюкозы) на жирные кислоты, происходят еще до рождения, изменения изофермента у крыс — в течение первых 2 нед постнатального периода. Зависимость миокарда от углеводов может быть частично обусловлена ограниченной способностью у новорожденных окислять длинноцепочечные жирные кислоты по сравнению с взрослыми. Концентрация цитохромов, митохондриальных белков и ферментов повышается в раннем постнатальном периоде

Продолжение таблицы 6

Собака	Другие виды
Морфологически и функционально незрелая при рождении и продолжает развиваться в течение первых 2–4 мес	Развитие и созревание паттернов адренергической иннервации происходит у морских свинок раньше, чем у крыс. У кроликов плотность холинергичеких волокон сопоставима у взрослого животного и новорожденного
Концентрация цитохромов, митохондриальных белков и ферментов повышается в раннем постнатальном периоде. Уровень креатинина и фосфокреатина повышается у собак после рождения	У хомяков уровень липидов и фосфолипидов сердца увеличивается в течение первых 4 мес после рождения. У морской свинки сердце более зрелое при рождении, чем у крыс, у морских свинок не найдено различий в активности сердечных митохондриальных ферментов между новорожденными и взрослыми. Уровень креатинина и фосфокреатина повышается у кроликов и морских свинок в первые дни после рождения. У мышей, как и у крыс, уровень креатининфосфокиназы в сердце увеличивается после рождения и достигают взрослых значений и типов изоферментов к 25–30-дневному возрасту

Показатель	Человек	Крыса
Сердечный выброс и гемодинамика	Снижение базальной частоты сердечных сокращений от 138 в минуту при рождении до 55–85 в минуту у взрослых. У младенцев и детей младшего возраста объем желудочков, ударный индекс и фракция выброса меньше, но сердечный индекс не отличается от взрослых. Быстрое повышение артериального давления от рождения до 2 мес (систолическое/диастолическое от 62/40 до 85/47 мм рт.ст.); относительно постоянное от 6 мес до 8 лет (диастолическое 58–62 мм рт.ст.)	Раннее увеличение частоты сердечных сокращений остается относительно постоянным и во взрослом возрасте. Это увеличение частоты, по-видимому, обратно пропорционально уменьшению интервала QT, наблюдаемому в этот период, и может быть объяснено возрастающим влиянием симпатической нервной системы. Высокий сердечный выброс и низкое системное сопротивление в постнатальном периоде. Систолическое артериальное давление удваивается у новорожденных и молодых животных и достигает уровня взрослых к 10-недельному возрасту

вод и увеличению давления на легкие плода, что способствует удалению легочной жидкости. Альвеолы раскрываются при первом вдохе. Этот процесс поддерживается наличием сурфактанта, снижающего напряжение альвеолярной поверхности. Выработка новой легочной жидкости снижается в течение короткого периода времени непосредственно перед родами (несколько дней у людей и овец, гораздо меньше у грызунов и других животных с более коротким сроком беременности). Приводит ли это к уменьшению объема жидкости в легких плода, до сих пор непонятно (Siew M.L. и соавт., 2015).

Лабораторные животные

Время наступления каждой стадии развития и степень развития легких при рождении широко варьируют у разных видов (Thurlbeck W.M., 1975). Например, легкие у опоссума при рождении очень примитивны, у крыс и мышей не имеют альвеол,

Окончание таблицы 6

Собака	Другие виды
Значительное повышение артериального давления и снижение частоты сердечных сокращений от 1 нед до 6 мес. Эти изменения качественно аналогичны тем, которые наблюдаются у младенцев и детей раннего возраста. Барорецепторный рефлекторный контроль у новорожденного щенка менее развит, чем у взрослого животного	У мышей с возрастом происходит увеличение сердечного выброса и ударного объема, но без существенных изменений частоты сердечных сокращений и фракции выброса. Показано увеличение частоты сердечных сокращений с 396 в минуту в возрасте 21 дня до 551 в минуту в возрасте 50 дней. Среднее артериальное давление также параллельно увеличивалось с 86 до 110 мм рт.ст. и в дальнейшем оставалось постоянным. Барорефлекторный контроль сердечного ритма у мышей формируется примерно через 2 нед после рождения. Частота сердечных сокращений у свиней существенно не меняется с возрастом. Систолическое и диастолическое артериальное давление у свиней увеличивается (с 57 до 94 мм рт.ст. и с 38 до 55 мм рт.ст. соответственно) в течение первых 6 дней после рождения. У овец частота сердечных сокращений, сердечный выброс, желудочковый выброс и ударный объем выше у новорожденных по сравнению с взрослыми. Сердечный выброс у новорожденного ягненка в 4 раза больше, чем у взрослого. При рождении барорефлекторный контроль сердечного ритма развит плохо и постепенно развивается постнатально

у котят, теленка и человека относительно мало альвеол, а легкие ягненка развиты довольно хорошо. Постнатальное развитие легких изучалось и у других видов: морских свинок, хомяков, собак, обезьян (Lau C., Kavlock R.J., 1994).

Легкие у яванских макак структурно более развиты при рождении, чем у человека. Критическое развитие легких завершается до рождения, а активное развитие — у новорожденных. Легкие структурно зрелые при рождении, прогрессивный рост до функциональной зрелости происходит к 3-летнему возрасту. Яванские макаки имеют зрелые альвеолы и полноценные дыхательные пути при рождении с прогрессивным постнатальным ростом и усовершенствованием. Общее количество респираторных бронхиол и альвеолярных ходов сопоставимо у новорожденных и взрослых животных. Постнатальная дифференцировка и рост имеющихся воздухоносных путей и альвеол преимущественно увеличиваются в размерах. Пик легочного объема приходится на 4–5 лет (Zoetis T., Hurtt M.E., 2003; Hislop A. и соавт., 1984; Xie L. и соавт., 2014).

Сходная с человеком последовательность развития легких наблюдается у грызунов. Постнатальные изменения в легких крыс происходят в 3 фазы: кратковременное расширение, пролиферация и фаза равновесного роста. Первая фаза длится от рождения до 4-го дня после рождения. В этот период легкое переходит из саккулярной стадии в альвеолярную. Во время фазы пролиферации число альвеол увеличивается быстрее, чем масса тела. То же самое касается объема и массы легких. На последней фазе, фазе равновесного роста, легкие увеличиваются в размере параллельно с телом. Эта фаза может длиться до очень позднего возраста (Zoetis T., Hurtt M.E., 2003).

Крыса представляется приемлемой моделью для изучения влияний на развитие легких человека из-за сходства между крысами и людьми в стадиях развития легких.

У мышей развитие дыхательной системы начинается примерно на 9,5-й день ВУР. Через 12,5 дня ВУР четко определяются 4 основные доли в правом легком и 1 главная доля в левом, а через 16,5 дня ВУР дыхательные пути уже представляют собой разветвленную древовидную структуру. Этот период (9,5–16,5-й день ВУР) у мышей обычно называют «псевдожелезистая стадия развития легких». За псевдожелезистой стадией следует канальцевая стадия (16,5–17,5-й день ВУР), затем — саккулярная (17,5-й день ВУР — 5-й день постнатально) и альвеолярная стадия (постнатально 5–28-й день) (Jones M.R. и соавт., 2020).

В табл. 7 представлено сравнение параметров легких крыс и людей (Zoetis T., Hurtt M.E., 2003).

Понятно, что существуют различия между крысами и людьми в развитии легких. Например, крысы рождаются, имея саккулярную стадию развития легких, а люди — альвеолярную. Легкие крысы достигают альвеолярной стадии в возрасте 4 дней, развиваются быстро, причем бóльшая часть развития завершается в течение первых 2 нед после рождения. Более того, легкие крысы продолжают медленно увеличиваться на протяжении всей жизни. Для сравнения, развитие легких у человека продолжается примерно до возраста 3–8 лет, при этом функциональные параметры достигают пика в 18–25 лет (Mauderly J.L., 1979).

В исследованиях постнатального развития легких у собак представлены несколько противоречивые результаты. В одном из них сообщается, что морфологически легкие собаки при рождении несколько менее зрелы, чем человека, в другом, наоборот, — легкие у собак более развиты, чем у людей. Вероятно, внутривидовая биологическая изменчивость является одной из причин противоречивых результатов. Степень зрелости легких на 11-й день постнатального развития у собак, по-видимому, сравнима с таковой у человека при рождении (Boyden E.A., Tompsett D.H., 1961). Признаки развития легких и активности роста были отмечены в возрасте 8 нед. Максимальная функциональная эффективность легких достигается примерно в возрасте 1 года у собак по сравнению с 20 годами у людей (Mauderly J.L., 1979). Собака считается приемлемым видом для тестирования безопасности ингаляционных препаратов, предназначенных для педиатрической популяции (Zoetis T., Hurtt M.E., 2003).

Результаты изучения развития легких у других животных — кролика, овцы, свиньи, обезьяны — показывают, что эти виды менее приемлемы для определения влияния на постнатальное развитие легких человека, так как у этих видов легкие более развиты при рождении по сравнению с людьми (Hislop A. и соавт, 1984; Kerr G.R. и соавт., 1975; Rendas A. и соавт., 1978; Thurlbeck W.M., 1975; Winkler G.C., Cheville N. F., 1985).

Таблица 7

Развитие легких у человека и крысы (цифры представляют значения, указывающие во сколько раз увеличивается параметр от рождения до взрослого возраста)

Параметр легких	Человек	Крыса
Объем, мл	23,4	23,5
Объем воздушного пространства паренхимы, мл	30,2	26,9
Площадь альвеолярной поверхности, м^2	21,4	20,5
Площадь капиллярной поверхности, м^2	23,3	19,2

Таблица 8

Возраст завершения этапов формирования легких у человека и различных видов лабораторных животных

Параметр	Человек	Грызуны	Негрызуны
Увеличение длины респираторного тракта		Крыса/мышь — рост и медленная пролиферация до взрослого возраста	НЧП — до 6 мес
Функциональное созревание альвеолярных макрофагов	Старше 2 лет	Крыса — 6 нед, морская свинка — до ПНД 10	Карликовая свинья — 1 нед, свинья — ПНД 7
Завершение формирования альвеол	2–8 лет	Мышь — ПНД 28–36, крыса — более 3–4 нед	Кролик — 16–24 нед, собака — 16 нед, овца — 6 нед, НЧП — 6 мес, карликовая свинья — ПНД 60
Период созревания микрососудов (двойной капиллярный слой в альвеолярных перегородках сливается с единственным легочным капилляром)	Детство (завершение альвеолярной стадии развития легких)	Крыса — ПНД 14–21, морская свинка — практически завершено на 61-й день внутриутробного развития	Кролик — ПНД 0–4, карликовая свинья — 1 нед, крупный рогатый скот — до 5 мес
Пиковая функциональная способность	18–25 лет	НД	Собака — около 1 года

Примечание. ПНД — день постнатального развития (от англ. postnatal day — PND).

Таким образом, для целей тестирования безопасности ингаляционных агентов в педиатрической популяции в возрасте до 2 лет приемлемыми моделями являются крысы и собаки.

В табл. 8 представлена информация о формировании легких у человека и различных видов лабораторных животных (Lewin G., Hurtt M.E., 2017).

Репродуктивная система

Под термином «половое созревание» (puberty) понимается период становления первой способности к половому размножению, характеризующийся созреванием половых органов, развитием вторичных половых признаков, а у человека и высших приматов — первым появлением менструации. Термин «половозрелый» (sexually mature) — достаточно взрослый или достаточно развитый, чтобы произвести на свет потомство (Laffan S.B. и соавт., 2018).

Мужская репродуктивная система

В целом, есть свидетельства схожих закономерностей постнатального развития мужской репродуктивной системы человека и экспериментальных животных. Однако более детальное изучение процессов развития показывает, что существуют межвидовые различия, которые необходимо принимать во внимание при изучении воздействия исследуемых веществ (Marty M.S. и соавт., 2003).

У человека сперматогенез начинается только в период полового созревания, однако в пренатальный, ранний постнатальный и препубертатный периоды семенники играют решающую роль в выработке гормонов. В раннем постнатальном периоде в семенниках наиболее распространенным типом клеток являются незрелые клетки Сертоли, наблюдается ограниченное количество половых клеток в относительно недифференцированном состоянии. У людей определены три всплеска тестостерона: один на 4–6-й неделе внутриутробного развития, затем с 4-го месяца внутриутробного развития до 3-го месяца постнатально и последний в возрасте от 12 до 14 лет (Müller J., Skakkebaek N.E., 1983).

Половое созревание яванских макак происходит к возрасту 3,3–4,1 года для самок и 5,5 года для маврикийских самцов или 6,7 года для азиатских самцов. Однако в зависимости от генетического происхождения и окружающей среды возраст полового созревания может различаться. Самцы маврикийского происхождения (в среднем 4,6 года) становятся половозрелыми почти на 2 года раньше, чем самцы азиатского (в среднем 6,5 года) (Luetjens C.M., Weinbauer G.F., 2012).

Сперматогенез развивается в период раннего полового созревания в ответ на тестостерон и фолликулостимулирующий гормон (ФСГ). Спермархе определяется по наличию сперматозоидов в сперме и может возникать с 2,8 года у маврикийских яванских макак и с 3,9 года у азиатских (Marshall G.R. и соавт., 1984).

Гормоны, такие как антимюллеров, тестостерон и ФСГ, играют важную роль в развитии органов мужской половой системы. Сывороточный антимюллеров гормон секретируется клетками Сертоли и ингибирует развитие женских репродуктивных путей или мюллеровых протоков у плодов мужского пола. Уровни антимюллерова гормона в сыворотке яванских макак являются самыми высокими у новорожденных и младенцев (первые несколько месяцев после рождения) и снижаются к взрослому возрасту (7–8 лет), что указывает на возрастное снижение экспрессии антимюллерова гормона в клетках Сертоли (Lee M.M. и соавт., 1994).

В отличие от людей и приматов у крыс не наблюдается периода покоя семенников, при котором происходит устойчивое прекращение секреции гонадотропинов.

У крыс постнатальное развитие семенников начинается рано, и созревание неуклонно прогрессирует. Постнатальное половое развитие самцов крыс описывается в 4 стадии: неонатальный период от рождения до 7-дневного возраста, инфантильный период с 8-го по 21-й день после рождения, ювенильный период, продолжающийся примерно до 35-дневного возраста, и препубертатный период до возраста 55–60 дней, заканчивающийся, когда в семявыносящих протоках появляются зрелые сперматозоиды (Ojeda S.R. и соавт., 1980).

Ключевые этапы развития мужской репродуктивной системы человека и различных видов лабораторных животных представлены в табл. 9 (Marty M.S. и соавт., 2003).

В период 35–40 нед ВУР у человека семенники опускаются в мошонку. После опускания семенника паховый канал, по которому он попадает в мошонку, закрывается. Вскоре после этого клетки Сертоли начинают секретировать антимюллеров гормон, уровень которого остается высоким на протяжении всего периода беременности и вызывает регрессию мюллеровых протоков. На 9-й неделе ВУР клетки Лейдига развиваются и секретируют тестостерон (Dutta S. и соавт., 2013).

Опускание семенников у мышей завершается примерно на 25-й день после рождения. Значительное повышение концентрации тестостерона в плазме и семенниках наблюдается между 20-м и 30-м днем постнатально (O'Shaughnessy P.J., Sheffield J.W., 1991). Также есть данные, что у мышей опускание семенников происходит на 14-й день (Emmen J., 2014).

У самцов песчанок опускание семенников происходит в возрасте 30–45 дней, а активный сперматогенез и поведение спаривания появляются в возрасте 70–84 дней (Norris M.L., Adams C.E., 1972).

У самцов песчанок масса тела, семенников и придатков семенников увеличивается до возраста 70, 60 и 90 дней соответственно. Препубертатный период продолжается до 42-го дня, когда достигается половая зрелость и наблюдается резкое увеличение уровня тестостерона в сыворотке крови, зрелых взрослых клеток Лейдига и удлиненных сперматид. У песчанок в возрасте 60 дней обнаруживается значительное количество сперматозоидов в семенниках, а на 70-й день достигается максимальная суточная продукция спермы. Однако самцов песчанок можно считать половозрелыми только с 90-го дня, когда сперматогенез стабилизируется (Pinto-Fochi M.E. и соавт., 2016).

Половое созревание (первая эякуляция) у самцов морских свинок наступает в возрасте 8–10 нед, половая зрелость (готовность к размножению) — в возрасте 3–4 мес. Половое созревание (первая эякуляция) — 8–10 нед (Shomer N.H. и соавт., 2015).

Семенники у кроликов опускаются примерно на 6-й день после рождения, а к 22-дневному возрасту семенники почти всегда обнаруживаются в мошонке (Rajfer J., 1982).

У самцов карликовых свиней быстрое опускание семенников через паховый канал происходит на 77–88-й дни ВУР, далее более медленное опускание происходит в период до 109-го дня ВУР (Heyns C.F., de Klerk D.P., 1985).

Опускание семенников у собак определяется ростом и регрессией губернакулюма (мезенхимальной структуры, соединяющей каудальный полюс семенника с на-

Ключевые этапы развития мужской репродуктивной системы

Параметр	Человек	НЧП
Половая зрелость	12–14 лет	2,5 года
Семенные пузырьки	Присутствуют к 6-му месяцу внутриутробного развития и достигают взрослого состояния формы к 7-му месяцу внутриутробного развития. Развитие мышечной стенки опосредовано стимуляцией эстрогеном. Рост семенных пузырьков продолжается медленно до полового созревания. Секреторная активность андрогензависимая	НД
Сперматогенез	Число сперматогониев увеличивается в 6 раз в период от рождения до 10 лет, а затем увеличивается в период полового созревания. Средний возраст спермархе 13,4 года; эякуляция возможна в период среднего и позднего полового созревания	К концу 1-го года жизни в семенниках сперматогониев становится больше. Сперматозоиды в семенниках появляются уже в 3 года, а период фертильности начинается примерно с 3,5 лет
Клетки Лейдига	Клетки Лейдига начинают продуцировать тестостерон на 7–8-й неделе внутриутробного развития и в конечном итоге попадают под контроль плацентарного гонадотропина (хорионического гонадотропина человека — ХГЧ). Синтез гонадотропинов гипофиза начинается на 12-й неделе внутриутробного развития после начала продукции тестостерона	Клетки Лейдига есть у плода, но их количество уменьшается в течение 1-го года жизни и дедифференцируется. К возрасту 3 года клетки Лейдига редифференцируются. Уровни тестостерона у неполовозрелых самцов составляют около 30–250 нг/100 мл, повышаясь до 230–1211 нг/100 мл у половозрелых самцов
Клетки Сертоли	Дифференцировка клеток Сертоли и выработка антимюллерова гормона начинается в конце I триместра и запускается неизвестным механизмом, опосредованным Y-хромосомой	Нд

Таблица 9

у человека и различных видов лабораторных животных

Крыса	Собака	Мышь
ПНД 43	34–36 нед	ПНД 35
Семенные пузырьки обнаруживаются на ПНД 10, увеличение в размере между ПНД 11–24, морфологическое и функциональное созревание на ПНД 40–50. Секреторные гранулы обнаруживаются на ПНД 16	Нет ни семенных пузырьков, ни бульбоуретральных желез	НД
Сперматогонии в семенных канальцах на ПНД 45, в семявыносящих протоках на ПНД 58–59. Сперматогенез стимулируется увеличением выработки тестостерона и гонадотропинов	Сперматогонии обнаруживаются в семенниках в возрасте 26–28 нед, в придатках семенников — в 26–28 нед	НД
Продукция тестостерона начинается на поздних сроках внутриутробного развития и снижается непосредственно перед рождением. В младенческом ювенильном периоде ПНД 8–35 первичными андрогенами, являются андростендион, 5-альфа-андростандиол и дигидротестостерон, а не тестостерон. Но к ПНД 25* и далее тестостерон становится основным андрогеном	Впервые заметны при гистологическом исследовании на 36–46-й день внутриутробного развития. Количество рецепторов к ЛГ в семенниках начинает увеличиваться в возрасте 2 мес, максимум на 12–24-й месяц. Уровни тестостерона и дигидротестостерона в семенниках начинают повышаться в возрасте 6 мес, достигая плато через 12–24 мес (бигли)	Пролиферация клеток Лейдига зависит от гонадотропина и заканчивается на ПНД 21–33
Увеличение количества на 16-й день внутриутробного развития с пиком деления на 19-й день внутриутробного развития и прекращением деления на ПНД 14–16. Количество рецепторов фолликулостимулирующего гормона на клетках Сертоли заметно увеличивается перед рождением и достигает пика на ПНД 18-й с последующим снижением до ПНД 40–50-го	Впервые идентифицируются на 36–46-й день внутриутробного развития (бигли). Деление до 8 нед после родов; после этого уровень стабильный	Деление находится под влиянием гонадотропина гипофиза и заканчивается на ПНД 17

Параметр	Человек	НЧП
Опущение семенника	Пренатально	При рождении, но вскоре после рождения поднимаются в паховый канал (послеродовая регрессия). В возрасте 3 лет семенники опускаются, увеличиваясь в размерах
Онтогенез эпидидимиса	НД	НД

Примечание. ЛГ — лютеинизирующий гормон; нд — нет данных; НЧП — нечеловекообразные приматы;

ружным отверстием пахового канала). Губернакулярный рост лишь в минимальной степени опосредован тестостероном, тогда как регрессия губернакулюма определяется тестостероном. Третья фаза опускания семенников у собак наступает вскоре после рождения. Согласно исследованию, проведенному на 105 щенках, семенники начинают достигать мошонки в течение 1-й недели жизни, а в возрасте 42 дня почти у 100% щенков оба семенника находятся в своем нормальном положении. Гораздо меньше известно об опускании семенников у кошек. Хотя процесс роста и регрессии губернакулюма, вероятно, аналогичен процессу у собаки, вся миграция через паховый канал в мошонку происходит до рождения, и семенники у самцов кошек свободно перемещаются вверх и вниз по паховому каналу до полового созревания (Romagnoli S., Schlafer D.H., 2006).

Женская репродуктивная система

Под половой зрелостью женского организма понимается состояние способности надежно воспроизводить потомство, что подразумевает функциональную зрелость яичников с установлением регулярного овариального цикла. Конечно, примечательно, что даже в зрелом возрасте не у всех устанавливаются регулярные циклы. Половое созревание начинается во время нейроэндокринных изменений, которые приводят к пубертатным физиологическим изменениям и заканчиваются в то время, когда у большинства женщин устанавливаются функциональные регулярные овариальные циклы, и физическое развитие репродуктивных органов завершается (Laffan S.B. и соавт., 2018).

Основные этапы нейроэндокринного и морфофункционального созревания женской репродуктивной системы человека и лабораторных животных представлены в табл. 10.

Окончание таблицы 9

Крыса	Собака	Мышь
Семенники прикреплены к внутреннему паховому кольцу на 20–21-й день внутриутробного развития. Семенники опускаются в мошонку на ПНД 15	Перемещение семенников через паховый канал начинается на ПНД 3 или 4. Опущение завершается примерно на ПНД 35–42	14 или 25 дней
Не дифференцирован на ПНД 0–15, дифференцирован на ПНД 16–44	От рождения до 20-й недели низкий столбчатый эпителий во всех сегментах. Диаметр просвета медленно увеличивается до 20-й недели, после чего происходит всплеск роста	НД

ПНД — день постнатального развития (от англ. postnatal day — PND); СП — семенные пузырьки.

Секреторная активность гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ) претерпевает периоды временного повышения в течение периодов внутриутробного/неонатального развития, специфичных для каждого вида. У людей и НЧП первоначальная активность возникает в раннем детском возрасте (иногда называемом мини-пубертатным периодом для мужчин). В отличие от особей мужского пола генератор импульсов ГнРГ у новорожденных особей женского пола человека и НЧП не способен индуцировать частоту высвобождения ГнРГ, подобную взрослому. Хотя устойчивый пульсирующий паттерн устанавливается в эмбриональном/неонатальном периоде у особей женского пола, этот паттерн медленнее (Laffan S.B. и соавт., 2018). Термин «генератор импульсного выброса гонадотропин-рилизинг-гормона» относится к синхронизированной импульсной секреции ГнРГ группой нейронов, широко представленных в медиобазальных отделах гипоталамуса. Генератор импульсов необходим для наступления полового созревания. У людей и НЧП половое созревание является вторичной реактивацией существующей, но покоящейся системы генератора импульсов ГнРГ. В юношеском периоде наступает период покоя, за которым следует повторное инициирование, отмечающее начало пубертатного периода. Этот феномен периода покоя не так выражен у самок приматов, как у самцов; по-видимому, низкий уровень активности секреторной системы ГнРГ присутствует на протяжении всего ювенильного периода (Grumbach M.M., 2002; Plant T.M., 2001; Pohl C.R. и соавт., 1995).

С нейробиологической точки зрения время полового созревания является функцией изменений в нервной системе, контролирующей высвобождение ГнРГ. Сроки полового созревания — это не просто функция хронологического возраста, скорее, функция нейротрансмиттерных и нейромодуляторных систем, которые влияют на секреторную сеть ГнРГ, передают информацию о метаболическом состоянии, запасах энергии и соматическом развитии, а для многих видов — информацию

Таблица 10

Межвидовое сравнение нейроэндокринного, морфологического и функционального развития женской репродуктивной системы

Параметр	Человек	НЧП*	Собака	Крыса	Другие виды
Нейроэндокринный контроль					
ГнРГ генератор	Пренатально, максимальное содержание ГнРГ с 22 по 25 недели внутриутробного развития	Пре/неонатально	НД	Неонатальный период	Мышь — ПНД 5–10
Уровень ФСГ	Временное увеличение в первые месяцы жизни	Пик на 5-й месяц после рождения	НД	Увеличение на ПНД 4–24	Пик на ПНД 10, затем снижение
Уровень ЛГ	Временное увеличение в первые месяцы жизни	От 2 нед до 6 мес после рождения, пик в 2 мес (макак-резус)	НД	Низкий уровень с колебаниями на ПНД 4–24	Мышь — резкое увеличение на ПНД 10 и затем поддержание уровня до половозрелости
Период покоя ГнРГ	3–9 лет	4–19 мес (макак-резус)	1–4 мес	НП	
Адренархе	6–8 лет	2–3 мес (макак-резус)	11 нед	НП	
Половое созревание					
Нейроэндокринная инициация гипоталамус—пульсовой ГнРГ генераторгипофиз—пульсовые выбросы ЛГ и ФСГ	10 лет	20–24 мес (макак-резус)	До возраста 4 мес	До ПНД 20	

Окончание таблицы 10

Параметр	Человек	НЧП*	Собака	Крыса	Другие виды
Открытие влагалища	Пренатально	Пренатально	ПНД 21	ПНД 31–36	Мышь (линия СД1) ПНД 26, кролик — ПНД 29
Увеличение синтеза эстрадиола яичниками		2,5–3 года	7–10 мес		Мышь (C57BL) — ПНД 28
Формирование гипоталамо-гипофизарной оси, начало овариального цикла	12–14 лет	18 мес — 2,5 года	12 мес	ПНД 30	
Начало овуляторных овариальных циклов, первая овуляция	6 мес после менархе	2,5–4 года	6–14 мес	ПНД 33–46	
Развитие молочных желез					
Начало пубертатного развития	9–12 лет	До менархе (макаки)	НД	ПНД 25	Карликовые свиньи — 6,5 мес
Завершение развития	15 лет	НД	НД	ПНД 45–55	
Достижение половой зрелости: способность к надежному воспроизведению или возникновению регулярных овуляторных овариальных циклов	16–19 лет	3–5 лет	12–24 мес	ПНД 65	Карликовые свиньи — 6,5–7,5 мес
Начало репродуктивного старения/менопаузы	50 лет	20–30 лет	НД	Крыса линия HW — 6 мес. Крыса линия SD — 4–5 мес	Мышь — более 10 мес, кролик — 1–3 года

Примечание.

** Информация относится к яванским макакам [макакам-крабоедам (Macaca fascicleis)], если не указано иное.*

ГнРГ — гонадотропин-рилизинг-гормон, ЛГ — лютеинизирующий гормон, ПНД — день постнатального развития; НП — неприменимо; ФСГ — фолликулостимулирующий гормон; HW — Han Wistar, SD — Sprague Dawley.

о сезонной и социальной среде. Таким образом, у большинства видов существуют большие различия между особями в начале и скорости полового созревания, особенно это характерно для НЧП и людей (Laffan S.B. и соавт., 2018).

У самок млекопитающих в начале полового созревания высвобождение ГнРГ активирует высвобождение ЛГ и способствует возникновению первого предовуляторного выброса гонадотропинов из гипофиза (Ojeda S.R. и соавт., 2006). В ответ на гонадотропины яичник начинает вырабатывать стероиды, что свидетельствует о начале полового созревания яичника. Гонадархе, или начало функционирования яичников, характеризуется способностью яичника вырабатывать эстрадиол, который не проявляется до момента полового созревания (Morohasi K. и соавт., 2013). Это резко контрастирует с созреванием мужской репродуктивной системы, когда эмбриональные гонады производят значительное количество андрогенов.

У людей увеличение скорости роста (пубертатный рост) является первым физическим признаком полового созревания, которое сопровождает начало развития молочных желез обычно в 8–12 лет, средний возраст 11 лет.

Чтобы оценить прогресс полового созревания у самок крыс и мышей, можно провести серию оценок. Открытие влагалища обычно является первым изменением, которое можно зафиксировать. После открытия влагалища проводится мониторинг первого эструса по анализу цитологии вагинального лаважа. Первый эструс обычно наступает вскоре после открытия влагалища у мышей, но с задержкой на несколько дней у крыс (Goldman J.M. и соавт., 2007), но это зависит от линии и условий содержания. Присутствие самцов может ускорить развитие самок. Начало первого эстрального цикла предполагает установление гормональной цикличности, хотя эстральные циклы обычно нерегулярны в течение некоторого времени до достижения регулярных эстральных циклов (Goldman J.M. и соавт., 2007; Laffan S.B. и соавт., 2018).

У крыс к 6-му дню постнатального периода большинство фолликулов индивидуализируются и образуют примордиальные фолликулы, но остатки гнезд зародышевых клеток все еще можно наблюдать. Развитие фолликулов продолжается медленно в течение следующих недель (Picut C.A. и соавт., 2014; Picut C.A. и соавт., 2015).

Примерно к возрасту 15 дней начинают формироваться ранние антральные фолликулы, а в течение следующих нескольких недель формируются волны третичных фолликулов, но затем они подвергаются атрезии. Эти волны антральных фолликулов не следует путать со зрелостью, поскольку в этот момент овуляции нет. Когда у крыс начинается первый проэструс, примерно в возрасте 30 дней (Picut C.A., Remick A.K., 2016), присутствуют большие антральные фолликулы, готовые к овуляции.

У крыс открытие влагалища совпадает с первой овуляцией, у хомяков происходит в возрасте 8–10 дней, задолго до первого эструса. Наступает эстральный цикл, а первая овуляция начинается в возрасте около 30 дней (Hisano N., 1977).

Открытие влагалища у самок песчанок происходит в период от 40-го до 76-го дня, половое созревание — в возрасте 63–84 дней (Norris M.L., Adams C.E., 1972).

У самок морских свинок с анатомической точки зрения есть мембрана, перекрывающая вагинальный канал. Она исчезает и восстанавливается в каждом репродуктивном цикле. Это происходит вследствие гормонального влияния на про-

тяжении всей жизни самок. В эстральном цикле вагинальный канал остается открытым от 3 до 7 дней, что совпадает с фазами проэструса, эструса и метаэструса. У половозрелых самок во время эструса мембрана остается открытой в течение 1–3 дней, но у молодых самок эта фаза может длиться дольше. Морские свинки рождаются уже относительно развитыми. Масса новорожденных от 60 до 100 г, они полностью покрыты шерстью, уши и глаза открыты, способны есть твердую пищу и самостоятельно пить воду. Известно, что половое созревание наступает в возрасте 55–70 дней; первый эструс обычно наступает в среднем в возрасте 68±21 день. Однако самки могут достичь половой зрелости менее чем в месячном возрасте при массе тела 300 г. В одном исследовании сообщалось о редком возникновении эструса всего лишь в 20-дневном возрасте. Результаты проведенного позднее исследования показали широкий диапазон возраста спонтанного открытия вагинальной окклюзионной мембраны от 15 до 60 дней (de Matos A.S. и соавт., 2022). Половое созревание самок (готовность к размножению) наступает в возрасте 2–3 мес. Продолжительность эстрального цикла 15–17 дней, беременности — 59–72 дня (Shomer N.H. и соавт., 2015).

У кроликов половая зрелость наступает в возрасте 3–5 мес (Laffan S.B. и соавт., 2018).

В литературе обсуждается возраст половой зрелости самок геттингенских карликовых свиней. Считалось, что около 5 мес они имеют массу тела около 12 кг. Однако недавнее ретроспективное исследование, определяющее половую зрелость как наличие желтых тел в яичнике, показало, что, хотя половая зрелость может быть достигнута у некоторых карликовых свиней, начиная с 5-месячного возраста, только 50% самок в возрасте 6,5 мес были половозрелыми и у 100% не было желтых тел в яичниках до возраста 7,5 мес (масса тела около 13 кг) (Tortereau A. и соавт., 2013).

Начало полового созревания у собак породы бигль обычно начинается примерно в 6-месячном возрасте, при этом признаки проэструса/эструса первого цикла (например, серозно-кровянистые выделения, набухание вульвы и/или влечение к самцам) наблюдаются в возрасте от 8 до 14 мес (Wildt D.E. и соавт., 1981). Сроки и клинические признаки, наблюдаемые у сук пубертатного возраста, сильно варьируют.

Сообщается, что у НЧП менархе наступает примерно в возрасте от 2,5 до 3 лет (Weinbauer G.F. и соавт., 2008), тогда как достижение более регулярного цикла может произойти только в возрасте около 4 лет. Эта закономерность аналогична описанной выше у людей, и возникновение длительных ановуляторных периодов после первых признаков менструального кровотечения является нормальным.

У НЧП развитие фолликулов начинается медленно, и к 6-месячному возрасту часто уже присутствуют антральные фолликулы. Поскольку в доклинические исследования токсичности часто включаются неполовозрелые особи, в яичнике часто наблюдаются многочисленные фолликулы малого и среднего размера с различной степенью атрезии наряду с неактивным эндометрием. Информированность об этих нормальных особенностях развития имеет решающее значение при оценке токсических эффектов у НЧП этого возраста. Кроме того, у молодых макак часто определяются многочисленные полиовулярные фолликулы (Cline M.J., Wood C.E., 2008).

У яванских макак менархе наступает в возрасте 2–3 лет, а регулярные менструальные циклы — в возрасте 4 лет. Менархе и последующие менструальные циклы

начинаются у немногих самок в возрасте 18–21 мес, в 2,3–2,5 года у 60% самок, 3,3–3,5 года у 85% и в возрасте 4 лет более чем у 90% самок азиатских яванских макак. Менархе и менструальные циклы сопровождаются повышением уровня эстрадиола и прогестерона в плазме. Другое исследование продемонстрировало, что менархе наступает в среднем в 3,3 года. Средний возраст регулярного менструального цикла и первой беременности составляет 4,1 и 5,4 года соответственно. Временной интервал между менархе и регулярными менструациями составляет примерно 9 мес, а между регулярными менструациями и первой беременностью — 2,2 года (Kobayashi M. и соавт., 2018; Weinbauer G.F. и соавт., 2008).

Развитие фолликулов яичников и атрезия у яванских макак начинаются в возрасте от 3 до 6 мес. После созревания средний менструальный цикл составляет 30,4±4,7 дня и варьирует от 19 до 69 дней (Weinbauer G.F. и соавт., 2008).

Фолликулярная фаза длится 12–14 дней, периовуляторный интервал — примерно 3 дня, лютеиновая фаза — 14–16 дней. Морфология и масса яичника и матки изменяются в течение овариального цикла; масса яичников и матки самая низкая в ранней фолликулярной фазе и самая высокая в ранней лютеиновой фазе. Масса яичников и матки достигает пика в возрасте от 5 до 5,5 лет у самок яванских макак (Li X и соавт., 2023).

После менархе у людей наступает период подросткового бесплодия до наступления первой овуляции, обычно через 6 мес, а затем менструальные циклы нерегулярны в течение многих лет до позднего подросткового возраста. У крыс и мышей овуляции спонтанные, всплески гонадотропина происходят в середине цикла и вызывают изменения в созревании фолликулов и ооцитов в яичниках. Открытие влагалища у крыс происходит в возрасте от 30 до 37 дней. Во время первого эструса поздний фолликулярный рост первой овуляторной когорты стимулируется примерно за 8 дней до первой овуляции, событие, которое происходит примерно во время открытия влагалища у крыс (Cheung C.C и соавт., 1997). Затем у самок появляются повторяющиеся 4–5-дневные циклы, но непосредственно после открытия влагалища наблюдается тенденция к увеличению количества нерегулярных циклов. У мышей может пройти несколько дней/недель после открытия влагалища, прежде чем пройдет первая овуляция (Goldman J.M. и соавт., 2000).

Типы репродуктивных циклов у различных биологических видов представлены в табл. 11.

Репродуктивное старение представляет собой серию нарушений эстрального цикла, которые возникают как нормальные возрастные изменения у крыс и мышей и знаменуют конец функциональной репродуктивной фазы жизни у этих видов. Репродуктивное старение отличается от менопаузы тем, что начальные изменения центрально опосредованы изменениями функции гипоталамуса. У мышей для оценки начала репродуктивного старения анализируется цитологический состав вагинального лаважа. Если в вагинальных мазках определяются ороговевшие клетки в преобладающее число дней тестирования (75% дней и более), считается, что у мышей устанавливается персистирующий эструс. В возрасте 10 мес менее чем у 10% мышей C57BL/6J в мазке постоянно определяются ороговевшие клетки, поэтому начало репродуктивного старения для большинства мышей можно считать начинается в возрасте более 10 мес (Witham E.A. и соавт., 2012).

Таблица 11

Репродуктивные циклы[7] человека и лабораторных животных (Laffan S.B. и соавт., 2018)

Вид	Тип цикла	Продолжительность цикла	Возраст начала цикла	Возраст первой овуляции	Возраст начала регулярного цикла
Крыса	Полиовуляторный эстральный цикл	4–5 дней	ПНД 30	ПНД 33–46	ПНД 65
Мышь	То же	4–5 дней	CD-1 — ПНД 27, беспородные — ПНД 39	CD-1 — ПНД 35	Беспородные — ПНД 49
Собака	»	5–7 мес	6,5–14 мес	12 мес (8–16 мес)	Неприменимо
Карликовые свиньи	»	21 день	4–6 мес	6,5–7,5 мес	НД
НЧП	Моноовуляторный менструальный цикл	Яванские макаки — 28–32 дня	18 мес	2,5–3 года	3–4 года
Человек	То же	28 дней	12–14 лет	6 мес после менархе	В течение 5 лет после менархе

Примечание. ПНД — день постнатального развития.

Практически в токсикологических исследованиях не используются НЧП в постменопаузе, если только исследования специально не нацелены на разработку модели старения на животных. НЧП обычно достигают менопаузы после 20 лет (или 30 лет по некоторым данным). В отличие от грызунов основной причиной является снижение фолликулярных резервов, что приводит к атрофии яичников у приматов (Buse E. и соавт., 2008).

[7] Термин «эструс» происходит от греческого слова, обозначающего слепня, или подкожного овода, относящегося к семейству *Oestridae*. В период течки корова бывает крайне возбуждена, часто мычит и носится по пастбищу, то есть ведет себя так же, как во время преследования оводами, поэтому греки использовали слово «эструс» для обозначения ее поведения в этот период. В русскоязычной литературе термином «эструс» иногда обозначают течку — физиологический процесс во влагалище, сводящийся к слущиванию ороговевшего вагинального эпителия и выделению слизистых секреторных продуктов из половых путей самки. Поведенческие реакции самки во время течки называют половой охотой. У всех видов млекопитающих в момент овуляции наблюдается «эструсное» поведение, единственное исключение составляет человек. Поскольку у женщин эструс отсутствует, нельзя говорить об эстральном цикле у человека. Единственным внешним признаком, указывающим на присутствие у женщины половых циклов, является менструация. В отличие от эструса менструация представляет собой не поведенческое, а физиологическое явление (хотя она может иметь некоторые поведенческие признаки). Такое явление как менструация присуще только человеку и приматам Старого Света.

У кроликов репродуктивная способность заканчивается примерно в возрасте от 1 года до 3 лет (Laffan S.B. и соавт., 2018).

В зависимости от вида существуют разные конечные точки оценки репродуктивного развития самок. У НЧП менструальные циклы фиксируются с помощью ежедневных мазков из влагалища. Кроме того, можно контролировать уровень гормонов, хотя это может быть трудоемким и требует тщательного планирования исследования (Weinbauer G.F. и соавт., 2008). Типичный дизайн исследования на грызунах, в котором измеряются функциональные параметры F1, такие как половое созревание и фертильность, не считается практичным для исследования на НЧП, поскольку половая зрелость (для яванских макак) наступает приблизительно в 3–6 лет, и для достижения половой зрелости поколения F1 и рождения поколения F2 потребуется от 4 до 8 лет (Weinbauer G.F. и соавт., 2008).

На рис. 2 схематично представлены основные этапы развития женской репродуктивной системы человека и лабораторных животных.

Таким образом, репродуктивное развитие самцов во многом сопоставимо у разных видов. Ориентиры репродуктивного развития самок более вариабельны

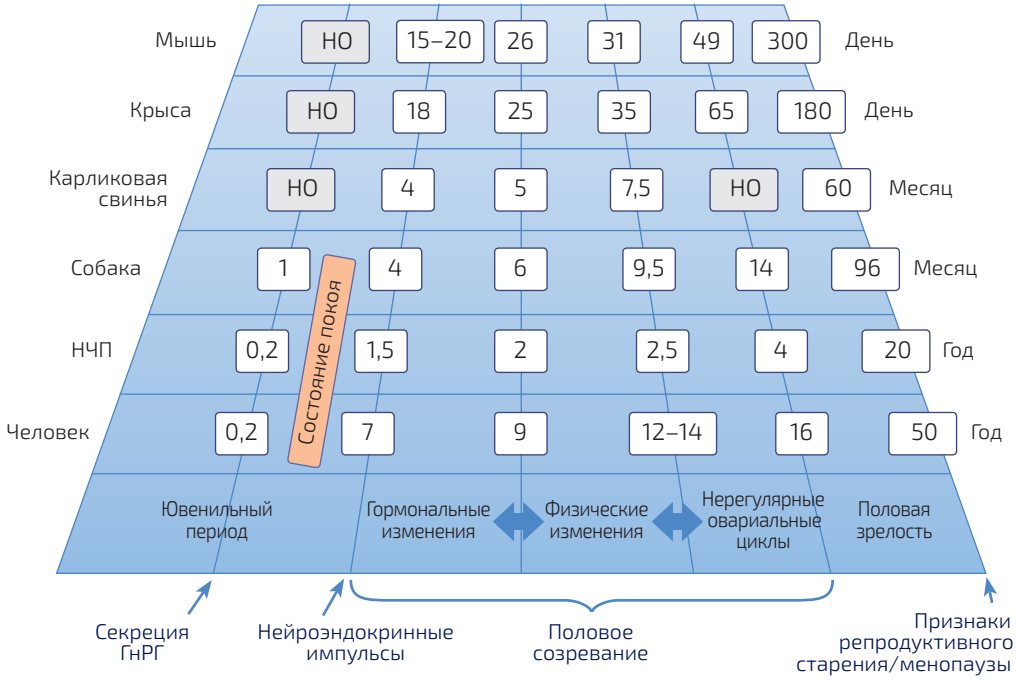


Рис. 2. Сравнение видов по срокам развития женской репродуктивной системы. Данное графическое представление дает лишь приблизительную оценку порядка и времени событий. Кроме того, в данных литературы есть несоответствия, вероятно, из-за различий в линиях, породах. НО — не определено, ГнРГ — гонадотропин-рилизинг гормон (Laffan S.B. и соавт., 2018)

у разных видов из-за различных типов овариального цикла. Грызуны, кролики и карликовые свиньи являются наиболее практичными видами для изучения влияния на половое созревание, поскольку оно происходит у этих видов раньше, чем у собак или НЧП (Barrow P.C., Schmitt G., 2017).

Выделительная система

Формирование почек представляет собой хорошо регулируемый процесс, сочетающий пролиферацию, дифференцировку, апоптоз и морфогенез. Пролиферация продолжается на протяжении всего периода развития почек и приводит к значительному увеличению массы органа. В результате дифференцировки в процессе зародышего развития формируется метанефрос, который является функционально активной почечной структурой, содержащей канальцы и клубочки. Апоптоз приводит к удалению различных клеток на протяжении нефрогенеза (Frazier K.S., 2017).

В неонатальный период почка у всех видов животных меньше почки взрослого организма, масса почки увеличивается в ювенильный период. Однако по сравнению с общей массой тела почки увеличиваются гораздо медленнее, чем организм в целом. Следует отметить, что количество клубочков постоянно в период от рождения до зрелости, при этом увеличение объема почек связано с возрастанием массы канальцев. Более низкая масса канальцев почек в ювенильный период обусловливает более низкую способность к реабсорбции жидкости по сравнению со взрослым организмом, из-за чего возникает повышенный риск обезвоживания у новорожденных (Frazier K.S., 2017).

Почки млекопитающих развиваются сходным образом. Исследования на культурах клеток почек обезьян, овец, собак, кроликов и крыс показывают, что характер роста и морфологические особенности развития каждого типа клеток одинаковы для всех изученных видов (Holdsworth S.R. и соавт., 1978). Однако степень зрелости почки на момент рождения различается между видами. Нефрогенез завершается еще до рождения у НЧП, обезьян, мышей и морских свинок, но не у крыс, собак, свиней и кроликов. Таким образом, мышь может быть более подходящей, чем крыса, для изучения потенциальной нефротоксичности соединений для новорожденных (Barrow P. C., Schmitt G., 2017).

Анатомическое развитие

Возраст завершения нефрогенеза у человека и различных видов лабораторных животных указан в табл. 12.

Человек

Почка человека начинает развиваться на 5-й неделе внутриутробного развития. Почки и сосудистая сеть в них развиваются в одно и то же время, процесс завершается примерно на 35–36-й неделе внутриутробного развития. Примерно 20% нефронов формируются к 3-му месяцу беременности, 30% — к 5-му месяцу, всего к 34-й неделе беременности образуется примерно 800 000 нефронов. Юкстамедуллярные нефроны образуются раньше (к 5-му месяцу внутриутробного развития),

Таблица 12

Возраст завершения нефрогенеза у различных видов лабораторных животных и человека

Вид	Возраст
Человек	До рождения (35-я неделя внутриутробного развития)
НЧП	До рождения
Овца	То же
Морская свинка	»
Собака	2-я неделя постнатального периода
Свинья	3-я неделя постнатального периода
Мышь	До рождения
Крыса	До 11-го дня постнатального периода

а поверхностные кортикальные нефроны — позже (к 34-й неделе внутриутробного развития). Постнатальное созревание нефронов и удлинение канальцев продолжается в течение 1-го года жизни (Bernstein J., 1991; Witte M.K. и соавт., 1986).

Лабораторные животные

Нефрогенез у обезьян завершается при рождении (Seikaly M.G., Arant B.S., 1992). Постнатальное созревание нефронов и удлинение канальцев продолжаются до возраста 5 мес (Frazier K.S., 2017).

У яванских макак критическое и активное развитие выделительной системы завершается в неонатальный и младенческий периоды. Прогрессивное увеличение скорости клубочковой фильтрации и концентрационной функции почечных канальцев происходит в течение первых 6 мес жизни. Рост и улучшение функции почечных канальцев, а также развитие оси эритропоэтина и ангиотензина происходят в течение первых 2 лет. Почки достигают своей функциональной зрелости в возрасте 2–3 лет (Li X. и соавт., 2023). У собак при рождении почка незрелая как по структуре, так и по функциям. При исследовании слепков почечных сосудов щенков в возрасте от 1-го до 21-го дня показано, что внутрипочечная сосудистая система и проксимальные канальцы еще полностью не сформированы по сравнению с теми же показателями у взрослой собаки. Нефрогенез у собак продолжается в течение как минимум 2 нед после рождения (Evan A.P. и соавт., 1979).

Клубочковый кровоток и, следовательно, созревание изучали с помощью инъекции микросфер у 26 щенков в возрасте от 5 ч до 42 дней и у 5 взрослых собак. Корковое вещество почки разделяли на четыре равные зоны и в каждой подсчитывали клубочки. Результаты подтвердили, что нефрогенез все еще продолжается на момент рождения. У новорожденных клубочки внутренней зоны крупнее таковых наружной зоны, но это различие постепенно исчезает по мере роста почки (Olbing H. и соавт., 1973).

У овец нефрогенез завершается при рождении (Lumbers E.R., 1995).

Нефрогенез у кроликов заканчивается через 2–3 нед после рождения (Seikaly M.G., Arant B.S., 1992).

Нефрогенез у крыс происходит быстрыми темпами в период от рождения и до возраста 8 дней, завершается к 11-дневному возрасту. Дифференцировка канальцев продолжается до прекращения молочного вскармливания (до возраста 21 день), а функциональная зрелость наступает еще позже (Kavlock R.J., Gray J.A., 1982). Формирование сосудов почки активно происходит постнатально до возраста 12 дней и длится до возраста 17–19 дней (Sequeira Lopez M.L., Gomez R.A., 2011).

Одним из факторов, влияющих на нефрогенез, является нутритивный статус матери. У детенышей крыс, получавших низкобелковую диету на 8–14-й или 15–22-й день беременности, наблюдалось меньшее количество нефронов и меньший размер почек. Это сохранялось до 19-недельного возраста, пока скорость клубочковой фильтрации не достигала нормальных значений (Langley-Evans S.C. и соавт., 1999).

У мышей нефрогенез происходит пренатально, как и у людей. Нефрогенез начинается на 11-й день внутриутробного развития и завершается к моменту рождения (Fouser M.D. и соавт., 1993). Дифференцировка канальцев заканчивается к рождению. Формирование сосудов почки начинается на 15-й день внутриутробного развития и заканчивается постнатально к возрасту 7 дней (Sequeira Lopez M.L., Gomez R.A., 2011).

Функциональное развитие

Основные этапы функционального развития почек человека и лабораторных животных представлены в табл. 13.

Человек

По сравнению с функцией почек взрослого человека у младенцев наблюдаются сниженные почечный кровоток, скорость клубочковой фильтрации, канальцевой секреции и более кислый pH мочи (Witte M.K. и соавт., 1986). Почечный кровоток и скорость клубочковой фильтрации прогрессивно увеличиваются во время внутриутробного развития и достигают функционального созревания к 32–35-й неделе внутриутробного развития. Продукция мочи у человека начинается на 10-й неделе внутриутробного развития. Уровни сывороточного креатинина в течение 1-го и 2-го дня после родов отражают материнские значения и снижаются до 0,2–0,4 мг/дл к 3-му месяцу. Повышение уровня креатинина указывает на снижение скорости клубочковой фильтрации независимо от срока беременности (Gomez R.A. и соавт., 1999).

Изменение размера клубочков в детстве соответствует обычной кривой роста: средний диаметр при рождении составляет 100 мм, затем увеличивается до 300 мм. Однако скорость клубочковой фильтрации не увеличивается пропорционально размеру тела. До 34-й недели внутриутробного развития масса и размеры тела плода увеличиваются, но скорость клубочковой фильтрации нет, после этого она увеличивается быстрее, чем масса тела (Bernstein J., 1991).

Периоды анатомического и функционального развития

Стадия	Человек
Развитие канальцев и клубочков	Формирование канальцев начинается на 5-й НВУ, заканчивается на 36-й НВУ
Формирование сосудов почки	Завершается на 34–36-й НВУ
Удлинение почечных канальцев (формирование петли Генле и дистальных собирательных трубочек)	52 нед после рождения
Функциональное созревание (способность концентрировать мочу)	52 нед после рождения
Кислотно-щелочное равновесие	Возраст 8 нед
Максимальная скорость клубочковой фильтрации	Полная функция к 35-й НВУ, но максимум в возрасте 52–104 нед. После рождения быстрый рост скорости клубочковой фильтраци
Установление максимального ренального кровотока	Функциональное созревание к 32–35-й НВУ; у младенцев наблюдается сниженный почечный кровоток

Примечание. ПНД — день постнатального развития; НВУ — неделя внутриутробного развития; ПНД — день постнатального развития (до ПНД 1 — до дня постнатального развития).

После рождения быстрый рост скорости клубочковой фильтрации объясняется несколькими факторами, включая повышение среднего артериального и клубочкового давления, резкое снижение сопротивления почечных сосудов с перераспределением внутрипочечного кровотока из юкстамедуллярных в поверхностные кортикальные нефроны (Toth-Heyn P. и соавт., 2000).

Новорожденный ребенок при рождении не способен выделять концентрированную мочу, и эта функция достигает зрелости к 1-му году жизни. Способность почек концентрировать мочу определяется механизмами, контролирующими водный баланс. Нормальная осмоляльность регулируется вазопрессином (антидиуретическим гормоном), контролируемым гипоталамусом. Механизм, регулирующий продукцию вазопрессина, начинает действовать через 3 дня после рождения, в это время почки становятся чувствительными к вазопрессину. Основная функция канальцев — реабсорбция клубоч-

Таблица 13

почки у различных видов млекопитающих

Крыса	Мышь	Негрызуны
Формирование канальцев начинается на 14-й ДВУ, заканчивается до ПНД 28; формирование нефрона заканчивается к ПНД 10, дифференцировка — к ПНД 21	Нефрогенез начинается на 8–10-й ДВУ, заканчивается к 20-му ДВУ; дифференцировка канальцев заканчивается до 19-го ДВУ	Собака — нефрогенез завершается к ПНД 14, свинья, кролик — нефрогенез завершается к ПНД 21, обезьяна — нефрогенез до 26-го НВУ
Завершается к ПНД 17–19	Начинается на 15-й ДВУ, заканчивается на ПНД 7-й	Собака — заканчивается к 6-й неделе постнатально, обезьяна — до ПНД 1
ПНД 28	ПНД 21	Обезьяна — 20-я неделя постнатально
ПНД 11	ПНД 21	Кролик — возраст 5 нед, собака — до ПНД 1, обезьяна — возраст 20 нед
ПНД 17	НД	Собака — возраст 13 нед, обезьяна — возраст 22 нед
ПНД 42	ПНД 28–32	Собака — возраст 8–10 нед, обезьяна — возраст 26 нед
ПНД 16–24	ПНД 16–22	Собака — ПНД 12, обезьяна — до ПНД 1

ДВУ — день внутриутробного развития;

кового фильтрата. Длина и объем канальцев увеличиваются в постнатальном периоде, что приводит к повышению способности к транспорту и метаболизму (Bernstein J., 1991).

Кислотно-щелочное равновесие и контроль объема развиваются постнатально как у большинства лабораторных животных, так и у людей (Frazier K.S., 2017).

Уровни выделяемых фосфатов до рождения и в течение первых 2 дней после рождения очень низкие, что приводит к низкой кислотности мочи. После начала кормления новорожденного кислотность мочи изменяется прямо пропорционально количеству белков, сульфатов и фосфатов в рационе и обратно пропорционально скорости роста тела. Нарушения равновесия могут быть вызваны изменениями в потреблении пищи у 2–3-недельного ребенка, тогда как эти же изменения не затрагивают 2-месячного ребенка. (Walker D.G., 1968). У человека подкисление мочи достигает максимума через 8 нед после рождения (Gomez R.A., Norwood V.F., 1999).

Лабораторные животные

При изучении различных видов лабораторных животных были выделены 3 стадии развития скорости клубочковой фильтрации. Первая стадия характеризуется эквивалентными темпами увеличения скорости клубочковой фильтрации и массы почек, вторая — большей скоростью увеличения клубочковой фильтрации, чем ростом почек. На заключительной стадии скорость клубочковой фильтрации увеличивается в той же пропорции, что и масса почек. Эти 3 стадии необязательно коррелируют с анатомическим развитием разных видов (Kleinman L.I., 1982).

У обезьян функциональное развитие почек происходит до возраста 5 мес. Считается, что почечный кровоток полностью созревает у обезьян до рождения, как и у людей, но это было подтверждено только на яванских макаках. У обезьян контроль кислотно-щелочного баланса достигается к 22-недельному возрасту (Frazier K.S., 2017).

При рождении у собак почка незрелая как по структуре, так и по функциям. Функционально у щенка более низкие скорость клубочковой фильтрации и почечный кровоток по сравнению со взрослой особью. Скорость клубочковой фильтрации увеличивается с возрастом в постнатальном периоде. Согласно исследованиям клиренса с использованием малых и больших молекул, увеличение площади поверхности капилляров клубочков и плотности пор происходит между 1-й и 6-й неделей постнатально. У собак скорость клубочковой фильтрации считается функционально зрелой к 6-й неделе (Goldsmith D.I. и соавт., 1986).

У собак контроль кислотно-щелочного баланса достигается в возрасте 90 дней (Frazier K.S., 2017). В исследовании на беспородных собаках постнатальная экскреция мочевой кислоты снизилась с 83% при рождении до 51% в возрасте 90 дней. На ранних стадиях развития наблюдалась прямая корреляция между мочевой кислотой и клиренсом натрия. Это исследование показывает, что кислотно-щелочной гомеостаз развивается у собак в постнатальном периоде (Stapleton F.B., Arant B.S., 1981). Фракционная реабсорбция воды у собак постоянна в течение постнатального созревания (Kleinman L.I., 1982). Способность концентрировать мочу развивается у собак пренатально.

Исследования на кроликах показывают, что температура тела новорожденного может влиять на скорость клубочковой фильтрации. У новорожденных кроликов снижение температуры тела на 2 °C вызывает сужение почечных сосудов, сопровождающееся снижением скорости клубочковой фильтрации. Мозговое вещество почки кролика созревает после 21-го дня жизни (Zoetis T., Hurtt M.E., 2003a).

Исследования на животных продемонстрировали роль ферментов в установлении и поддержании кислотно-щелочного равновесия. Карбоангидраза — металлофермент цинка, катализирующий гидратацию CO_2 и дегидратацию угольной кислоты. Активность карбоангидразы была обнаружена в проксимальных извитых канальцах и во внутренней собирательной трубочке мозгового вещества кролика, а также в наружных собирательных трубочках мозгового вещества кролика. Карбоангидраза IV играет важную роль в поддержании кислотно-щелочного равновесия. Предполагается, что низкие уровни карбоангидразы в почках новорожденных могут объяснить трудности поддержания кислотно-основного гомеостаза. Показано, что у крольчат экспрессия карбоангидразы IV составляет примерно одну четверть

уровня взрослых в возрасте 2 нед и резко возрастает на 3-й и 4-й неделе постнатально. Способность концентрировать мочу развивается с такими же временными характеристиками. У кроликов пик концентрационной способности достигается к 5-й неделе после рождения (Schwartz G.J. и соавт., 1999).

У лабораторных грызунов функциональное созревание как корковых, так и медуллярных элементов обычно завершается к 21–28-дневному возрасту (Schwartz G.J. и соавт., 1999).

Скорость клубочковой фильтрации резко возрастает у крыс в течение первых 6 нед постнатально (Horster M., 1977), достигая своего максимума к первому дню после рождения (Gomez R.A., Norwood V.F., 1999) по сравнению с возрастом установления максимальной скорости клубочковой фильтрации у мышей — 28–32-й день. У лабораторных грызунов функциональное созревание как корковых, так и медуллярных элементов обычно завершается на 21–28-й день (Schwartz G.J. и соавт., 1999).

Максимальный почечный кровоток наблюдается в период после отъема в возрасте от 16 до 24 дней у крыс и 16–22 дней у мышей (Frazier K.S., 2017; Kleinman L.I., 1982).

Крысы не выделяют концентрированную мочу при рождении, которая резко возрастает с возрастом (Kavlock R.J., Gray J.A., 1982). Поскольку скорость клубочковой фильтрации одного нефрона увеличивается по мере созревания, реабсорбция натрия в проксимальных канальцах увеличивается пропорционально (Kleinman L.I., 1982). У крыс мРНК карбоангидразы IV — фермента, который, как считают, играет роль в поддержании кислотно-щелочного равновесия — экспрессируется в почках 20-дневных плодов и резко увеличивается к 17-му дню постнатально (Schwartz G.J. и соавт., 1999).

У морских свинок фракционная реабсорбция воды постоянна в течение постнатального созревания (Kleinman L.I., 1982).

Таким образом, при проведении межвидовых сравнений необходимо принимать во внимание как анатомическое, так и функциональное развитие почек. Окончание анатомического развития почки — это завершение нефрогенеза, который завершается до рождения у людей, обезьян, мышей, овец и морских свинок и после рождения у крыс, собак и свиней. У разных видов созревание функции почек, включая клубочковую фильтрацию, концентрационную способность, кислотно-щелочное равновесие, контроль объема мочи, происходит в разные сроки. Клубочковая фильтрация присутствует уже в I триместре беременности и играет важную роль в канальцевой реабсорбции Na и Cl, что помогает поддерживать баланс Na в околоплодных водах. Концентрационная способность развивается постнатально у людей, крыс, кроликов и овец и пренатально у собак и морских свинок. Способность поддерживать кислотно-щелочное равновесие формируется постнатально у изученных видов, включая человека, крыс, кроликов и собак. Контроль объема мочи развивается в постнатальном периоде (Zoetis T., Hurtt M.E., 2003a).

Гепатобилиарная система

Сроки функционального развития различных ферментов печени могут иметь решающее влияние на метаболизм и фармакокинетику лекарственных препаратов при их применении у детей или молодых животных. Морфологическое созревание

печени завершается у человека примерно к 5 годам, у крысы — к 4 нед. У собаки печень морфологически формируется к возрасту 1 нед (Barrow P. C., Schmitt G., 2017).

Человек

Изменения, происходящие во время постнатального созревания печени человека, включают истончение печеночных балок, а также увеличение размера клеток печени, диаметра печеночной дольки и объема эндоплазматической сети (de Zwart L.L. и соавт., 2004). При рождении гепатоциты, составляющие печеночные балки (или пластинки), обычно располагаются таким образом, что толщина пластинок составляет не менее трех клеток. По мере взросления печени толщина пластинок снижается, и у взрослых это одна клетка. К 5–6-месячному возрасту в печени еще доминируют многослойные пластинки (de Zwart L.L. и соавт., 2004). Дополнительные слои в печеночных пластинках ребенка контролируют вход и выход веществ из синусов. К 5 годам печень достигает полной зрелости.

В печени синтезируются холевая кислота и хенодезоксихолевая кислота — желчные кислоты, синтезируемые клетками печени из холестерина. Прежде чем эти первичные желчные кислоты секретируются в желчь, они конъюгируют с глицином или таурином. У новорожденных ток желчи существенно ниже, чем у взрослых, и в течение первых нескольких недель послеродового периода преобладают первичные желчные кислоты, в основном конъюгированные с таурином (образуется таурохолевая кислота), с возрастом увеличивается конъюгация с глицином. Преимущественно первичные желчные кислоты были обнаружены в двенадцатиперстной кишке новорожденных в возрасте 1–4 и 5–7 дней и детей в возрасте 7–12 мес, тогда как дезоксихолевая кислота не обнаруживалась. У взрослых бóльшая часть солей желчных кислот реабсорбируется путем активного транспорта в дистальном отделе подвздошной кишки. Пассивная диффузия желчных кислот (конъюгированных с глицином и неконъюгированных) также может происходить в верхних отделах желудочно-кишечного тракта и в толстой кишке. У детей раннего возраста способность активно транспортировать таурохолевую кислоту выражена не в полной мере, поэтому для компенсации этой функциональной незрелости значительные количества (до 60%) желчных кислот могут всасываться в тощей и толстой кишке в отличие от дистального отдела подвздошной кишки, как это наблюдается у взрослых. К 8-му месяцу после рождения начинается активное всасывание таурохолевой кислоты (de Zwart L.L. и соавт., 2004).

Лабораторные животные

У яванских макак гепатобилиарная система хорошо развита при рождении, причем с прогрессирующим увеличением метаболической функциональности. Переход между выработкой и выведением желчи завершается в неонатальном периоде. Метаболические и элиминационные способности увеличиваются в младенчестве и постоянно совершенствуются в подростковом возрасте (Li X. и соавт., 2023). Критическое развитие гепатобилиарной системы происходит в первые 3–6 мес после рождения с последующим постоянным усовершенствованием и расширением функ-

циональности до достижения зрелости в возрасте 3–4 года (Koyanagi T. и соавт., 2015).

Экспрессия большинства ферментов цитохрома P450 (CYP) у плода яванских макак низкая, но значительно увеличивается в постнатальном периоде. Уровни экспрессии CYP2A23, CYP2A24, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2C76, CYP2D17, CYP2E1, CYP3A4 и CYP3A5 гораздо ниже в печени плода, но существенно увеличиваются после рождения. Экспрессия CYP2C8 сопоставима в печени плода и в постнатальном периоде. Экспрессия CYP3A7 в печени плода низкая, но значительно увеличивается после рождения. В целом содержание или активность печеночных CYP достигает уровня взрослых в возрасте 3 лет и снижается с 12 до 32 лет (Akahori M. и соавт., 2005; Koyanagi T. и соавт., 2015).

Было показано, что у павианов желчесекреторная функция печени при рождении незрелая. В течение первых 7 дней после рождения секреция печеночной желчи существенно увеличивается. Скорость потока желчи увеличивалась в течение 1-й недели до уровня, сравнимого с таковым у взрослых павианов. К 7-му дню после рождения отток желчи увеличился примерно на 50% (Bhat R. и соавт., 1997).

У собак структура печени, особенно структура клеток печени (гепатоцитов и клеток желчных протоков), а также сеть желчных протоков достигают характеристик у взрослых особей к 1-й неделе постнатального периода. В частности, бóльшая часть структурного созревания происходит в течение первых 3 дней после рождения, при этом полная зрелость структуры желчных протоков происходит к концу 1-й недели после рождения (Tavoloni N. и соавт., 1985; Tavoloni N., Schaf fner F., 1989).

Желчесекреторная функция печени у собак не является полностью зрелой при рождении, но к 4–6-й неделе постнатального периода составляет от 30 до 70% от значений взрослых (Tavoloni N. и соавт., 1985; Tavoloni N., Schaf fner F., 1989). Реабсорбция воды через желчные протоки не происходит в течение первых 3 дней после рождения, однако к 4–6-й неделе постнатального периода реабсорбция воды в желчных протоках увеличивается примерно до 50–70% от уровня взрослых (Tavoloni N. и соавт., 1985; Tavoloni N., Schaf fner F., 1989). Кроме того, по сравнению со значениями для взрослых концентрация желчных кислот и средний объем желчи были значительно ниже у собак в возрасте 0–42 дней, в то время как поток желчи (в общем желчном протоке) был относительно сопоставим с таковым у взрослых (Tavoloni N. и соавт., 1985). Показано также, что у собак концентрация желчных кислот и общее содержание желчных кислот в желчном пузыре увеличиваются с возрастом. Когда концентрацию желчных кислот, измеренную при рождении (78,4 мМ), через 28 дней (224 мМ) и 42 дня (236 мМ), сравнивали с таковой у взрослых животных (298 мМ), было отмечено, что уже к 28-дневному возрасту она была сопоставима с показателями взрослых животных. К 42-му дню общее содержание желчных кислот увеличивалось более чем на 60% от значений взрослых (Tavoloni N. и соавт., 1985).

У новорожденных собак соотношение массы печени к массе тела примерно в 2 раза выше, чем у взрослых животных. Из-за этого при сравнении функции секреции желчи у молодых собак с функцией взрослых в качестве основы для сравнения необходимо использовать массу печени, а не массу тела. (Tavoloni N. и соавт., 1985; Walthall K. и соавт., 2005).

Печень поросят в 1-е сутки после рождения существенно не увеличивается. В течение первых 24 ч после рождения печень свиньи прибавляла в массе 6,8 г, а в течение следующих 9 дней после рождения масса печени увеличивалась примерно на 9,4 г в день. К 10-му дню постнатального периода масса печени возрастала примерно в 3 раза (Walthall K. и соавт., 2005).

У свиней в возрасте 3–6 дней бóльшая часть секретируемых желчных кислот конъюгирована с глицином или таурином (Henning S.J., 1981).

У кроликов было обнаружено, что в течение 1-й недели после рождения менее 5% клеток печени не дифференцированы, что составляло менее 1% от общего объема печени. Размер гемопоэтических клеток незначительно увеличивался в период от 1 нед до 2 мес после рождения. Размер гепатоцитов уменьшался в течение первой постнатальной недели, после чего происходило трехкратное увеличение (за счет роста цитоплазмы) до взрослого уровня (Milner R.D., Pownall L., 1981). За первые 24 ч после рождения печень кроликов существенно не меняла массу, но к 7-му дню после рождения была примерно в 2 раза больше, чем при рождении (Walthall K. и соавт., 2005).

В ходе исследований образования желчи в печени у кроликов во время постнатального развития было показано, что как отток желчи, так и секреция солей желчных кислот низкие сразу после рождения, но постепенно увеличиваются. Желчеобразование и секрецию желчных солей исследовали у животных в возрасте 10–30 дней (возрастные группы: 10–14, 18–22, 25–30 дней). Наименьшие желчеотделение и секреция желчи наблюдались у животных в возрасте 10–14 дней. С увеличением возраста поток желчи растет, при этом у животных в возрасте 25–30 дней приближается к уровню взрослых (Shaffer E.A. и соавт., 1985).

У крыс процент печеночных пластинок толщиной в одну клетку резко увеличивается в период с 8-го до 28-й день после рождения (Alexander B. и соавт., 1997).

На 28-й день после рождения созревание печени практически завершается, при этом включает обширное ремоделирование структуры. Через 28 дней после рождения архитектура печени у крыс была аналогична той, которая наблюдается в печени взрослого животного.

Печеночный желчный поток у крыс уменьшается с возрастом в течение 1-го года жизни. Когда поток печеночной желчи сравнивали у животных в возрасте 1 и 12 мес, поток желчи, наблюдаемый в 12 мес, был значительно меньше. Фактически через 12 и 24 мес после рождения ток печеночной желчи снизился примерно на 40–50% по сравнению с тем, который наблюдался через 1 мес после рождения. У новорожденных крыс снижена секреция и энтерогепатическая циркуляция солей желчных кислот. Обнаружено, что отсутствие не только солей желчных кислот, но и секреции липазы поджелудочной железы приводило к появлению целых глобул молочного жира в просвете двенадцатиперстной кишки крысят в период молочного вскармливания. В частности, наблюдался липолиз глобул, происходящий между микроворсинками кишечника. Активное всасывание солей желчных кислот в подвздошной кишке не начиналось до 15-го дня постнатального развития и к 26-му дню после рождения было сравнимо с таковым у взрослой особи (Henning S.J., 1981; Thomson A.B., Keelan M., 1986).

У крыс масса печени увеличивается только в течение первых 12 мес после рождения, далее остается постоянной (Walthall K. и соавт., 2005).

Основные этапы развития гепатобилиарной системы человека и лабораторных животных представлены в табл. 14.

Таким образом, печень человека морфологически и функционально созревает к 5 годам. Структурные изменения, происходящие во время постнатального созревания печени человека, включают истончение печеночных пластинок, а также увеличение размера клеток печени, диаметра печеночной дольки и объема эндоплазматической сети. В неонатальном периоде ток желчи значительно ниже, чем у взрослых, и желчные кислоты в основном конъюгированы с таурином.

Печень крысы претерпевает структурные изменения, аналогичные тем, которые наблюдаются у человека в постнатальном периоде, и через 28 дней после рождения созревание практически завершается. Отток печеночной желчи у крыс снижается с возрастом в течение 1-го года постнатального периода.

Изменения количества и размеров гепатоцитов у кроликов происходят в процессе постнатального развития. Поток желчи и секреция солей желчи сразу после рождения низкие, но постепенно увеличиваются до уровня, приближающегося к таковому у взрослых животных при отъеме.

У собак максимальное структурное созревание происходит в течение первых 3 дней после рождения, при этом полная зрелость структуры желчных протоков наступает к концу 1-й недели постнатального периода. Эндогенная продукция желчных кислот, средний выброс желчи и отток желчи при рождении низкие и увеличиваются с возрастом, но печеночные механизмы секреции и экскреции желчи, по-видимому, полностью развиты при рождении (Walthall K. и соавт., 2005).

Пищеварительная система

Органы желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), как правило, хорошо развиты при рождении, но некоторое структурное и значительное функциональное развитие происходит постнатально. Сроки функционального созревания различаются между видами животных, при этом характер функционального развития относительно одинаков, причем основной движущей силой этих функциональных изменений являются изменения в рационе питания. Поскольку характер роста и развития сходны как для лабораторных животных, так и для людей, постнатальное развитие ЖКТ можно оценить на животных, и ни один лабораторный вид не является в этом плане предпочтительным как модель постнатального развития ЖКТ человека. Однако между видами существуют некоторые различия в развитии ЖКТ, которые нужно учитывать при интерпретации исследований, проводимых на ювенильных животных (Walthall K. и соавт., 2005).

Желудок

Человек

Наиболее интенсивный рост желудка, особенно его дна и пилорического отдела, происходит в течение 1-го года жизни. Окончательно формирование заканчивается в 7–12 лет. Мышечная оболочка желудка у новорожденного развита слабо. Слизистая оболочка желудка у новорожденного толстая, складки высокие. В течение первых

Основные этапы развития гепатобилиарной системы

Параметр	Человек	Крыса
Созревание печени	Морфологически и функционально созревает к 5 годам. Структурные изменения включают истончение печеночных пластинок, а также увеличение размера клеток печени, диаметра печеночной дольки и объема эндоплазматической сети. При рождении печеночные балки (или пластинки) толщиной не менее трех клеток. По мере взросления печени толщина пластинок снижается и у взрослых составляет одну клетку. К 5–6-месячному возрасту в печени еще доминируют многослойные пластинки	Созревание печени практически завершается через 28 дней после рождения. У крыс процент печеночных пластинок толщиной в одну клетку резко увеличивается в период с 8-го до 28-й день после рождения
Печеночная желчь	В неонатальном периоде ток желчи значительно ниже, чем у взрослых, и желчные кислоты в основном конъюгированы с таурином. С возрастом увеличивается конъюгация с глицином. У взрослых бóльшая часть солей желчных кислот реабсорбируется путем активного транспорта в дистальном отделе подвздошной кишки. Пассивная диффузия желчных кислот (конъюгированных с глицином и неконъюгированных) также может происходить в верхних отделах ЖКТ и в толстой кишке. У детей раннего возраста способность активно транспортировать таурохолевую кислоту выражена не в полной мере, поэтому для компенсации этой функциональной незрелости значительные количества (до 60%) желчных кислот могут всасываться в тощей и толстой кишке в отличие от дистального отдела подвздошной кишки, как это наблюдается у взрослых. К 8-му месяцу после рождения начинается активное всасывание таурохолевой кислоты	Отток печеночной желчи у крыс снижается с возрастом в течение 1-го года постнатального периода. Печеночный желчный поток у крыс уменьшается с возрастом в течение 1-го года жизни. Через 12 и 24 мес после рождения ток печеночной желчи снизижается примерно на 40–50% по сравнению с тем, который наблюдается через 1 мес после рождения. У новорожденных крыс снижена секреция и энтерогепатическая циркуляция солей желчных кислот. Обнаружено, что активное всасывание солей желчных кислот в подвздошной кишке не начинается до 15-го дня постнатального развития и к 26-му дню после рождения сравнимо с таковым у взрослой особи

Таблица 14

человека и лабораторных животных

Собака	Кролик	Другие виды
У собак наибольшее структурное созревание происходит в течение первых 3 дней после рождения	Изменения количества и размеров гепатоцитов у кроликов происходят в процессе постнатального развития. В течение 1-й недели после рождения менее 5% клеток печени не дифференцированы, что составляет менее 1% от общего объема печени. Размер гемопоэтических клеток незначительно увеличивается в период от 1 нед до 2 мес после рождения. Размер гепатоцитов уменьшается в течение первой постнатальной недели, после чего происходило трехкратное увеличение размера гепатоцитов до взрослого уровня (увеличение за счет роста цитоплазмы)	НД
Реабсорбция воды через желчные протоки не происходит в течение первых 3 дней после рождения; однако к 4–6-й неделе постнатального периода реабсорбция воды в желчных протоках увеличивается примерно до 50–70% от уровня взрослых. По сравнению со значениями для взрослых концентрация желчных кислот и средний объем желчи значительно ниже у собак в возрасте 0–42 дней, в то время как поток желчи (в общем желчном протоке) относительно сопоставим с таковым у взрослых. У собак концентрация желчных кислот и общее содержание желчных кислот в желчном пузыре увеличиваются с возрастом. Уже к 28-дневному возрасту концентрация желчных кислот сопоставима с показателями взрослых животных.	Отток желчи и секреция солей желчных кислот низкие сразу после рождения, но постепенно увеличиваются. Наименьшие желчеотделение и секреция желчи наблюдаются у животных в возрасте 10–14 дней. С увеличением возраста поток желчи растет, при этом у животных в возрасте 25–30 дней он приближается к уровню взрослых	У свиней в возрасте 3–6 дней бóльшая часть секретируемых желчных кислот конъюгирована с глицином или таурином. У павианов желчесекреторная функция печени при рождении незрелая. В течение первых 7 дней после рождения секреция печеночной желчи существенно увеличивается. Скорость потока желчи увеличивалась в течение первой недели до уровня, сравнимого с таковым у взрослых павианов. Гепатобилиарная система яванских макак относительно развита при рождении, при этом критическое развитие происходит в первые 3–6 мес после рождения с последующим постоянным усовершенствованием и расширением функциональности до достижения зрелости к 3–4-му году

Параметр	Человек	Крыса
Масса печени	НД	У крыс масса печени увеличивается в течение первых 12 мес после рождения, далее не увеличивается

Примечание. Нд — нет данных.

3 мес жизни поверхность слизистой оболочки увеличивается в 3 раза (способствует лучшему перевариванию молока), а к 15 годам — в 10 раз. Желудочные железы к рождению морфологически и функционально развиты недостаточно, их относительное количество (на 1 кг массы тела) у новорожденных в 2,5 раза меньше, чем у взрослых (Ткачук Е.А., Мартынович Н.Н., 2020).

В желудке новорожденного обычно меньше главных клеток по сравнению со взрослыми, и эти клетки обычно не способны продуцировать пепсин. По мере постнатального развития число главных клеток увеличивается, что способствует утолщению железистой части желудка (Deren J.S., 1971). При рождении в желудке присутствуют париетальные (обкладочные) клетки. Масса париетальных клеток (на единицу площади) в желудке новорожденного примерно в 2–3 раза превышает таковую взрослого человека. Объем секреции пепсина и соляной кислоты постепенно увеличивается в течение первых месяцев после рождения, pH желудка новорожденных детей высокий и со временем снижается. Сообщалось, что к 2-летнему возрасту ребенка количество соляной кислоты, секретируемой в желудке, сравнимо с таковым у взрослых (по массе тела) (Deren J.S., 1971).

По сравнению со взрослыми скорость опорожнения желудка у младенцев относительно медленная и может варьировать в зависимости от типа потребляемой пищи. В целом в желудке происходит меньший объем всасывания, чем в тонком кишечнике (de Zwart L.L. и соавт., 2004).

Однако существуют определенные факторы, которые могут увеличивать или уменьшать всасывание через желудок у новорожденных и детей грудного возраста. Новорожденные имеют высокий pH желудка, что может способствовать быстрому всасыванию некоторых соединений. Например, кислотолабильные соединения и слабые основания (в частности, атропин, кофеин и другие метилксантины) легко всасываются из желудка новорожденных. Сообщалось, что такие соединения, как атропин и метилксантины, давали токсический эффект у детей раннего возраста, когда дозы рассчитывались без учета повышенного всасывания из-за высокого pH желудка (de Zwart L.L. и соавт., 2004).

Окончание таблицы 14

Собака	Кролик	Другие виды
У новорожденных собак соотношение массы печени к массе тела примерно в 2 раза выше, чем у взрослых животных. Из-за этого при сравнении функции секреции желчи у молодых собак с функцией взрослых в качестве основы для сравнения необходимо использовать массу печени, а не массу тела	За первые 24 ч после рождения печень кроликов существенно не меняет массу. Однако к 7-му дню после рождения масса печени у кроликов примерно в 2 раза больше, чем при рождении	Печень поросят в 1-е сутки после рождения существенно не увеличивается. К 10-му дню постнатального периода масса печени увеличивается примерно в 3 раза

Симбиотические бактерии в ЖКТ защищают от болезнетворных микроорганизмов, стимулируют развитие иммунной системы и поддерживают слизистую оболочку кишечника. До рождения ЖКТ стерилен, во время и после рождения бактерии начинают его заселять. Как у людей, так и у животных постнатальная колонизация ЖКТ сначала происходит за счет появления лактобацилл, энтеробактерий (то есть *Escherichia coli*) и стрептококков. К 1-му дню постнатального развития в ЖКТ младенца присутствуют кишечная палочка, стрептококки, бактероиды и бифидобактерии. В течение первых нескольких дней после рождения наиболее распространенными видами микробов в ЖКТявляются колиформы и стрептококки. Через 4–7 дней после рождения появляются анаэробные бактерии, такие как бактероиды, бифидобактерии и клостридии. У грудных детей, находящихся на грудном вскармливании, обычно доминируют бифидобактерии, тогда как лактобактерии преимущественно преобладают у людей и животных, находящихся на искусственном вскармливании (Mackie R.I. и соавт., 1999).

Лабораторные животные

Постнатальное развитие желудка морской свинки, свиньи и кролика сходно с таковым у человека; однако существуют видовые различия в отношении времени и последовательности появления «специализированных» железистых клеток (Deren J.S., 1971).

Развитие ЖКТ у макак-резусов при рождении происходит более быстро, чем у людей, тогда как развитие гепатобилиарной системы у макак и человека сопоставимо. В литературе имеется мало информации о развитии ЖКТ у яванских макак. ЖКТ у макак в значительной степени функционален при рождении, но постоянно адаптируется к изменению рациона в течение 1-го года жизни и далее до достижения половой зрелости к 3-летнему возрасту (Li X. и соавт., 2023).

Критическое развитие завершается до рождения, а активное — в течение 1–3 мес после рождения. После рождения секреция соляной кислоты, колонизация микро-

биомом, перистальтика и другие адаптивные пищеварительные и транспортные функции устанавливаются при отъеме в возрасте около 6 мес. Функциональность пищеварительной системы и всасывающая способность развиваются по мере изменения сложности рациона питания в подростковом периоде (Li X. и соавт., 2023).

У свиней в постнатальном периоде масса желудка существенно увеличивается в период молочного вскармливания (Jensen M.S. и соавт., 1997). В других исследованиях показано, что масса желудка свиньи быстро растет в течение первых 24 ч после рождения. В течение первых суток после рождения масса желудка увеличивается на 28%, в течение следующих 9 дней — на 23% в день, так что к 10-му дню после рождения масса желудка возрастает более чем в 3 раза (Widdowson E.M., 1985).

При рождении желудок свиньи секретирует соляную кислоту. Секреция кислоты в желудке 2-дневной свиньи вдвое меньше, чем у 3-недельной. Внешне париетальные клетки в желудке новорожденных свиней схожи с таковыми взрослых особей, но при более внимательном рассмотрении обнаруживаются небольшие плотные гранулы возле канальцев, которые исчезают по мере созревания клеток (Deren J.S., 1971). В желудке новорожденных поросят незначительное количество активности пепсина присутствует при рождении и не увеличивается до 3-й или 4-й недели постнатального периода (Walthall K. и соавт., 2005).

У собак секреция соляной кислоты начинается через 1–2 дня после рождения (Deren J.S., 1971). В желудке секреция пепсина происходит примерно через 21 день после рождения (Walthall K. и соавт., 2005).

Показано, что уровни желудочной липазы увеличиваются с 1-го по 21-й день постнатального периода и снижаются с 21-го по 42-й день (Buddington R.K., 1994). Несмотря на это снижение, активность желудочной липазы на 42-й день значительно выше, чем на 63-й день во взрослом возрасте (Deren J.S., 1971).

В отношении бактериальной колонизации все отделы ЖКТ собак породы бигль уже к 1-му дню после рождения колонизируются бактериями (Walthall K. и соавт., 2005).

В течение первых нескольких дней после рождения масса желудка кролика существенно увеличивается. К 3-му дню после рождения масса желудка кролика увеличился в 2,5 раза по сравнению с таковой при рождении (Widdowson E.M., 1985).

При рождении желудок кролика секретирует соляную кислоту (Deren J.S., 1971). Начало секреции гастрина у кроликов происходит внутриутробно. Секреция пепсина начинается или значительно увеличивается примерно на 3-й неделе. В отношении бактериальной колонизации желудок кролика остается стерильным в период молочного вскармливания (Walthall K. и соавт., 2005).

Желудок крысы при рождении не секретирует пепсин (Deren J.S., 1971). Отсутствие пепсина в желудке крысы в раннем неонатальном периоде приводит к тому, что белки не расщепляются в желудке и могут попасть в тонкий кишечник в виде целой молекулы (Henning S.J., 1981). Отсутствие пепсина важно для абсорбции материнских антител в тонком кишечнике, где они всасываются целиком и попадают в систему кровообращения новорожденного. Примерно в 3-недельном возрасте у мышей и крыс происходит резкий рост слизистой оболочки желудка, сопровождающийся функциональным созреванием, о чем свидетельствует выраженное увеличение секреции пепсина (Deren J.S., 1971). Уровни гастрина в желудке крыс низкие до 18-го дня после рождения, после чего происходит резкое повышение (Henning S.J.,

1981). Исследования на крысах показали, что рецепторы гастрина, незрелые в 1-ю и 2-ю неделю после рождения, начинают созревать только на 3-й неделе после рождения. В этот период клетки слизистой оболочки желудка начинают выделять соляную кислоту в ответ на стимуляцию гормоном гастрином. У крыс заметное увеличение количества соляной кислоты, секретируемой слизистой оболочкой желудка, обычно происходит на 3-й неделе постнатального периода, а секреция кислоты увеличивается еще больше на 4-й и 5-й неделе постнатального периода. К 6-й неделе постнатального периода (40-дневный возраст) секреция соляной кислоты снижается до уровня взрослых крыс (Deren J.S., 1971).

У грызунов с началом молочного вскармливания микробное содержимое желудка представлено преимущественно лактобактериями, колонизирующими слизистую оболочку желудка. Кроме того, присутствуют факультативные анаэробы, включая *E. coli* и *Streptococcus faecalis*. В течение 2-й недели постнатального периода популяция этих бактерий высока, и колонии также наблюдаются на всей поверхности слизистой оболочки ЖКТ, включая слизистую оболочку толстой кишки (Savage D.C., 1981).

Кишечник

Человек

Тонкий кишечник постоянно растет как в длину, так и в диаметре от рождения до взрослого возраста. К тому времени, когда человек достигает взрослого возраста, площадь функциональной поверхности тонкого кишечника увеличивается более чем в 40 раз (de Zwart и соавт., 2004). Постнатальное созревание тонкого кишечника включает в себя созревание слизистой оболочки, которая служит барьером, предотвращающим проникновение вредных веществ, таких как бактерии, токсины и антигены, в большой круг кровообращения. У новорожденных макромолекулы легче проникают через слизистый барьер тонкого кишечника, чем у пожилых людей (de Zwart и соавт., 2004). В раннем постнатальном периоде макромолекулярные антигены могут проходить через слизистую оболочку кишечника. Хотя материнские иммуноглобулины передаются потомству внутриутробно, в раннем неонатальном периоде кишечник человека относительно проницаем для белка. Эта проницаемость позволяет важным макромолекулам, таким как эпидермальный фактор роста и иммуноглобулин G (IgG), содержащимся в грудном молоке, транспортироваться в системный кровоток посредством специфического транспортного процесса (рецептор-опосредованный эндоцитоз).

В толстом кишечнике человека кишечные крипты развиваются на поздних сроках внутриутробного развития. К моменту рождения пролиферативная активность в криптах обычно организована во многом аналогично кишечным криптам толстой кишки взрослого человека (Bristol J.B., Williamson R.C., 1984). Клетки крипт толстого кишечника (то есть вакуолизированные столбчатые, слизистые и эндокринные клетки) присутствуют при рождении. После рождения происходит 100-кратное увеличение количества кишечных крипт, а также популяции клеток кишечных крипт. Это приводит к заметному увеличению размеров слизистой оболочки толстой

кишки. Ферментативная активность развивается в толстом кишечнике младенцев еще до рождения. Например, активность щелочной фосфатазы, лактазы присутствует в толстой кишке человека к 13-й неделе внутриутробного развития (Menard D., Calvert R., 1991). В толстом кишечнике Na-K-АТФаза играет важную роль в активном транспорте натрия и пассивном переносе воды через эпителий толстой кишки (Colony P.C. и соавт., 1989). При рождении всасывание натрия и анионный обмен развиты недостаточно, но быстро развиваются в течение 1-го года жизни (Milla P.J., 1986). Примерно через 25 ч после рождения в толстой кишке новорожденных присутствуют бифидо- и лактобактерии. К концу 1-й недели постнатального периода обнаруживаются анаэробные кокки. Клостридии обнаруживаются в толстой кишке в течение первых нескольких дней после рождения, и их количество быстро снижается к концу 1–2-й недели после рождения (Gustafsson B.E., 1982).

Лабораторные животные

Степень созревания кишечника при рождении варьирует среди многих видов млекопитающих. В целом считается, что зрелость кишечника при рождении зависит от продолжительности периода внутриутробного развития. Такие виды, как мышь и крыса, имеют короткий период беременности и поэтому при рождении очень незрелые, у других видов — морская свинка и свинья — более длительный период беременности и, следовательно, более развитый кишечник при рождении (Pacha J., 2000). У животных с относительно длительным сроком беременности развитие кишечника в периоды внутриутробного и раннего постнатального развития больше похоже на таковое у человека, чем тот же процесс у животных с коротким сроком беременности.

Во время беременности макромолекулы, такие как материнские иммуноглобулины, всасываются через кишечник всех видов млекопитающих посредством пиноцитоза (Widdowson E.M., 1985). При рождении кишечник сохраняет некоторую степень проницаемости для макромолекул (иммуноглобулины, факторы роста и пищевые антигены), степень и продолжительность которой варьируют у разных видов.

Тонкий кишечника свиньи изменяется постнатально как по своей структуре, так и функции, к 3-й неделе постнатального периода достигается большинство характеристик взрослой особи (Smith M.W., 1988). У свиней при рождении тонкий кишечник проницаем для IgG молозива. У свиней материнские иммуноглобулины не передаются внутриутробно, поэтому важно, чтобы кишечник сохранял проницаемость для иммуноглобулинов (Carlile A.E., Beck F., 1983). Способность усваивать иммуноглобулины обеспечивает поросятам защиту от болезней в раннем неонатальном периоде.

Толстая кишка свиньи значительно изменяется в течение первых нескольких дней после рождения. При рождении в толстой кишке обнаруживаются ворсинчатые выросты эпителия, обычно локализованные в проксимальной области. Эти ворсинчатые структуры обладают способностью поглощать питательные вещества, подобно ворсинкам тонкого кишечника. Выстилка ворсинчатых структур — бокаловидные, абсорбирующие и вакуолизированные клетки. Бокаловидные и абсорбирующие клетки обладают микроворсинками и, следовательно, щеточной каймой микроворсинок. Со временем микроворсинки на поглощающих клетках уменьшаются в длине. Благодаря наличию этих абсорбирующих и вакуолизиро-

ванных клеток толстая кишка новорожденного обладает способностью поглощать липиды и активно транспортировать аминокислоты, включая метионин, который в свою очередь индуцирует всасывание натрия. В течение первых 1–3 дней после рождения ворсинчатые структуры, вакуолизированные клетки и связанная с ними способность к абсорбции питательных веществ теряются, а также толстая кишка достигают взрослых характеристик. Через 6 дней после рождения эпителий толстой кишки свиней имеет плоскую поверхность, содержит крипты и бокаловидные клетки, но лишен ворсинок (Smith M.W., 1988; Wooding F.B. и соавт., 1978).

В дистальном отделе толстой кишки свиней постнатальная бактериальная колонизация разделена на три фазы: фаза 1 начинается сразу после рождения и продолжается до конца 1-й недели постнатального периода; фаза 2 происходит в конце 1-й недели и продолжается до окончания вскармливания (21-й день); фаза 3 — с момента отъема (21-й день) и длится более 120 дней. В течение фазы 1 аэробы и факультативные анаэробы постепенно вытесняются облигатными анаэробами. Во время фазы 2 появляются другие анаэробы, в том числе бифидо-, эу-, фузо-, пропионибактерии и анаэробные стрептококки. Во время фазы 3 грамположительные анаэробы вытесняются грамотрицательными бактериями, такими как Bacteroides, которые становятся доминирующим видом микробов (Swords W.E. и соавт., 1993).

У свиней толстая кишка быстро увеличивается в течение первых 10 дней после рождения. За первые 24 ч после рождения масса толстого кишечника увеличивается на 43%. В течение следующих 9 дней после рождения масса толстой кишки аналогична массе в 1-й день, а к 10-му дню постнатального периода масса толстого кишечника была в 33,5 раза больше, чем при рождении (Walthall K., Cappon G.D., 2005).

При рождении желудочно-кишечный тракт у собак полностью сформирован, но постнатальное функциональное развитие должно происходить по мере взросления собаки. У собак породы бигль наиболее быстрый период развития наблюдается от рождения до возраста 63 дня (Paulsen D.B. и соавт., 2003).

У новорожденных собак кишечник играет важную роль в переносе иммуноглобулинов материнского организма из молозива в течение первых 1–2 дней после рождения (Widdowson E.M., 1985). У собак материнские иммуноглобулины всасываются через тонкий кишечник. Сообщалось, что через 24 ч после рождения энтероциты на ворсинках тощей и подвздошной кишки уже вакуолизированы, что указывает на происходящую абсорбцию макромолекул. После 21-го дня постнатального периода в тонком кишечнике собаки не было вакуолизированных энтероцитов (Paulsen D.B. и соавт., 2003).

Показано, что все отделы ЖКТ собак породы бигль колонизированы бактериями уже к 1-му дню после рождения. В проксимальном отделе толстой кишки количество аэробных и анаэробных бактерий на 1-й день после рождения было таким же, как и на 21-й. После 21-го дня количество бактерий в толстой кишке значительно уменьшается (аэробных снижается больше, чем анаэробных). В дистальном отделе толстой кишки нет существенной разницы в количестве бактерий (анаэробных/аэробных) в 1, 21, 42 или 63-й дни постнатального периода (Buddington R.K., 2003).

Слизистый барьер кишечника у новорожденных кроликов не полностью развит при рождении. Материнские иммуноглобулины могут поступать от матери с молоком в течение 12 дней после рождения (Peri B.A., Rothberg R.M., 1986).

При рождении тонкий кишечник кроликов является структурно и функционально незрелым. При рождении у кроликов отсутствуют не только железы двенадцатиперстной кишки (бруннеровы железы), но и мышечная оболочка. Дуоденальные железы появляются в течение первых 2 дней после рождения, а мышечная оболочка — на 5-й день (Toofanian F., Targowski S.P., 1982). У кроликов, находящихся на молочном вскармливании, мышечный слой двенадцатиперстной и подвздошной кишки, по-видимому, становится тоньше в период от 2 до 8 нед. Толщина мышечного слоя тощей кишки увеличивается со 2-й по 8-ю неделю постнатального периода, но дальнейшего увеличения на 16-й неделе не наблюдается. По разным данным, кишечник кролика созревает морфологически к 20-му дню постнатального развития или к 8-й неделе после рождения (Walthall K., Cappon G.D., 2005).

У кроликов слизистая оболочка толстого кишечника созревает между 2-й и 8-й неделей постнатального периода. На 2-й неделе после рождения слизистая оболочка слепой и толстой кишки незрелая, но к 8-й неделе приобретает ту же морфологию, что у взрослого организма. Аналогичным образом глубина слизистой оболочки значительно увеличивается в течение 2–8 нед постнатального периода, но после 8-й недели после рождения дальнейшего увеличения глубины слизистой оболочки не наблюдается. Подобные ворсинкам структуры выявляются в слепой и ободочной кишке на 2-й неделе постнатального периода, но к 4-й неделе в слизистой оболочке эти структуры начинают исчезать. Их исчезновение, по-видимому, совпадает с отъемом от крольчихи и происходит примерно в возрасте 4 нед (Yu B., Chiou W.S., 1997).

У кроликов, находящихся на молочном вскармливании, масса толстого кишечника увеличивается почти в 4 раза в течение первых 7 дней после рождения. Резкое увеличение массы толстой кишки связано с быстрым увеличением бактериальной колонизации (Hall RA, Widdowson E.M., 1979).

При рождении у крыс тонкий кишечник является структурно-функционально незрелым. Постнатальное созревание включает замену незрелого эпителия зрелым, при этом созревание слизистой оболочки кишечника у крыс происходит в течение первых 3 нед после рождения и сопровождается изменением популяции клеток, покрывающих ворсинки (Carlile A.E., Beck F., 1983).

У грызунов некоторые антитела передаются внутриутробно плоду, и после рождения кишечник избирательно поглощает иммуноглобулины в течение 18–24 дней, у крыс всасывание специфично для альфа-глобулинов. При рождении клетки, выстилающие ворсинки слизистой оболочки двенадцатиперстной и тощей кишки, обладают способностью избирательно поглощать (с помощью комплексов IgG-рецептор) материнские иммуноглобулины целиком для передачи в кровоток, тогда как клетки ворсинок подвздошной кишки неселективно путем пиноцитоза поглощают макромолекулы из просвета тонкого кишечника и переносят в кровоток главным образом для питания (Carlile A.E., Beck F., 1983; Henning S.J., 1981).

В тонком кишечнике морской свинки клетки, выстилающие ворсинки двенадцатиперстной и тощей кишки, перестают передавать материнские иммуноглобулины плоду посредством селективного эндоцитоза еще до рождения (Carlile A.E., Beck F., 1983). Однако энтероциты, выстилающие ворсинки подвздошной кишки морской свинки, обладают способностью переносить макромолекулы из просвета тонкого кишечника в большой круг кровообращения путем неселективного эндоцитоза

в течение первых 48 ч после рождения. У морской свинки через 24–48 ч после рождения популяция клеток ворсинок подвздошной кишки, способных к эндоцитозу, заменяется клетками, не способными к эндоцитозу (Walthall K., Cappon G.D., 2005).

Толстая кишка крысы при рождении функционально незрела; однако к моменту отъема (22–26-й день после рождения) устанавливается морфологический тип взрослой особи. В течение последних 2 дней перед родами и в раннем неонатальном периоде увеличивается просвет толстой кишки, происходит удлинение кишечных крипт и увеличение количества клеток слизистой оболочки. После отъема количество кишечных крипт резко увеличивается. Показано, что количество крипт в толстой кишке увеличивается с 4652 при рождении до более чем 420 000 во взрослом возрасте, при этом число популяций клеток крипт увеличивается с 240 до более чем 635. От рождения до возраста 40 нед происходит существенное увеличение длины толстой кишки (Bristol J.B., Williamson R.C., 1984; Colony P. C. и соавт., 1989).

У крыс лактаза присутствует в проксимальных и дистальных отделах толстой кишки непосредственно перед рождением. Сразу после рождения активность лактазы быстро снижается в проксимальных и дистальных отделах толстой кишки. Снижение активности лактазы происходит постепенно в проксимальном отделе толстой кишки, так что активность лактазы значительно выше, чем в толстой кишке взрослого, вплоть до 12-го дня постнатального периода. В дистальном отделе толстой кишки активность лактазы быстро снижается и, следовательно, значительно выше, чем у взрослого, через день после рождения. Сразу после рождения в проксимальном отделе толстой кишки крысы наблюдается резкое увеличение активности щелочной фосфатазы, максимальная активность которой обычно наблюдается в течение первых 10 дней после рождения. Эти максимальные уровни совпадают с периодом, в течение которого ворсинки и специализированные абсорбирующие клетки присутствуют в проксимальном отделе толстой кишки. По мере утраты ворсинок к концу 2-й недели постнатального периода уровни щелочной фосфатазы снижаются. Таким образом, уровни взрослых достигаются к 15-му дню постнатального развития. При рождении повышенные уровни фермента Na-K-АТФазы наблюдаются в проксимальном отделе толстой кишки крысы и снижаются до уровня взрослых к 15-му дню постнатального периода (Colony P. C. и соавт., 1989). Показано, что в сочетании с увеличением реабсорбции воды в раннем постнатальном периоде всасывание натрия в толстой кишке увеличивается у новорожденных крыс, кроликов и людей. Кроме того, у крыс в период молочного вскармливания реабсорбция воды в тонком кишечнике существенно ниже (в 4 раза), чем в толстой кишке (Pacha J., 2000). По мере постнатального развития реабсорбция воды в толстой кишке крыс снижается.

Основные этапы развития желудка, кишечника и поджелудочной железы человека и лабораторных животных представлены в табл. 15.

Таким образом, постнатальное развитие желудка человека включает утолщение железистой области желудка и созревание главных клеток. По мере увеличения числа главных клеток объем секреции пепсина и соляной кислоты постепенно увеличивается в течение первых месяцев после рождения. Бактериальная колонизация происходит при этом функциональном созревании. В желудке морской свинки, свиньи и кролика постнатальное развитие происходит сходным с человеком образом, однако существуют видовые вариации в отношении времени и последовательно-

Основные этапы развития желудка, кишечника

Параметр	Человек	Собака
Желудок	Постнатальное развитие включает утолщение железистой области желудка и созревание главных клеток. По мере увеличения числа главных клеток объем секреции пепсина и соляной кислоты постепенно увеличивается в течение первых месяцев после рождения. Наиболее интенсивный рост желудка, особенно его дна и пилорического отдела, происходит в течение 1-го года жизни. Окончательно формирование заканчивается в 7–12 лет. Желудочные железы к рождению морфологически и функционально развиты недостаточно. Новорожденные имеют высокий pH желудка	Секреция соляной кислоты начинается через 1–2 дня после рождения. В желудке секреция пепсина происходит примерно через 21 день после рождения. Уровни желудочной липазы увеличивались с 1-го по 21-й день постнатального периода и снижались с 21-го по 42-й день

Таблица 15

и поджелудочной железы человека и лабораторных животных

Кролик	Грызуны	Другие виды
В желудке при рождении выделяется соляная кислота. Начало секреции гастрина происходит внутриутробно. Секреция пепсина начинается или значительно увеличивается примерно на 3-й неделе. В течение первых нескольких дней после рождения масса желудка существенно увеличивается. К 3-му дню после рождения масса желудка увеличивается в 2,5 раза по сравнению с таковой при рождении	При рождении желудок крысы не секретирует пепсин и соляную кислоту. Отсутствие пепсина в желудке крысы в раннем неонатальном периоде приводит к тому, что белки не расщепляются в желудке и могут попасть в тонкий кишечник в виде целой молекулы. У крыс заметное увеличение количества соляной кислоты, секретируемой слизистой оболочкой желудка, обычно происходит на 3-й неделе постнатального периода, а секреция кислоты увеличивается еще больше на 4-й и 5-й неделе постнатального периода. К 6-й неделе постнатального периода (40-дневный возраст) секреция соляной кислоты снижается до уровня взрослых крыс. Уровни гастрина в желудке крыс низкие до 18-го дня после рождения, после чего происходит резкое повышение	При рождении желудок свиньи секретирует соляную кислоту. Секреция кислоты в желудке 2-дневной свиньи вдвое меньше, чем у 3-недельной. У свиней в постнатальном периоде масса желудка существенно увеличивается в период молочного вскармливания. ЖКТ у макак в значительной степени функционален при рождении, но постоянно адаптируется к изменению рациона в течение 1-го года жизни и до достижения половой зрелости к 3-летнему возрасту. Критическое развитие завершается до рождения, а активное — в течение 1–3 мес после рождения. После рождения секреция соляной кислоты, перистальтика и другие адаптивные пищеварительные и транспортные функции устанавливаются при отъеме в возрасте около 6 мес. Функциональность пищеварительной системы и всасывающая способность развиваются по мере изменения характера рациона питания в подростковом периоде

Параметр	Человек	Собака
Бактериальная флора	До рождения ЖКТ стерилен. Во время и после рождения бактерии начинают заселять ЖКТ. Примерно через 25 ч после рождения в толстой кишке новорожденных присутствуют бифидо- и лактобактерии. К концу 1-й недели постнатального периода обнаруживаются анаэробные кокки. Клостридии обнаруживаются в толстой кишке в течение первых нескольких дней после рождения, и их количество снижается быстро к концу 1–2-й недели после рождения	Все отделы желудочно-кишечного тракта собак породы бигль колонизированы бактериями уже к 1-му дню после рождения
Кишечник тонкий	Тонкий кишечник постоянно растет как в длину, так и в диаметре от рождения до взрослого возраста. В раннем постнатальном периоде макромолекулярные антигены могут проходить через слизистую оболочку кишечника	При рождении ЖКТ полностью сформирован, но постнатальное функциональное развитие должно происходить по мере взросления. У собак породы бигль наиболее быстрый период развития наблюдается от рождения до возраста 63 дня. У собак материнские иммуноглобулины всасываются через тонкий кишечник

Продолжение таблицы 15

Кролик	Грызуны	Другие виды
В отношении бактериальной колонизации желудок остается стерильным в период молочного вскармливания. У находящихся на молочном вскармливании, масса толстого кишечника увеличивалась почти в 4 раза в течение первых 7 дней после рождения. Резкое возрастание массы толстой кишки связано с быстрым увеличением бактериальной колонизации	У грызунов с началом молочного вскармливания микробное содержимое желудка представлено преимущественно лактобактериями, колонизирующими слизистую оболочку	У яванских макак колонизация микробиомом завершается при отъеме в возрасте около 6 мес
Слизистый барьер кишечника у новорожденных кроликов не полностью развит при рождении. Материнские иммуноглобулины могут передаваться с молоком матери в течение 12 дней после рождения. При рождении тонкий кишечник является структурно и функционально незрелым. При рождении отсутствуют железы двенадцатиперстной кишки (бруннеровы железы), как и мышечная оболочка. Дуоденальные железы появляются в течение первых 2 дней после рождения, а мышечная оболочка — на 5-й день. По разным данным, кишечник созревает морфологически к 20-му дню постнатального развития или к 8-й неделе после рождения	У крыс при рождении тонкий кишечник является структурно и функционально незрелым. Постнатальное созревание слизистой оболочки кишечника у крыс происходит в течение первых 3 нед после рождения. У грызунов некоторые антитела передаются внутриутробно плоду, и после рождения кишечник избирательно поглощает иммуноглобулины в течение 18–24 дней. У крыс всасывание специфично для альфа-глобулинов. В тонком кишечнике морской свинки клетки, выстилающие ворсинки двенадцатиперстной и тощей кишки, перестают передавать материнские иммуноглобулины плоду посредством селективного эндоцитоза еще до рождения	Тонкий кишечник свиньи изменяется постнатально как по структуре, так и по функции, к 3-й неделе постнатального периода достигается большинство характеристик взрослой особи. У свиней при рождении тонкий кишечник проницаем для IgG молозива. У свиней материнские иммуноглобулины не передаются внутриутробно, поэтому важно, чтобы кишечник сохранял проницаемость для иммуноглобулинов

Параметр	Человек	Собака
Толстый кишечник	В толстом кишечнике человека кишечные крипты развиваются на поздних сроках внутриутробного развития. К моменту рождения пролиферативная активность в криптах обычно организована во многом аналогично кишечным криптам толстой кишки взрослого человека. При рождении всасывание натрия и анионный обмен развиты недостаточно, но быстро развиваются в течение 1-го года жизни	При рождении ЖКТ полностью сформирован, но постнатальное функциональное развитие должно происходить по мере взросления
Поджелудочная железа	При рождении морфология поджелудочной железы аналогична морфологии зрелого органа, но функционально зрелой поджелудочная железа становится только к 2-летнему возрасту	За исключением активности трипсина, активность ферментов поджелудочной железы при рождении низкая. Активность трипсина повышается во время кормления и снижается в течение 1–63 дней после рождения. На 63-й день активность трипсина в поджелудочной железе была ниже, чем у взрослых животных. Активность химотрипсина увеличивается с 1-го по 21-й день постнатального периода. Активность амилазы отсутствует в 1-й день после рождения, к 21-му дню очень низкая, а увеличивается с 21-го по 63-й день. Активность липазы в поджелудочной железе отсутствует в течение 1–42 дней постнатального периода

Окончание таблицы 15

Кролик	Грызуны	Другие виды
Толстый кишечник незрелый при рождении, но слизистая оболочка заметно созревает, достигая зрелости к 8-й неделе после рождения. Слизистая оболочка толстого кишечника созревает между 2-й и 8-й неделей постнатального периода. На 2-й неделе после рождения слизистая оболочка слепой и толстой кишки незрелая, но к 8-й неделе приобретает морфологию взрослого организма	Толстая кишка крысы при рождении функционально незрелая, однако к моменту отъема (22–26-й день после рождения) устанавливается морфологический тип взрослой особи. В течение последних 2 дней перед рождением и в раннем неонатальном периоде увеличивается просвет толстой кишки, происходит удлинение кишечных крипт и увеличение количества клеток слизистой оболочки. После отъема количество кишечных крипт резко увеличивается. У крыс лактаза присутствует в проксимальных и дистальных отделах толстой кишки непосредственно перед рождением. Сразу после рождения активность лактазы быстро снижается в проксимальных и дистальных отделах толстой кишки	Толстая кишка свиньи значительно изменяется в течение первых нескольких дней после рождения. У свиней толстая кишка быстро увеличивается в течение первых 10 дней после рождения. В течение первых 24 ч после рождения масса толстого кишечника увеличивается на 43%, в следующие 9 дней масса толстой кишки аналогична таковой в 1-й день, а к 10-му дню постнатального периода масса толстого кишечника была уже в 33,5 раза больше, чем при рождении
Поджелудочная железа при рождении морфологически, но не функционально зрелая. Функциональная зрелость поджелудочной железы наступает в период отъема	При рождении поджелудочная железа крысы является по существу морфологически зрелой, уровни ферментов поджелудочной железы у крыс в тонком кишечнике значительно повышаются после прекращения молочного вскармливания, а поджелудочная железа становится функционально зрелой сразу после отъема. В течение первых 3 дней после рождения в поджелудочной железе крыс снижается активность ферментов, таких как амилаза, трипсин, химотрипсин и липаза	Постнатальное созревание экзокринной части поджелудочной железы у свиней больше зависит от отъема, чем от возраста. Экзокринная секреция поджелудочной железы у поросят, находящихся на молочном вскармливании, обычно низкая. Секреция протеолитических ферментов в поджелудочной железе свиней увеличивается с 4–36-го дня постнатального периода. В целом, постнатально у свиней повышается панкреатическая активность трипсина, химотрипсина и амилазы (1–4-я неделя после рождения)

сти появления специализированных железистых клеток. Например, при рождении секреция соляной кислоты не происходит в желудке человека, крысы или собаки, однако желудок кролика и свиньи при рождении выделяет соляную кислоту.

Степень созревания кишечника при рождении варьирует у разных видов. В целом считается, что зрелость кишечника при рождении зависит от продолжительности периода внутриутробного развития. Такие виды, как мышь и крыса, имеют короткий период беременности и поэтому при рождении очень незрелые. Другие виды — морская свинка и свинья имеют более длительный период беременности и, следовательно, у них лучше развит кишечник при рождении. У животных с относительно длительным периодом беременности процесс развития кишечника более похож на таковой у человека, чем у животных с коротким сроком беременности. У человека крипты и ворсинки тонкого кишечника становятся организованными и функциональными задолго до рождения, и первичными постнатальными изменениями являются рост и функциональные изменения слизистой оболочки кишечника, бактериальная колонизация, двигательная и перистальтическая активность кишечника. Тонкий кишечник у крысы является структурно и функционально незрелым при рождении, а постнатальное созревание включает изменение популяции клеток, покрывающих ворсинки, и замену незрелого эпителия зрелым. Как и у крысы, тонкий кишечник кроликов так же незрелый при рождении, но морфологически и функционально организуется примерно в течение 2 мес.

Толстый кишечник крысы при рождении морфологически и функционально незрелый, однако в постнатальном периоде просвет толстой кишки увеличивается, происходит удлинение кишечных крипт и количество клеток слизистой оболочки увеличивается настолько, что к моменту отъема устанавливается морфологический облик зрелой взрослой особи. Толстый кишечник кролика также незрелый при рождении, но слизистая оболочка заметно созревает, достигая зрелости к 8-й неделе после рождения. У свиньи толстый кишечник значительно изменяется в течение первых нескольких дней после рождения, приобретая внешний вид взрослой особи к 6-му дню после рождения (Walthall K. и соавт., 2005).

Поджелудочная железа

Поджелудочная железа играет важную роль в пищеварении. Экзокринная поджелудочная железа секретирует ферменты, которые помогают переваривать липиды, белки и углеводы, а эндокринная поджелудочная железа выделяет вещества, которые помогают нейтрализовать содержимое желудка, когда оно попадает в тонкий кишечник.

Поджелудочная железа большинства млекопитающих животных морфологически, но не функционально, зрела при рождении (Buddington RK., 2003).

При рождении морфология поджелудочной железы человека аналогична таковой в зрелом органе, но функционально зрелой поджелудочная железа становится только к 2-летнему возрасту. В целом, функциональная зрелость поджелудочной железы у животных обычно наступает во время или через некоторое время после прекращения молочного вскармливания. Так, при рождении поджелудочная железа крысы является по существу морфологически зрелой, а функциональное развитие поджелудочной железы крыс происходит во время отъема. Постнатальное созре-

вание экзокринной части поджелудочной железы у свиней больше зависит от прекращения молочного вскармливания, чем от возраста (Walthall K. и соавт., 2005).

Экзокринная секреция поджелудочной железы у поросят, находящихся на молочном вскармливании, обычно низкая. Секреция протеолитических ферментов в поджелудочной железе свиней увеличивается с 4–36-го дня постнатального периода. Хотя уровни трипсина, химотрипсина и амилазы, присутствующие в поджелудочной железе свиней при рождении, ниже, чем у взрослых животных, этих ферментов достаточно, чтобы гидролизовать белки (Harada E. и соавт., 1988; Walthall K. и соавт., 2005).

В целом, постнатально у свиней повышается панкреатическая активность трипсина, химотрипсина и амилазы (1–4-я неделя после рождения) (Harada E. и соавт., 1988).

У собак, за исключением активности трипсина, активность ферментов поджелудочной железы при рождении низкая. Показано, что активность трипсина повышалась во время кормления и снижалась в течение 1–63 дней после рождения. На 63-и сутки активность трипсина в поджелудочной железе была ниже, чем у взрослых животных. Активность химотрипсина увеличивалась с 1-го по 21-й день постнатального периода, оставаясь постоянной с 21-го по 63-й день и продолжая расти между 63-м днем и взрослением. Активность амилазы у собак отсутствовала в 1-й день после рождения, обнаруживалась к 21-му дню, но была очень низкой, затем активность немного увеличилась с 21-го по 63-й день, после чего резкое повышение (в 410 раз) наблюдалось с 63-го дня и во взрослом возрасте. Активность липазы в поджелудочной железе животных отсутствовала в течение 1–42 дней постнатального периода. Однако при количественном определении у животных в возрасте 63 дней активность липазы была аналогична таковой у взрослых собак (Buddington R.K., 2003; Walthall K. и соавт., 2005).

У крыс в течение первых 2 нед после рождения в тонком кишечнике обнаруживается лишь очень небольшое количество ферментов поджелудочной железы. Уровни ферментов поджелудочной железы у крыс в тонком кишечнике значительно повышаются после прекращения молочного вскармливания, а поджелудочная железа становится функционально зрелой сразу после отъема. В течение первых 3 дней после рождения в поджелудочной железе крыс снижается активность ферментов поджелудочной железы, таких как амилаза, трипсин, химотрипсин и липаза (Henning S.J., 1981; Walthall K. и соавт., 2005).

Таким образом, при рождении морфология поджелудочной железы человека аналогична таковой зрелого органа, но функционально зрелой поджелудочная железа становится только к 2-летнему возрасту. Как и у людей, поджелудочная железа большинства млекопитающих при рождении морфологически, но не функционально зрелая. В целом функциональная зрелость поджелудочной железы у животных наступает в период отъема (Walthall K. и соавт., 2005).

Иммунная система

Иммунная система имеет длительный период созревания у всех видов лабораторных животных и человека. Иммунная система у людей, обезьян и собак при рождении гораздо более зрелая, чем у грызунов. Развивающаяся иммунная система особенно чувствительна к действию токсикантов. Токсическое воздействие на ор-

ганы развивающейся иммунной системы может вызывать поражения, которые проявляются только в более позднем возрасте как нарушение иммунной функции (Barrow P.C., Schmitt G., 2017).

У всех млекопитающих, включая человека, иммунная система созревает в результате последовательной серии скоординированных физиологических процессов, которые начинаются на ранних этапах внутриутробного развития и продолжаются в раннем постнатальном периоде.

Иммунная система развивается из популяции плюрипотентных гемопоэтических стволовых клеток, которые образуются на ранних сроках беременности из мезенхимальных стволовых клеток. Эта популяция гемопоэтических стволовых клеток дает начало всем циркулирующим клеткам крови и иммунной системы. Формирование популяций лимфоидно-кроветворных клеток-предшественников предполагает миграцию этих клеток из внутриэмбриональной мезенхимы в печень и селезенку плода и, в конечном итоге, перемещение этих клеток на поздних сроках внутриутробного развития в костный мозг и тимус. В тимусе и костном мозге начинается лимфопоэз, эти органы, по-видимому, уникальны тем, что создают факторы микроокружения, необходимые для развития функциональных иммунокомпетентных клеток. Развитие иммунной системы не прекращается при рождении, и иммунокомпетентные клетки продолжают вырабатываться из клеток-предшественников в костном мозге и тимусе. Зрелые иммунокомпетентные клетки покидают эти первичные иммунные органы и мигрируют через кровь к вторичным иммунным органам (селезенка, лимфатические узлы, лимфоидные ткани слизистой оболочки) (Holsapple M.P. и соавт., 2003).

У различных видов лабораторных животных рождение происходит на разных стадиях зрелости плода. Таким образом, прямое сравнение функционального развития иммунной системы человека и животных осложняется различиями в зрелости клеток на момент рождения. В целом, животные с коротким периодом беременности (например, мыши, крысы, кролики и хомяки) имеют относительно незрелую иммунную систему на момент рождения по сравнению с людьми.

Гемопоэз

У человека количество гранулоцитов и других клеток врожденного иммунитета в периферической крови заметно увеличивается после рождения. Т-клетки у людей присутствуют в меньшем количестве и достигают взрослого уровня только к 6 годам (Kuper C.F. и соавт., 2016).

Гемопоэз у НЧП считается морфологически и функционально развитым при рождении. Однако по мере взросления иммунной системы продолжают происходить изменения, включая сдвиги в соотношении Т-клеток CD4/CD8 и изменения количества некоторых субпопуляций лимфоцитов (Nam K.H. и соавт., 1998; Terao K. и соавт., 1988).

По результатам исследования, в котором сравнили несколько фенотипических маркеров в лимфоцитах периферической крови взрослых и новорожденных как у человека, так и у приматов (мартышек), не выявлено существенных различий в субпопуляционном составе лимфоцитов между новорожденными и взрослыми ни у людей, ни у приматов (Neubert R. и соавт., 1996).

Вскоре после рождения у собак в селезенке и лимфатических узлах появляются зародышевые центры и плазматические клетки, тимус начинает быстро развиваться (Somberg R.L. и соавт., 1994; Yang T.J., Gawlack S.L., 1989). Фенотип субпопуляций лимфоцитов у новорожденных существенно отличается от наблюдаемого у взрослых собак (Somberg R.L. и соавт., 1994).

У собак при рождении большинство циркулирующих В- и Т-клеток являются наивными. В постнатальном периоде количество лимфоцитов увеличивается в течение первых нескольких недель жизни, а соотношение CD4+/CD8+ Т-клеток снижается с возрастом по мере увеличения количества CD8+ Т-клеток. Число нейтрофилов снижается в первые 2 нед жизни (Skaggs H. и соавт., 2019). В течение первых 16 нед происходит постепенное снижение доли периферических В-клеток и увеличение доли периферических Т-клеток до нормального уровня у взрослых. После этого соотношение В- и Т-клеток остается практически постоянным на протяжении всей жизни собаки (Holsapple M.P. и соавт., 2003).

У карликовых свиней после рождения количество Т- и В-клеток в кровообращении увеличивается, некоторые типы достигают пика к 60-му дню. Костный мозг в мелких периферических костях (пальцы стопы) перестает участвовать в гемопоэзе примерно к 90-му дню после рождения, тогда как костный мозг в грудине продолжает оставаться местом кроветворения и лишь минимально замещается жировой тканью начиная с 60-го дня и далее. В селезенке кроветворение наблюдается при рождении, медленно снижается и отсутствует на 60-й день и далее (Kuper C.F. и соавт., 2016).

Незрелые клетки крови при рождении у кролика присутствуют в печени, а костный мозг становится основным источником эритроцитов в течение 1-й недели после рождения, продукция эритроцитов достигает уровня взрослых к 3-й неделе. Лимфоциты в малом количестве обнаруживаются в печени к 10-му дню постнатального периода. В костном мозге про-В-клетки (ранние предшественники В-клеток) составляют большинство В-клеток при рождении и начинают сокращаться примерно к 21-му дню. Плазматические клетки (зрелые В-клетки, секретирующие антитела) можно обнаружить в костном мозге на 14-й день. В крови количество В-клеток увеличивается с менее 25% в первые 2 нед жизни до примерно 44% к 18-й неделе, а количество Т-клеток снижается с 60% в течение первых 3 нед после рождения до 40% к 18-й неделе (Fujiwara S. и соавт., 1974; Hayward A.R. и соавт., 1978; Jasper P. J. и соавт., 2003; Knight K.L., Crane M.A., 1994; McElroy P.J. и соавт., 1981; Sabin F.R. и соавт., 1936).

У крыс иммунная система при рождении очень незрелая и формируется в раннем постнатальном периоде. После рождения количество общих лейкоцитов в периферической крови увеличивается. В печени и селезенке (красная пульпа) кроветворение завершается, хотя очаги эритропоэза и миелопоэза можно обнаружить и в селезенке взрослых крыс. Костный мозг бедренной кости морфологически созревает на 7-е сутки (Kuper C.F. и соавт., 2016). У 10-дневных крысят показано отсутствие субпопуляций лимфоцитов. При гистологическом анализе селезенки 10-дневных крысят выявлено отсутствие зародышевых центров у интактных крысят и у крысят, иммунизированных Т-зависимым антигеном — эритроцитами барана (Ladics G.S. и соавт., 2000). Несколько исследований показали, что крысы в возрасте примерно 21 дня способны к иммунному ответу, но он менее выражен, чем у взрослого животного (Kuper C.F. и соавт., 2016).

У мышей после рождения происходит немедленное исчезновение кроветворных клеток из печени, и при рождении печень уже не является местом кроветворения, а красная пульпа селезенки в плане кроветворения теряет свое значение в период до 14-го дня. После этого очаги эритропоэза и миелопоэза могут персистировать или индуцироваться в красной пульпе селезенки на протяжении всей жизни. Лейкоциты продуцируются в костном мозге и, за исключением Т-лимфоцитов, завершают свое созревание в этой ткани (Golub R., Cumano A., 2013; Marshall-Clarke S. и соавт., 2000).

Тимус

У человека при рождении тимус полностью сформирован морфологически, его размер по отношению к размеру тела находится на пике, продукция тимоцитов максимальна в раннем постнатальном периоде. За этим может последовать временное снижение до позднего младенчества с последующим непрерывным ростом до инволюции (включая замещение паренхимы тимуса жировой тканью) в подростковом возрасте (Rezzani R. и соавт., 2014). Изменения, характерные для инволюции тимуса, начинаются в течение или вскоре после 1-го года рождения и прогрессивно продолжаются на протяжении всей жизни. Ежегодное сокращение клеток микроокружения тимуса человека на 3–5% в год продолжается до среднего возраста, когда оно замедляется до менее 1% в год. Согласно экстраполяции этих результатов, полная потеря ретикулоэпителиальной ткани тимуса и связанных с ней тимоцитов должна произойти только в возрасте 120 лет у человека. Поскольку тимус является основным Т-лимфопоэтическим органом в онтогенезе организма млекопитающих, его возрастную инволюцию с уже отмеченными морфологическими изменениями можно объяснить лишь снижением антигенспецифических иммунных функций Т-лимфоцитов. Инволюция тимуса и снижение пролиферации Т-лимфоцитов могут быть частично восстановлены с помощью трансплантации ткани тимуса или применения гормонов тимуса (Bodey B. и соавт., 1997) до подросткового возраста (10–18 лет) (Rezzani R. и соавт., 2014).

У НЧП, подобно тому, что происходит у других млекопитающих, тимус начинает процесс инволюции и атрофии по мере достижения зрелости. Сравнение размера тимуса и популяций клеток 4–6-летних макак (возраст половой зрелости, близкий к взрослому) с 21-летними животными показало, что у последних был уменьшен размер тимуса и отсутствовали популяции NK-клеток (Buse E. и соавт., 2006).

Постнатальный рост тимуса у собак происходит быстро, достигая максимального размера в процентах от массы тела примерно в возрасте 1–2 мес и 6–23 мес по абсолютной массе. Т-клетки становятся иммунокомпетентными около 1,5–3-месячного возраста щенка. Инволюция тимуса происходит через 9–12 мес после рождения (Day M.J., 2007).

У карликовых свиней при рождении тимус морфологически почти созревший, хотя периваскулярные пространства обнаруживаются только на 7-й день, а участки без эпителия — на 12–14-й день. Наибольшая относительная масса органа у самок приходится на 1–4-й день, а у самцов — на 28-й день. В целом считается, что тимус у карликовых свиней имеет зрелую морфологию и размер на 28-й день (Kuper C.F. и соавт., 2016).

У новорожденного кролика тимус представляет собой хорошо развитый лимфоидный орган с дифференцированными корковыми и медуллярными участками, а к 10-му дню обнаруживаются тельца Гассаля (Archer O. и соавт., 1964).

Тимус у крыс хорошо развит при рождении, кортико-медуллярная зона васкуляризируется на 7-й день. В основном на основании морфологии тимус считается полностью созревшим на 14-й день. Как и у человека, и у карликовой свиньи во взрослом возрасте паренхима тимуса медленно заполняется жировой тканью (Parker G.A. и соавт., 2015). У крыс инволюция тимуса продолжается до возраста 4 нед (Bodey B. и соавт., 1997).

У мышей тимус продолжает развиваться после рождения, например, аналогичная взрослой реакция на митоген конканавалин А обнаруживается в возрасте от 2 до 3 нед. Инволюция тимуса аналогична наблюдаемой у крыс (Kuper C.F. и соавт., 2016; Sano S. и соавт., 2001).

Селезенка

При рождении у человека селезенка развита структурно, имеет отчетливую красную и белую пульпу, включая различные отделы белой пульпы, и у новорожденного имеет фенотип взрослой особи. После рождения селезенка изменяется скорее в размерах, чем в морфологии. Гематопоэтические очаги в красной пульпе исчезают после рождения (Kuper C.F. и соавт., 2016; Steiniger B. и соавт., 2007). У НЧП анатомически селезенка считается зрелой при рождении и продолжает приобретать морфологические характеристики, соответствующие увеличению функциональной активности, например, герминативные центры наблюдаются в возрасте 3–6 мес (Batchelder C.A. и соавт., 2014; Buse E., 2005).

У собак герминативные центры и плазматические клетки в селезенке отсутствуют до рождения и появляются в раннем постнатальном периоде. Белая пульпа состоит из лимфоидных фолликулов, а красная пульпа — из венозных синусов, ретикулярных клеток и макрофагов. Периартериальные зоны белой пульпы содержат преимущественно CD5-CD8-Т-клетки и меньшее количество CD5+CD8+Т-клеток, а красная пульпа состоит из сети ретикулярных клеток, макрофагов и венозных синусов (Felsburg P.J., 2002).

Селезенка у карликовой свиньи при рождении еще незрелая, но периартериальные зоны белой пульпы уже присутствуют. Фолликулы наблюдаются на 12-й день и далее, а зародышевые центры — на 28-й день. У поросят маргинальная зона развита не очень хорошо. Сообщается, что маргинальная зона достаточно отчетливо определялась только у части карликовых свиней в возрасте 182 дней (Kuper C.F. и соавт., 2016).

У кролика селезенка при рождении развита слабо, содержит преимущественно ретикулярные клетки, миелоидные клетки и очаги развивающихся эритроцитов. При рождении фолликулов нет, они появляются между 10–14-м днем постнатально. На 10-й день происходит агрегация лимфоцитов вокруг мелких ветвей артерий. Зародышевые центры также отсутствуют при рождении, плазматические клетки впервые определяются в селезенке на 9-й день (Archer O. и соавт., 1964; Jeklova E. и соавт., 2007).

Периартериальные зоны белой пульпы у крыс при рождении еще недоразвиты, с небольшим количеством Т- и В-лимфоцитов. На 5-й день видна примитивная

маргинальная зона с маргинальными металлофильными макрофагами. Маргинальная зона продолжает развиваться приблизительно до 10-го дня. Первые фолликулы наблюдались у 14-дневных крысят, а развитие зародышевых центров отмечено примерно на 28–35-й день. Морфология селезенки считается сформированной на 28–42-й день (Kuper C.F. и соавт., 2016).

У мышей при рождении белая пульпа селезенки еще плохо организована, сравнима с селезенкой крысы. На 3–7-й день начинают развиваться периартериальные зоны белой пульпы и маргинальная зона, а на 7-й день определяется маргинальный синус (Golub R., Cumano A., 2013). На 7–14-й день первичные фолликулы содержат фолликулярные дендритные клетки и В-лимфоциты.

Селезенка у крыс и мышей при рождении развита слабо и приобретает взрослую морфологию лишь на переходном этапе от ювенильного к подростковому периоду.

Лимфатические узлы

У человека лимфатические узлы при рождении, по-видимому, уже хорошо развиты. После рождения быстро развиваются зародышевые центры особенно в лимфатических узлах, дренирующих слизистую оболочку (Kuper C.F. и соавт., 2016).

У НЧП лимфатические узлы в значительной степени морфологически сформированы еще до рождения (Skaggs H. и соавт., 2019).

Информации о развитии лимфатических узлов у собак мало. На 45–52-й день внутриутробного развития начинается лимфоцитарная инфильтрация, герминативные центры и плазматические клетки появляются вскоре после рождения (Skaggs H. и соавт., 2019).

У карликовых свиней постнатально микроскопически исследовались только брыжеечные лимфатические узлы. При рождении и до 4-го дня эти лимфатические узлы были небольшими, с относительно крупным паракортикальным слоем и несколькими слаборазвитыми первичными фолликулами. Крупные зародышевые центры наблюдались в мезентериальных лимфатических узлах на 7-й день. Желтовато-коричневый пигмент присутствовал в мозговом веществе у карликовых свиней в возрасте 7–14 дней. Природа и значение пигмента не ясны. Постнатальное развитие лимфатических узлов у карликовых свиней лишь незначительно отстает от такового у человека (Kuper C.F. и соавт., 2016).

При рождении лимфатические узлы у кролика состоят преимущественно из капсульной соединительной ткани и мезенхимальных ретикулярных клеток, фолликулы или герминативные центры отсутствуют. Т-клетки и другие лимфоциты обнаруживаются в корковом веществе. К 4-му дню в корковом веществе можно увидеть несколько небольших фолликулярных скоплений лимфоидных клеток. На 10-й день корковая зона дифференцирована, мозговое вещество состоит из развивающихся лимфоидных фолликулов, в корковом веществе больше лимфобластов. Через 2 нед появляются фолликулы, а герминативные центры начинают развиваться в возрасте от 2 до 3 нед (Archer O. и соавт., 1964; Hostetler J.R., Ackerman G.A., 1969; Jeklova E. и соавт., 2007).

У крыс при рождении лимфатические узлы, дренирующие слизистую оболочку, уже имеют отчетливую кортикальную зону, а на 7-й день можно различить паракортекс, в том числе наличие венул с высоким эндотелием в мезентериальных лим-

фатических узлах. Венулы с высоким эндотелием определяются в нижнечелюстных/шейных лимфатических узлах на более поздней стадии, а именно на 14-й день. Развитие зародышевых фолликулов и центров также происходит раньше в брыжеечных лимфатических узлах по сравнению с нижнечелюстными лимфатическими узлами соответственно на 14-й и 28-й день. Плазматические клетки особенно заметны в нижнечелюстных лимфатических узлах начиная с 28-го дня. В подколенных лимфатических узлах первичные фолликулы появляются на 19-й день, а затем, на 23-й день — зародышевые центры, но только после стимуляции. Это соответствует тому, что подколенные лимфатические узлы в целом являются покоящимися лимфатическими узлами (Kuper C.F. и соавт., 2016). У крыс и особенно мышей лимфатические узлы при рождении довольно незрелые. У крыс зрелая морфология мезентериальных лимфатических узлов (которые дренируют бóльшую часть ЖКТ) наблюдается на переходном этапе от младенческого к ювенильному периоду. Развитие лимфатических узлов зависит от их расположения. В целом те, которые дренируют слизистую оболочку, развиваются быстрее, чем дренирующие другие участки; узлы, дренирующие слизистую оболочку дыхательных путей, развиваются существенно позже, чем узлы, дренирующие слизистую оболочку ЖКТ (Kuper C.F. и соавт., 2016).

У мышей при рождении Т-клетки колонизируют лимфатические узлы, и первичные фолликулы начинают образовываться в 1-ю неделю после рождения. Герминативные центры наблюдаются в мезентериальных и нижнечелюстных/шейных лимфатических узлах на 4-й неделе (Hoshi H. и соавт., 2001).

Ассоциированная со слизистой оболочкой кишечника лимфоидная ткань (MALT)

У человека первые иммунные клетки в слизистой оболочке ЖКТ обнаруживаются уже в конце I триместра внутриутробного развития. Вскоре после рождения в пейеровых бляшках развиваются зародышевые центры, и в 1-ю неделю секреторный компонент быстро увеличивается до уровня взрослых. Пик количества пейеровых бляшек в кишечнике приходится на подростковый возраст (Kuper C.F. и соавт., 2016).

У НЧП, подобно другим тканям/органам иммунной системы, формирование MALT в значительной степени анатомически завершено при рождении (Skaggs H. и соавт., 2019).

Пейеровы бляшки у собак появляются в слепой кишке через 1 нед после рождения. Пейеровы бляшки в подвздошной кишке быстро развиваются после рождения, достигая функциональной зрелости примерно к 20-й неделе и максимального размера около 6-месячного возраста. Интересно, что пейеровы бляшки подвздошной кишки у собак, как и у жвачных животных и свиней, действуют как первичный лимфоидный орган, подобно костному мозгу (Skaggs H. и соавт., 2019).

У карликовых свиней лимфоидная ткань, ассоциированная с назальной слизистой оболочкой (NALT) содержит несколько первичных фолликулов при рождении и быстро увеличивается в размерах. Зародышевые центры определяются уже на 3-й день. В последующие недели NALT увеличивается в размерах до 90-го дня, после чего плотность клеток снижается. Слизистые и подслизистые лимфоидные скопления присутствуют в желудке с рождения. Пейеровы бляшки иногда наблюдаются в тощей кишке, а большие бляшки всегда присутствуют в подвздошной кишке.

Таблица 16

Развитие лимфоидных органов на момент рождения и прекращения молочного вскармливания у человека и различных видов лабораторных животных

Лимфоидный орган	Человек	НЧП	Собака	Карликовая свинья	Кролик	Крыса	Мышь
При рождении							
Тимус	+++	+++	++	++	++	++	++
Селезенка	++	++	+	+	+	–	–
Лимфатические узлы	+++	+++	+/–	++	+	+/–	+/–
Пейеровы бляшки	++	++	+/–	+/–	+/–	+/–	+/– *
На момент прекращения молочного вскармливания							
Тимус	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Селезенка	+++	+++	+++	+++	++	+	+
Лимфатические узлы	+++	+++	?	+++	++	+++	++
Пейеровы бляшки	?	?	+	+	++	++	++

Примечание. «?» — неизвестно; «+++» — морфологически хорошо развито; «–» — плохо развито; «++» — морфологически развито средне; «+» — морфологически развито плохо; «+/–» — морфологически слабо развито или не развито; — нет данных о мыши, но предполагается развитие как у крысы.*

На 7-й день пейеровы бляшки с зародышевыми центрами четко выражены. Пейеровы бляшки увеличиваются в размерах до 90–182-го дня (Kuper C.F. и соавт., 2016).

Развитие лимфоидной системы MALT у кролика обычно начинается с рождения и определяется микрофлорой кишечника. Что касается аппендикса, то при рождении не происходит лимфоидного развития, нет организованных B- и T-клеточных фолликулярных областей, и отсутствуют CD4+ или CD8+T-клетки. В основном формирование лимфоидной ткани происходит в течение первых 12 нед. В течение 1-й недели после рождения количество интраэпителиальных лимфоцитов кишечника низкое. По мере того, как у новорожденного развиваются иммунологические реакции, все большее количество лимфоцитов мигрирует в эпителий кишечника. На 4-й день определяются отдельные узелки и изолированные скопления лимфоцитов. Пейеровы бляшки видны на 7-й день. К 10-му дню в подвздошной кишке определяются фолликулы. Фолликулы, расположенные ближе всего к эпителию, являются наименее зрелыми, а наиболее удаленные — более зрелыми. Зрелые плазматические клетки наблюдаются через 4–6 нед, преимущественно у основания ворсинок (Archer O.K. и соавт., 1963; Archer O.K. и соавт., 1964a; Orlic D. и соавт., 1981).

На 1-й день лимфоидные клетки накапливаются в миндалинах, но герминативных центров еще нет. Примитивные герминативные центры в миндалинах появляются через четыре недели, а зрелые — к 8-й неделе (Kawabata I. и соавт., 1996).

У крыс при рождении присутствуют пейеровы бляшки, которые на 28-й день приобретают морфологию взрослого типа. NALT наблюдается на 7-й день и формируется полностью к 35-му дню (Sosa G.A., Roux M.E., 2004).

У мышей пейеровы бляшки и NALT присутствуют при рождении. Развитие MALT у мышей сравнимо с таковым MALT у крыс, за исключением того, что о развитии MALT мыши больше информации (Kuper C.F. и соавт., 2016).

Межвидовое сравнение развития органов иммунной системы суммировано в табл. 16.

Функциональное развитие иммунной системы

У людей после раннего неонатального периода продолжается приобретение иммунной компетентности как результат воздействия антигенов на протяжении первых 2 лет жизни.

У НЧП считается, что иммунная система в значительной степени анатомически и функционально развита при рождении (Martin P. L., Weinbauer G.F., 2010). Также обнаружены некоторые доказательства функционирования иммунной системы внутриутробно. К середине/концу II триместра (75–100-й день внутриутробного развития) клетки, секретирующие иммуноглобулины (Ig) и цитокины, присутствуют в тимусе и MALT; в селезенке эта функция определяется между 80–145-м днем внутриутробного развития по наличию клеток, секретирующих изотипы антител/IgA/M/G, а также цитокины IL-6 и интерферон-гамма (Makori N. и соавт., 2003).

По мере того как иммунная система новорожденных НЧП подвергается воздействию антигенов, отмечается сдвиг в сторону более зрелых маркеров иммунитета. Эти изменения включают снижение количества клеточных маркеров наивных клеток и соответствующее увеличение маркеров клеток активации и/или клеток памяти, увеличение количества циркулирующих изотипов IgG, IgM и IgA, снижение соотношения CD4+/CD8+ (соотношение 1,5–2,5 обычно считается нормальным для взрослого животного) и увеличение количества NK-клеток и активированных B-клеток (Skaggs H. и соавт., 2019). Уровни IgG, IgM и IgA постепенно повышаются после рождения и достигают примерно 60–70% уровня взрослых к концу 1-го года жизни (Terao K. и соавт., 1988).

Критические этапы развития иммунной системы яванских макак происходят еще до рождения, функция существенно развивается в младенческом периоде в ответ на антигены окружающей среды. Все основные типы иммунных клеток (T-, B- и NK-клетки) присутствуют в тимусе и периферических лимфоидных органах на 100-й день внутриутробного развития у плода яванских макак. Иммунная система продолжает свое активное развитие в течение первых 3–5 лет после рождения, при этом быстро развиваются вторичные иммунные ткани, функция памяти, происходят фенотипические и функциональные изменения в иммунокомпетентных клетках и в уровне циркулирующих иммуноглобулинов, таких как IgG, IgM и IgA (Skaggs H. и соавт., 2019).

Тимус становится видимым на 35-й день внутриутробного развития. Первые лимфоцитоподобные клетки появляются на 50-й день. Кортикомедуллярная дифференци-

ровка, предшественники телец Гассаля и CD3-положительные Т-лимфоциты определяются на 70-й день. Все клеточные популяции, присутствующие в тимусе взрослого животного, развиваются к 100-му дню внутриутробного развития в тимусе плода, за исключением некоторых предшественников В- и Т-клеток (CD34- и CD117-положительные клетки) и дендритных клеток (CD35-положительные клетки) (Li X. и соавт., 2023).

Возрастное снижение массы тимуса и соотношения коры и мозгового вещества становится очевидным после 3-летнего возраста. Выраженная инволюция тимуса происходит в возрасте от 7 до 15 лет у яванских макак, сопровождается резким увеличением количества периферических CD4+CD8+ дважды положительных Т-клеток и снижением количества CD28+ Т-клеток в возрасте 7 лет. Инволюция тимуса может осложняться стрессорами окружающей среды. Таким образом, масса и морфология тимуса не являются надежными показателями иммуномодуляции или иммунотоксичности в отсутствие другой соответствующей информации (Lee W.W. и соавт., 2003).

Селезенка, лимфатические узлы и другие периферические лимфоидные ткани у яванских макак считаются зрелыми при рождении и продолжают развиваться морфологически и функционально после рождения. Зародышевые центры развиваются в возрасте 3–6 мес в ответ на внешние антигены. Зачаток селезенки проявляется на 40-й день внутриутробного развития. Структуры селезенки и разграничение красной и белой пульпы появляются на 125-й день внутриутробного развития. Масса селезенки достигает пика и стабилизируется в возрасте 3–15 лет у самцов и самок. Возрастных и половых различий в количестве первичных и вторичных фолликулов, В-клеточных фолликулов, периартериальной лимфоидной оболочки, а также в плотности В- и Т-клеток нет (Li X. и соавт., 2023).

Возрастные изменения наблюдаются в соотношении основных субпопуляций лимфоцитов и фенотипах Т-клеток у яванских макак. Соотношение CD20+ В-клеток снижается в лимфоцитах периферической крови до 5-летнего возраста и в дальнейшем стабилизируется в возрасте от 1 мес до 31 года. Соотношение CD16+ NK-клеток постепенно увеличивается в течение первых 5 лет и достигает пика в возрасте 4–10 лет, тогда как соотношение CD3+ Т-клеток остается относительно постоянным на протяжении всей жизни. У CD4 — CD8+Т-клеток наблюдается значительное возрастное снижение экспрессии CD28 после 5 лет (Nam K.-H. и соавт., 1998).

У яванских макак уровни IgG и IgM можно измерить начиная с 92-го дня внутриутробного развития. Уровни IgG в сыворотке крови при рождении высокие, тогда как IgM и IgA низкие. Считается, что IgG до рождения имеет материнское происхождение из-за трансплацентарного переноса, а IgM — эмбриональное, поскольку он не переносится через плаценту. Новорожденные яванские макаки могут генерировать свои собственные IgG через 4 нед после рождения (Skaggs H. и соавт., 2019). Т-зависимый антительный ответ появляется через 3 мес после рождения. В целом, содержание сывороточного иммуноглобулина низкое в возрасте 2–3 лет и постепенно повышается в 4–5 лет. Уровни IgG, IgM и IgA в сыворотке постепенно повышаются и достигают плато в возрасте 4–5, 5–6 и 5 лет соответственно (Fujimoto K. и соавт., 1982).

У собак лишь после 40-го дня внутриутробного развития иммунная система способна реагировать на Т-зависимые антигены (Nold J.B. и соавт., 1988). Собаки считаются иммунологически незрелыми к моменту рождения, хотя у них показано наличие иммунологической чувствительности к KLH. Плацентарный перенос антител у собак

низкий, а способность поглощать материнские колостральные IgG-антитела снижается в течение нескольких часов после рождения (Chastant-Maillard S. и соавт., 2012).

Для щенков крайне важно поступление молозива вскоре после рождения, поскольку собаки при рождении имеют очень низкий уровень собственных антител. Способность всасывать иммуноглобулины из ЖКТ ограничена очень узким периодом (12–36 ч после рождения) из-за присутствия ингибиторов трипсина в молозиве и относительно нейтрального pH в пищеварительном тракте щенка, что ингибирует протеолитическое переваривание иммуноглобулинов в ЖКТ щенка. Иммунная система слизистой оболочки функциональна в конце 1-й недели постнатального периода с нормальным уровнем IgM через 2–3 мес, IgG через 6–9 мес и IgA через 1 год (Skaggs H. и соавт., 2019).

У кроликов антитела (иммуноглобулины) при рождении продуцируются в результате B-лимфопоэза в печени и костном мозге плода. Кролики в возрасте менее 3 нед имеют относительно небольшое разнообразие антител, но на 3–4-й неделе B-клетки начинают поступать в лимфоидную ткань, ассоциированную с кишечником (MALT), где они приобретают большее разнообразие. Между 4-й и 8-й неделей после рождения в MALT наблюдается разнообразие первичных антител. Что касается постнатальной иммунной функции кроликов, антигенные реакции, возникающие в период с 1–20-го дня после рождения, менее выражены, чем те, которые наблюдаются у взрослых. Клеточный иммунитет, измеряемый по отторжению аллотрансплантата и реакциям гиперчувствительности замедленного типа, является функциональным к 35-му дню (Cooper M.D. и соавт., 1968).

Полноценный иммунный ответ на антиген формируется у грызунов только после возраста 1 мес. В течение 1-го месяца постнатальной жизни у мышей иммунная система остается незрелой, не способной вырабатывать антитела к углеводным антигенам, и в ней преобладают IgM-опосредованные иммунные ответы на антиген (Landreth K.S., 2002).

Анализ данных показывает, что больше всего известно об иммунной системе мыши и человека. Учитывая незрелость иммунной системы мыши при рождении, существует резкое различие функциональных возможностей иммунной системы мышей и человека при рождении. Собака похожа на человека в том, что она рождается с функциональной иммунной системой. Предполагается, что внутриутробное развитие иммунной системы у собак происходит гораздо медленнее, чем у людей, и лишь немного быстрее, чем у грызунов (Holsapple M.P. и соавт., 2003).

Основные этапы развития иммунной системы человека и лабораторных животных представлены в табл. 17 и 18.

Скелет

Закономерности роста и развития скелета в целом сходны у человека и лабораторных животных. Период самого быстрого роста происходит до и вскоре после отъема. У человека второй всплеск роста наблюдается в начале периода полового созревания у девочек и в конце — у мальчиков. В исследованиях на ювенильных животных обычно оценивается такой показатель, как длина большеберцовой кости. Для более подробной оценки можно также прижизненно проводить рентгенологическое исследование и/или определить ми-

Критические этапы развития иммунной системы человека

Этап	Человек	НЧП	Собака
Начало гемопоэза	8–10 НВУ	14–21 ДВУ	3 НВУ
Гемопоэз	Количество гранулоцитов и других клеток врожденного иммунитета в периферической крови заметно увеличивается после рождения. Т-клетки присутствуют в меньшем количестве и достигают взрослого уровня у людей только к 6 годам	Считается морфологически и функционально развитым при рождении. Однако по мере взросления иммунной системы продолжают происходить изменения, включая сдвиги в соотношении Т-клеток CD4/CD8 и изменения количества некоторых субпопуляций лимфоцитов	Вскоре после рождения в селезенке и лимфатических узлах появляются зародышевые центры и плазматические клетки, тимус начинает быстро развиваться. Фенотип субпопуляций лимфоцитов у новорожденных существенно отличается от наблюдаемого у взрослых. В постнатальном периоде количество лимфоцитов увеличивается в течение первых нескольких недель жизни. Число нейтрофилов снижается в первые 2 нед жизни
Миграция стволовых клеток и экспансия клеток-предшественников	10–16 НВУ	21–25 ДВУ	5 НВУ
Колонизация костного мозга и тимуса	16 НВУ — рождение	35–36 ДВУ	НД

Таблица 17

и лабораторных животных и их временные рамки

Карликовая свинья	Кролик	Мышь, крыса
16 ДВУ*	11 ДВУ	7–9 ДВУ
После рождения количество Т- и В-клеток в кровообращении увеличивается, некоторые типы достигают пика к 60-му дню. Костный мозг в грудине продолжает оставаться местом кроветворения и лишь минимально замещается жировой тканью начиная с 60-го дня и далее. В селезенке кроветворение наблюдается при рождении, медленно снижается и отсутствует на 60-й день и далее	При рождении незрелые клетки крови присутствуют в печени, а костный мозг становится основным источником эритроцитов в течение 1-й недели после рождения, продукция эритроцитов достигает уровня взрослых к 3-й неделе. Лимфоциты в малом количестве обнаруживаются в печени к 10-му дню постнатального периода. В костном мозге про-В-клетки (ранние предшественники В-клеток) составляют большинство В-клеток при рождении и начинают сокращаться примерно к 21-му дню. Плазматические клетки (зрелые В-клетки, секретирующие антитела) можно обнаружить в костном мозге на 14-й день	У крыс иммунная система при рождении очень незрелая и формируется в раннем постнатальном периоде. После рождения количество общих лейкоцитов в периферической крови увеличивается. В печени и селезенке (красная пульпа) кроветворение завершается, хотя очаги эритропоэза и миелопоэза можно обнаружить и в селезенке взрослых крыс. Костный мозг бедренной кости морфологически созревает на 7-й день. У мышей после рождения происходит немедленное исчезновение кроветворных клеток из печени, и при рождении печень уже не является местом кроветворения, а красная пульпа селезенки в плане кроветворения теряет свое значение в период до 14-го дня. После этого очаги эритропоэза и миелопоэза могут персистировать или индуцироваться в красной пульпе селезенки на протяжении всей жизни. Лейкоциты продуцируются в костном мозге и, за исключением Т-лимфоцитов, завершают свое созревание в этой ткани
НД	23–25 ДВУ	9–16 ДВУ
НД	13 ДВУ — рождение	13 ДВУ — рождение

Этап	Человек	НЧП	Собака
Тимус	При рождении тимус полностью сформирован морфологически, его размер по отношению к размеру тела находится на пике, продукция тимоцитов максимальна в раннем постнатальном периоде. За этим может последовать временное снижение до позднего младенчества с последующим непрерывным ростом до инволюции (включая замещение паренхимы тимуса жировой тканью) в подростковом возрасте	Тимус начинает процесс инволюции и атрофии по мере достижения зрелости	Постнатальный рост тимуса происходит быстро, достигая максимального размера в процентах от массы тела в возрасте 1–2 мес и в возрасте 6–23 мес по абсолютной массе. Т-клетки становятся иммунокомпетентными в возрасте 1,5–3,0 мес. Инволюция тимуса происходит через 9–12 мес после рождения
Селезенка	При рождении селезенка развита структурно, имеет отчетливую красную и белую пульпу, включая различные отделы белой пульпы, и у новорожденного имеет фенотип взрослой особи. После рождения селезенка изменяется скорее в размерах, чем в морфологии. Гематопоэтические очаги в красной пульпе исчезают после рождения	Анатомически селезенка считается зрелой при рождении и продолжает приобретать морфологические характеристики, соответствующие увеличению функциональной активности, например, герминативные центры наблюдаются в возрасте 3–6 мес	Герминативные центры и плазматические клетки в селезенке отсутствуют до рождения и появляются в раннем постнатальном периоде. Белая пульпа состоит из лимфоидных фолликулов, а красная пульпа — из венозных синусов, ретикулярных клеток и макрофагов

Продолжение таблицы 17

Карликовая свинья	Кролик	Мышь, крыса
При рождении тимус морфологически почти созревший. Наибольшая относительная масса органа у самок приходится на 1–4-й день, а у самцов — на 28-й день. В целом считается, что тимус достигает зрелой морфологии и размера на 28-й день	У новорожденного кролика тимус представляет собой хорошо развитый лимфоидный орган с дифференцированными корковыми и медуллярными участками, а к 10-му дню обнаруживаются тельца Гассаля	У крыс тимус хорошо развит при рождении, кортико-медуллярная зона васкуляризируется на 7-й день. В основном на основании морфологии тимус считается полностью созревшим на 14-й день. Как и у человека, и у карликовой свиньи во взрослом возрасте паренхима тимуса медленно заполняется жировой тканью. У мышей тимус продолжает развиваться после рождения. Инволюция тимуса аналогична наблюдаемой у крыс
При рождении селезенка еще незрелая, но периартериальные зоны белой пульпы уже присутствует. Фолликулы наблюдаются на 12-й день и далее, а зародышевые центры — на 28-й день. У поросят маргинальная зона развита не очень хорошо	Селезенка при рождении развита слабо, содержит преимущественно ретикулярные клетки, миелоидные клетки и очаги, развивающиеся эритроциты. При рождении фолликулов нет, они появляются между 10–14-м днем постнатально. На 10-й день происходит агрегация лимфоцитов вокруг мелких ветвей артерий. Зародышевые центры также отсутствуют при рождении, плазматические клетки впервые определяются в селезенке на 9-й день	У крыс при рождении периартериальные зоны белой пульпы еще недоразвиты, с небольшим количеством Т- и В-лимфоцитов. На 5-й день видна примитивная маргинальная зона с маргинальными металлофильными макрофагами. Маргинальная зона продолжает развиваться приблизительно до 10-го дня. Первые фолликулы наблюдались у 14-дневных крысят, а развитие зародышевых центров отмечено примерно на 28–35-й день. Морфология селезенки считается сформированной на 28–42-й день. У мышей при рождении белая пульпа селезенки еще плохо организована, сравнима с селезенкой крысы. На 3–7-й день начинают развиваться периартериальные зоны белой пульпы и маргинальная зона, а на 7-й день определяется маргинальный синус. На 7–14-й день первичные фолликулы содержат фолликулярные дендритные клетки и В-лимфоциты. Селезенка у крыс и мышей при рождении развита слабо и приобретает взрослую морфологию лишь на переходном этапе от ювенильного к подростковому периоду

Этап	Человек	НЧП	Собака
Лимфатические узлы	Лимфатические узлы при рождении, по-видимому, уже хорошо развиты. После рождения быстро развиваются зародышевые центры особенно в лимфатических узлах, дренирующих слизистую оболочку	Лимфатические узлы в значительной степени морфологически сформированы еще до рождения	Информации о развитии лимфатических узлов у собак мало. На 45–52-й день внутриутробного развития начинается лимфоцитарная инфильтрация, герминативные центры и плазматические клетки появляются вскоре после рождения

Продолжение таблицы 17

Карликовая свинья	Кролик	Мышь, крыса
Постнатально микроскопически исследовались только брыжеечные лимфатические узлы. При рождении и до 4-го дня эти лимфатические узлы были небольшими, с относительно крупным паракортикальным слоем и несколькими слаборазвитыми первичными фолликулами. Крупные зародышевые центры наблюдались в мезентериальных лимфатических узлах на 7-й день. Постнатальное развитие лимфатических узлов у карликовых свиней лишь незначительно отстает от такового у человека	При рождении лимфатические узлы состоят преимущественно из капсульной соединительной ткани и мезенхимальных ретикулярных клеток, фолликулы или герминативные центры отсутствуют. Т-клетки и другие лимфоциты обнаруживаются в корковом веществе. К 4-му дню в корковом веществе можно увидеть несколько небольших фолликулярных скоплений лимфоидных клеток. На 10-й день корковая зона дифференцирована, мозговое вещество состоит из развивающихся лимфоидных фолликулов, в корковом веществе больше лимфобластов. Через 2 нед появляются фолликулы, а герминативные центры начинают развиваться в возрасте от 2 до 3 нед	У крыс при рождении лимфатические узлы, дренирующие слизистую оболочку, уже имеют отчетливую кортикальную зону, а на 7-й день можно различить паракортекс. Венулы с высоким эндотелием определяются в нижнечелюстных/шейных лимфатических узлах на более поздней стадии, а именно на 14-й день. Развитие зародышевых фолликулов и центров также происходит раньше в брыжеечных лимфатических узлах по сравнению с нижнечелюстными лимфатическими узлами соответственно на 14-й и 28-й день. Плазматические клетки особенно заметны в нижнечелюстных лимфатических узлах начиная с 28-го дня. У крыс и особенно мышей лимфатические узлы при рождении довольно незрелые. У крыс зрелая морфология мезентериальных лимфатических узлов (которые дренируют бóльшую часть ЖКТ) наблюдается на переходном этапе от младенческого к ювенильному периоду. У мышей при рождении Т-клетки колонизируют лимфатические узлы, и первые первичные фолликулы образуются в 1-ю неделю после рождения. Герминативные центры наблюдаются в мезентериальных и нижнечелюстных/шейных лимфатических узлах на 4-й неделе

Этап	Человек	НЧП	Собака
Ассоциированная со слизистой кишечника лимфоидная ткань (MALT)	Первые иммунные клетки в слизистой оболочке ЖКТ обнаруживаются уже в конце I триместра внутриутробного развития. Вскоре после рождения в пейеровых бляшках развиваются зародышевые центры, и в 1-ю неделю секреторный компонент быстро увеличивается до уровня взрослых. Пик количества пейеровых бляшек в кишечнике приходится на подростковый возраст	Подобно другим тканям/органам иммунной системы, формирование MALT в значительной степени анатомически завершено при рождении	Пейеровы бляшки появляются в слепой кишке через 1 нед после рождения. Пейеровы бляшки в подвздошной кишке быстро развиваются после рождения, достигая функциональной зрелости примерно к 20-й неделе и максимального размера примерно к 6-месячному возрасту. Пейеровы бляшки подвздошной кишки у собак, как и у жвачных животных и свиней, действуют как первичный лимфоидный орган, подобно костному мозгу
Периоды функционального созревания	Рождение — 1 год	0–3 мес постнатально	1,5–3,0 мес постнатально

Продолжение таблицы 17

Карликовая свинья	Кролик	Мышь, крыса
Лимфоидная ткань, асоциированная с назальной слизистой оболочкой (NALT), содержит несколько первичных фолликулов при рождении и быстро увеличивается в размерах. Зародышевые центры определяются уже на 3-й день. В последующие недели NALT увеличивается в размерах до 90-го дня, после чего плотность клеток снижается. Слизистые и подслизистые лимфоидные скопления присутствуют в желудке с рождения. Пейеровы бляшки иногда наблюдаются в тощей кишке, а большие бляшки всегда присутствуют в подвздошной кишке. На 7-й день пейеровы бляшки с зародышевыми центрами четко выражены. Пейеровы бляшки увеличиваются в размерах до 90–182-го дня	Развитие лимфоидной системы MALT обычно начинается с рождения и определяется микрофлорой кишечника. В основном формирование лимфоидной ткани происходит в течение первых 12 нед. В течение 1-й недели после рождения количество интраэпителиальных лимфоцитов кишечника низкое. На 4-й день определяются отдельные узелки и изолированные скопления лимфоцитов. Пейеровы бляшки видны на 7-й день. К 10-му дню в подвздошной кишке определяются фолликулы. На 1-й день лимфоидные клетки накапливаются в миндалинах, но герминативных центров еще нет. Примитивные герминативные центры в миндалинах появляются через 4 нед, а зрелые — к 8-й неделе	У крыс при рождении присутствуют пейеровы бляшки, которые на 28-й день приобретают морфологию взрослого типа. NALT наблюдается на 7-й день и формируется полностью к 35-му дню. У мышей пейеровы бляшки и NALT присутствуют при рождении. Развитие MALT у мышей сравнимо с таковым у крыс, за исключением того, что о развитии MALT мыши больше информации
НД	Рождение — 8 нед	Рождение — 30 дней

Этап	Человек	НЧП	Собака
События функционального созревания	Во время раннего неонатального периода продолжается приобретение иммунной компетентности как результат воздействия антигенов на протяжении первых 2 лет жизни	Иммунная система в значительной степени анатомически и функционально развита при рождении. Также обнаружены некоторые доказательства функционирования иммунной системы внутриутробно. К 75–100-му дню внутриутробного развития клетки, секретирующие иммуноглобулины и цитокины, присутствуют в тимусе и MALT; в селезенке эта функция определяется между 80–145-м днем внутриутробного развития	После 40-го дня внутриутробного развития иммунная система способна реагировать на Т-зависимые антигены. Собаки считаются иммунологически незрелыми к моменту рождения, хотя у них показано наличие иммунологической чувствительности к KLH. Плацентарный перенос антител у собак низкий, а способность поглощать материнские колостральные IgG-антитела снижается в течение нескольких часов после рождения. Собаки при рождении имеют очень низкий уровень собственных антител
Становление иммунной памяти	1–18 лет	1–3 года	12,5 мес

*Примечание. * Точное начало/окончание периода неизвестно. НВУ — неделя внутриутробного развития; моллюска-замочной скважины.*

Окончание таблицы 17

Карликовая свинья	Кролик	Мышь, крыса
НД	Антитела (иммуноглобулины) при рождении продуцируются в результате В-лимфопоэза в печени и костном мозге плода. Кролики в возрасте менее 3 нед имеют относительно небольшое разнообразие антител, но на 3–4 неделе В-клетки начинают поступать в лимфоидную ткань, ассоциированную с кишечником (MALT), где они приобретают большее разнообразие. Между 4-й и 8-й неделей после рождения в MALT наблюдается разнообразие первичных антител. Антигенные реакции, возникающие в период с 1–20-го дня после рождения, менее выражены, чем те, которые наблюдаются у взрослых. Клеточный иммунитет, измеряемый по отторжению аллотрансплантата и реакциям гиперчувствительности замедленного типа, становится функциональным к 35-му дню	Полноценный иммунный ответ на антиген у грызунов формируется только после возраста 1 мес. В течение 1-го месяца постнатальной жизни у мышей иммунная система остается незрелой, не способна вырабатывать антитела к углеводным антигенам, и в ней преобладают IgM-опосредованные иммунные ответы на антиген
До 5–6 мес*	20 нед*	30–60 дней

ДВУ — день внутриутробного развития; НД — нет данных; KLH — антительный ответ на гемоцианин

Таблица 18

Периоды развития иммунной системы у человека и различных видов лабораторных животных (Skaggs H. и соавт., 2019)

Вид	При рождении	Период молочного вскармливания	Прекращение молочного вскармливания (отъем)	Ювенильный период/ молодое животное
Грызуны	Небольшое количество Т- и В-клеток	Дифференцировка селезенки (красная и белая пульпа). Гиперчувствительность замедленного типа	Развиты герминативные центры в селезенке. Есть Т-зависимый антительный ответ	Взрослый уровень IgG к ПНД 42–49. Максимальный Т-зависимый антительный ответ
Собака	Антительный ответ на гемоцианин моллюска-замочной скважины (KLH). Пейеровы бляшки функционально зрелые. Фолликулы селезенки с герминативными центрами. Лимфатические узлы с плазматическими клетками и герминативными центрами	Установление иммунокомпетенции тимуса. Уровень IgM достигает взрослого. Взрослый уровень IgA		Взрослый уровень IgG
НЧП	Дифференцировка селезенки (красная и белая пульпа). Иммунная система развита и функционирует	Развитие герминативных центров в селезенке (3–6 мес). Есть Т-зависимый антительный ответ (13 нед)		Взрослый уровень IgG IgM IgA. Созревание иммунной системы до взрослого уровня к 5–7 годам

Окончание таблицы 18

Вид	При рождении	Период молочного вскармливания	Прекращение молочного вскармливания (отъем)	Ювенильный период/ молодое животное
Человек	Герминативные центры селезенки	Герминативные центры селезенки		Взрослый уровень IgG
Карликовые свиньи	Небольшое количество Т- и В-клеток	Дифференцировка селезенки (красная и белая пульпа). Гиперчувствительность замедленного типа	Развиты герминативные центры в селезенке	Взрослый уровень IgG
Кролик	Эпителиальные лимфоциты в кишечнике	В селезенке фолликулы без герминативных центров. Лимфатические узлы с фолликулами и герминативными центрами. Пейеровы бляшки в кишечнике	Созревание иммунной системы кишечника. Созревание миндалин	Антительный ответ на разнообразные антигены

Примечание. НЧП — нечеловекообразные приматы, ПНД — день постнатального развития.

неральную плотность костной ткани. Если это невозможно, кости можно взвесить и взять образцы тканей при вскрытии (Barrow P. C., Schmitt G., 2017).

Процесс, при котором костная ткань заменяет соединительную ткань-предшественницу, называется оссификацией. Оссификация может быть внутримембранозной или эндохондральной. Внутримембранозная оссификация включает замену мембранозной фиброзной ткани костью, тогда как эндохондральная оссификация включает замену хряща костью (Scheuer L., Black S., 2000; Zoetis T. и соавт., 2003).

Как правило, окостенение начинается с очагов, которые впоследствии увеличиваются в размерах до тех пор, пока ранее существовавшая ткань не будет полностью заменена костью. Начальный участок окостенения называется первичной точкой окостенения, большинство которых развиваются в эмбриональном и раннем внутриутробном периодах; однако некоторые из них развиваются и постнатально. В некоторых костях (например, длинных) первичные точки окостенения не распространяются на всю область ткани-предшественника. Вторичные точки окостенения развиваются в регионах, где не формируются первичные точки. Вторичные точки окостенения обычно формируются постнатально (Scheuer L., Black S., 2000; Zoetis T. и соавт., 2003). Вскоре после появления вторичных точек окостенения в эпифизарной области длинных костей рост идет во всех направлениях, что приводит к развитию эпифизарной пластинки роста между эпифизом и диафизом.

Число, расположение и время появления вторичных точек окостенения варьируют у разных видов. Кроме того, между видами существуют различия в сроках окостенения.

Точки окостенения, развивающиеся у человека пренатально, включают центры в черепе, позвоночнике, ребрах, грудине, первичные точки в диафизах крупных трубчатых костей, их поясах и фалангах кистей и стоп. Кроме того, в течение последних нескольких недель внутриутробного развития образуются некоторые первичные точки в области лодыжки и вторичные вокруг колена.

У людей точки окостенения развиваются сразу после рождения, процесс заканчивается в период раннего взросления. К точкам окостенения, сливающимся в подростковом возрасте, относятся эпифизы крупных длинных костей конечностей, кистей и стоп, а также сфенозатылочный синхондроз черепа. После подросткового возраста сращение происходит в яремной пластинке роста черепа, а также во вторичных точках окостенения позвонков, лопатки, ключицы, крестца и таза (Scheuer L., Black S., 2000; Zoetis T. и соавт., 2003).

Плечевая кость. Первичные точки окостенения появляются в диафизе плечевой кости в период внутриутробного развития. При рождении 79% плечевой кости человека состоит из окостеневшего диафизарного стержня, а 21% — из неокостеневшего хрящевого материала, располагающегося преимущественно в проксимальных и дистальных эпифизах. Исследования показали, что точка вторичного окостенения в головке кости обычно появляется к 6-му месяцу после рождения, но иногда развивается на 36–40-й неделе внутриутробного развития. Сроки появления вторичной точки окостенения большого бугорка от 3-месячного возраста до 3 лет. В целом, у девочек точка вторичного окостенения появляется раньше, чем у мальчиков (Scheuer L., Black S., 2000; Zoetis T. и соавт., 2003).

В *бедренной кости* во внутриутробном периоде также появляются первичные точки окостенения диафиза. Эпифиз, расположенный на дистальном конце бедренной кости, является самым крупным и быстрорастущим эпифизом в организме. Этот дистальный эпифиз, развивающийся из одной точки окостенения, обычно появляется на 36–40-й неделе внутриутробного развития, но существуют некоторые различия во времени появ-

ления. В течение 6–12 мес постнатального периода начинает развиваться дистальная эпифизарная пластинка. В течение 1–3 лет постнатального периода ширина эпифиза быстро увеличивается по мере распространения оссификации по всей эпифизарной области. К возрасту 7 лет (девочки) и 9 лет (мальчики) ширина эпифиза равна ширине метафиза. Когда рост бедренной кости завершен, происходит сращение дистального эпифиза бедренной кости, которое происходит у женщин и мужчин в возрасте от 14 до 18 лет и от 16 до 19 лет соответственно (Scheuer L., Black S., 2000; Zoetis T. и соавт., 2003).

Вскоре после появления точек вторичного окостенения в эпифизах развивающихся длинных костей между эпифизом и диафизом образуется участок, содержащий хрящевую, костную и фиброзную ткань. Эта область называется эпифизарной пластинкой роста и отвечает за увеличение длины диафиза, которое происходит во время постнатального развития. Эпифизарные пластинки роста костей человека структурно и функционально аналогичны эпифизарным пластинкам роста, развивающимся в костях других млекопитающих. У человека рост скелета начинается с формирования хрящевой матрицы, которая впоследствии заменяется костью. Линейный рост особенно длинных костей начинается с пролиферации эпифизарных хрящевых клеток и прекращается с закрытием эпифизов в период полового созревания. В целом, увеличение скорости роста длинных костей происходит в возрасте от 9 до 14 лет (Zoetis T. и соавт., 2003).

Созревание скелетной системы происходит уже во взрослом возрасте, к 25 годам[8].

Успешный рост и развитие костей человека жизненно зависят от сосудистого кровоснабжения. Сосудистое снабжение типичной длинной кости у разных видов млекопитающих поразительно сходно. В целом, длинные кости, а также многие плоские и неровные кости васкуляризированы питательными артериями и венами, которые проходят через компактную кость и действуют как каналы для входа и выхода крови. В постнатальном развитии диафизы, метафизы и эпифизы длинных и коротких костей разделены хрящевой пластинкой роста. Хотя пластинка роста сохраняется, конечные ветви артерий не пересекают пластинку роста в эпифизе (Lewis O.J., 1956.). Вместо этого капиллярные концы этих ветвей заканчиваются чуть ниже пластинки роста. У взрослого человека пластинка роста срастается, что позволяет терминальным ветвям артерий беспрепятственно распространяться в эпифизарную область, где они соединяются с артериями, отходящими от надкостницы. Важно отметить, что функциональное значение сосудов, которые переходят в эпифиз во взрослом возрасте, неясно, поскольку они не могут снабжать достаточным количеством крови весь эпифиз в случае повреждения эпифизарных артерий (Zoetis T. и соавт., 2003).

С возрастом происходят изменения в структуре и прочности костей человеческого скелета. Некоторые из этих изменений затрагивают женщин больше, чем мужчин. Например, прочность кортикальной кости снижается с возрастом, причем некоторые данные свидетельствуют, что у женщин снижение прочности более выражено. Плотность и прочность трабекулярной кости резко снижаются в возрасте от 20 до 80 лет, что приводит к потере прочности кости в участках, богатых трабекулярной костью. Данные говорят о том, что снижение плотности трабекулярной кости после 50 лет наблюдается только у женщин (Willinghamm M.D. и соавт., 2010).

[8] Guidance for Industry S11 Nonclinical safety testing in support of development of pediatric pharmaceuticals. ICH. May 2021.

Нечеловекообразные приматы (НЧП)

У яванских макак кости более развиты при рождении, чем у человека. Критическое развитие костей у яванских макак завершается до рождения, а пластинки роста появляются через 5–6 мес после рождения. Активное развитие костей длится от рождения примерно до 3 лет, после чего следует медленный рост, пока пластинка роста не закроется. Объем кости, количество и толщина трабекул, костеобразование и метаболическая активность достигают наибольших значений в возрасте 3–4 лет. Рентгенологические изображения ряда костей плода появляются на 8-й неделе внутриутробного развития, бедренная кость и малоберцовая кость появляются на 9-й неделе. Кости быстро растут и удлиняются на сроке от 10 до 12 нед беременности. Вторичные точки окостенения появляются в большинстве длинных костей на 15–20-й неделе беременности (Li X. и соавт., 2023).

Рост костей в длину прекращается после закрытия пластинок роста в возрасте 6,5 года у самцов и 5,8 года у самок. Постнатально эпифизарные пластинки роста основных длинных костей чаще появляются в первые 5 мес у самцов и в 4–6 мес у самок. Зона роста дистальной части малоберцовой кости появляется в 12 и 13 мес у самцов и самок соответственно. Средний возраст закрытия пластинок роста в крупных трубчатых костях составляет 5,4 года (3,4–6,5) у самцов и 4,7 года (2,3–5,8) у самок. Последнее сращение эпифизов происходит в дистальной части локтевой кости у обоих полов, а также в дистальных эпифизах локтевой и лучевой костях у самок. В целом, закрытие эпифизарных пластинок роста во всех длинных костях завершается в возрасте 5,8 года у самок и 6,5 года у самцов соответственно (Fukuda S. и соавт., 1978; Fukuda S, Matsuoka O., 1980; Lees C.J., Ramsay H., 1999).

Минеральная плотность тел позвонков в поясничном отделе позвоночника у самок может достигать пика к 9 годам. Рост костей стабилизируется в возрасте 10–22 лет, затем замедляется (Li X. и соавт., 2023).

При изучении сроков появления и слияния вторичных точек окостенения у макак-резусов было отмечено, что у обезьян при рождении присутствовало больше точек окостенения, чем у человека. В целом, окостенение костей у новорожденных макак-резусов напоминает таковое у 5–6-летнего человека. Оссификация конечностей самцов и самок макак-резусов завершается в 5,25 и 6,5 года соответственно. У шимпанзе в среднем начало постнатального окостенения в точках длинных и коротких костей происходит примерно на 12–20 мес раньше, чем окостенение у человека (Michejda M., 1980).

Плечевая кость. При рождении у самцов макак-резусов в проксимальном эпифизе имеются две отдельных точки окостенения. В эпифизарной области дистального отдела плечевой кости при рождении имеется одна вторичная точка окостенения. Еще две точки развиваются в дистальном отделе плечевой кости в течение 1-го месяца постнатального периода. Через 9 мес после рождения отдельные точки проксимального и дистального эпифизов плечевой кости объединяются, образуя единые вторичные точки окостенения в соответствующих областях (van Wagenen G., Asling C.W., 1958).

Слияние проксимального эпифиза с диафизом у самцов и самок яванских макак происходит примерно в возрасте 6 и 4,75–5,5 года соответственно (Fukuda S. и соавт., 1978; Fukuda S, Matsuoka O., 1980).

Бедренная кость. У макак-резусов при рождении в головке бедренной кости имеется эпифизарная точка окостенения. Эпифизарные точки окостенения в дистальном отделе

бедренной кости также присутствуют при рождении. Кроме того, через 6 мес после рождения происходит вторичное окостенение, точки развиваются в малом вертеле бедренной кости (van Wagenen G., Asling C.W., 1958).

При исследовании бедренной кости самок яванских макак через 4 мес после рождения точки окостенения уже присутствовали в проксимальном и дистальном эпифизах. У самцов обезьян через 5 мес после рождения центры окостенения присутствовали в проксимальных и дистальных эпифизах. У самцов яванских макак слияние проксимальных и дистальных эпифизов соответствующего диафиза произошло в бедренной кости в возрасте 6 и 5,25 года соответственно. Слияние как проксимального, так и дистального эпифизов произошло у самок в возрасте 4,75 года (Fukuda S. и соавт., 1978).

Свинья

Возрастные изменения минеральной плотности костей карликовых свиней в целом схожи с таковыми у людей. В этом отношении это животное представляется полезным в качестве модели для изучения возрастных изменений костей человека. Однако у свиней более высокая костная масса и плотная трабекулярная кость, чем у человека, это указывает на то, что кость, вероятно, прочнее. Эти данные надо учитывать при планировании эксперимента. Созревание скелетной системы у свиней происходит к 20-му месяцу у самцов и к 25-му у самок (Inui A. и соавт., 2004).

Собака

Плечевая кость. Плечевая кость собаки развивается из 5 вторичных точек окостенения: одна находится в диафизе, окостеневшем на момент рождения, одна — в головке и бугорках проксимального эпифиза и три — в дистальном эпифизе (по одной на медиальном мыщелке, латеральном мыщелке и медиальном надмыщелке) (Hare W.C., 1959). Вторичная точка окостенения появляется в головке плечевой кости через 1–2 нед после рождения (Hare W.C., 1959; Hare W.C., 1959). Через 5 мес после рождения начинается частичное сращение эпифиза с диафизом. Закрытие эпифизарной пластинки происходит примерно в возрасте от 10 до 12 мес; однако у некоторых собак линия слияния все еще может быть заметна в 12 мес, но обычно полностью исчезает к 14 мес (Hare W.C., 1959; Fukuda S, Matsuoka O., 1980). В дистальном эпифизе плечевой кости центры окостенения в медиальных и латеральных мыщелках появляются на 2, 3 или 4-й неделе постнатального периода (Hare W.C., 1959).

Бедренная кость. Через 7–10 дней после рождения в диафизе бедренной кости проявляется оссификация. Ко 2-й и 3-й неделе постнатального периода в головке бедренной кости развиваются точки окостенения. В большом и малом вертеле вторичные точки окостенения развиваются только через 8–10 нед и 2, 3 или 4 мес после рождения соответственно (Hare W.C., 1961). Слияние эпифизарных пластинок головки бедренной кости, большого и малого вертела происходит через 6–10, 8–11 и 10–13 мес после рождения соответственно (Zoetis T. и соавт., 2003).

К 21-му дню после рождения в дистальной области бедренной кости в медиальном и латеральном надмыщелке развиваются эпифизарные пластинки роста (Anderson A.C., Floyd M., 1963).

У собак во время постнатального развития увеличение длины диафиза происходит за счет пролиферации и созревания хондроцитов в эпифизарной пластинке роста с последующей кальцификацией матрикса и образованием эндохондральной кости (Guthrie S. и соавт., 1992; Nap R.C., Hazewinkel H.A., 1994). В целом было показано, что быстрый рост костей конечностей прекращается примерно через 5 мес после рождения (Yonamine H. и соавт., 1980).

Созревание скелетной системы собак происходит в возрасте 10–11 мес (Geiger M. и соавт., 2016).

Хорек

На самках хорька изучали изменения костей с целью моделирования на этих животных постменопаузальных изменений костной ткани у женщин. Зрелость скелета у хорька достигается в возрасте от 4 до 7 мес, о чем свидетельствует закрытие пластинки роста и созревание трабекул от тонких до толстых стержней и пластинок. В исследованиях, целью которых было изучение возможности моделирования на этих животных постменопаузальных изменений костной ткани у женщин, показано, что введение паратиреоидного гормона приводило к заметному увеличению костной массы, сопровождаемому феноменом туннелирования, индуцированным гормоном, который есть у собак и людей, но не у крыс. При овариэктомии либо при изменении освещения (8 ч света, 16 ч темноты), приводящем к снижению уровня эстрогена, костная масса в проксимальном отделе большеберцовой кости была значительно снижена. Полученные данные подтверждают возможность использования хорьков в исследованиях возрастных изменений скелета (Mackey M.S. и соавт., 1995).

Кошка

Полное закрытие пластинок роста у домашних кошек происходит примерно в 18-месячном возрасте, тогда же происходит и созревание скелета (Miranda F.G. и соавт., 2020).

В работе F.G. Miranda и соавт. (2020) приводятся данные литературы и собственные наблюдения о возрасте появления тех или иных изменений скелета у домашней кошки. Так, появление точек окостенения проксимального эпифиза бедренной кости, по разным данным, регистрируется в 14 дней или в течение 13–17 дней, или 16 дней. Точки окостенения дистального эпифиза бедренной кости появляются, по разным данным, через 7–14 дней или 13–17 дней, или 13 дней (Miranda F.G. и соавт., 2020).

Факторы, влияющие на закрытие пластины роста, многообразны. У домашних кошек синхронность наблюдается между половой зрелостью и закрытием пластинки роста. Гормоны эстроген и тестостерон противодействуют гормону роста и останавливают пролиферацию хрящевых клеток, которые обеспечивают рост. Самки домашних кошек достигают половой зрелости примерно в 6–9-месячном возрасте, тогда как самцы созревают позже — в 9–10 мес.

Рентгенографические исследования проводились у 15 домашних кошек с недельными интервалами в течение 1-го месяца и каждые 2 нед со 2-го по 4-й месяц жизни. После этого осмотры осуществлялись ежемесячно до достижения 18-месячного возраста. Седалищно-лобковая пластинка роста закрывалась в возрасте 2 мес, после чего происходи-

ло слияние подвздошно-лобковой, подвздошно-ишиальной, проксимальной бедренной, большого вертела и проксимальной малоберцовой пластинок роста. Дистальная часть бедренной кости и проксимальная пластинка роста большеберцовой кости закрывались последними, причем сращение отмечалось в возрасте 18 мес. Среднее время закрытия подвздошно-лобковой, подвздошно-складочной и дистальной пластинок роста бедренной кости было меньше у самок. Самый высокий темп роста бедренных и тазовых костей наблюдался между рождением и до возраста 100 дней. Затем скорость роста замедлялась до 300-дневного возраста и оставалась относительно постоянной до 600-дневного возраста, после чего роста уже не наблюдалось (Miranda F.G. и соавт., 2020).

Кролик

Плечевая кость. Показано, что у самцов и самок японского белого кролика уже на 1-й день постнатального развития в проксимальных и дистальных эпифизах плечевой кости присутствовали вторичные точки окостенения. К 1-й неделе после рождения в длинных костях появились все точки вторичного окостенения, за исключением точек в проксимальном эпифизе малоберцовой кости, появившихся в 2-недельном возрасте. В возрасте 32 нед проксимальный и дистальный эпифизы плечевой кости срослись с диафизами (Fukuda S., Matsuoka O., 1981).

Бедренная кость. По одним данным (Heikel H.V., 1960), вторичные точки окостенения в головке бедренной кости появляются у кролика к 4-му или 5-му дню постнатального развития, по другим (Fukuda S., Matsuoka O., 1981), — уже присутствуют в головке и дистальных отделах бедренной кости, эпифизе бедренной кости через 1 день после рождения. Рост бедренной кости кролика происходит быстро, в течение 3 мес после рождения, после чего рост замедляется и полностью прекращается примерно к 6 мес. Это позволяет предположить, что слияние дистальных и проксимальных эпифизарных пластинок роста следует примерно через 6 мес после рождения. Однако есть данные (Fukuda S., Matsuoka O., 1981), что сращение головки бедренной кости и дистального эпифиза бедренной кости возникает примерно через 16 и 32 нед после рождения соответственно.

Строение и функции эпифизарной пластинки роста кролика сходны с таковыми у человека (Ring P. A., 1955; McCormick M. J. и соавт., 1972). У кроликов увеличение размера длинных костей также идет в результате клеточной активности эпифизарной пластинки роста.

У кроликов увеличение длины конечностей происходит быстро, в течение 0–8 нед после рождения. Когда животные достигают 8-недельного возраста, продольный рост конечностей замедляется до 32-й недели, после чего рост полностью прекращается. Устойчивое увеличение скорости роста бедренной кости наблюдалось от нескольких дней после рождения до 3 мес (Fukuda S., Matsuoka O., 1981). Через 3 мес происходит постепенное снижение темпов роста до 6 мес, когда рост прекращается. В более поздних исследованиях (Rudicel S. и соавт., 1985) сообщается, что длина бедренной кости кролика быстро увеличивается в возрасте от 2 до 4 нед. Темпы роста начинают выходить на плато в возрасте 8 нед, а к 10–14 нед рост практически прекращается.

Как и у всех млекопитающих, скорость роста длинных костей кролика снижается с возрастом. По сравнению с крысами и людьми у кроликов самая высокая скорость продольного роста в день. Скорость продольного роста у кроликов в возрасте от 20 до 60 дней выше, чем у крыс того же возраста и у человека 2–8 лет. Показано, что в возрасте 20 дней

скорость роста кроликов и крыс составляет 554 и 375 мм/день соответственно при измерении в проксимальном отделе большеберцовой кости. Скорость роста у человека (бедренная кость) в возрасте 2 лет составляет 55 мм/сут. В возрасте 60 дней скорость роста у кролика и крысы снижалась до 378 и 159 мм/сут соответственно. Скорость роста у человека в возрасте от 5 до 8 лет снижается до 38 мм/сут (Thorngren K.G., Hansson L.I., 1981).

В исследовании, проведенном на самцах и самках новозеландских кроликов, измерялась масса, длина тела, бедренной и большеберцовой костей. Был использован специально разработанный фиксатор, который позволял выполнять последовательные клинические измерения, а также рентгенограммы бедренной и большеберцовой костей без применения анестезии. Рост скелета завершался на 28-й неделе. Средняя длина тела через 2 нед составляла 40% от таковой через 34 нед, а к 16-й неделе — 91% от длины зрелой взрослой особи. Средняя длина бедра через 2 нед была 38%, а через 16 нед — 95% от длины взрослого животного. Средняя длина большеберцовой кости через 2 нед составила 38% от длины взрослого животного, а к 16 нед — 94% (Masoud I. и соавт., 1986).

Хомяк

У хомяков очаги окостенения появляются в плечевой кости в проксимальном эпифизе на 6-й день после рождения, в дистальном — на 7-й, в дистальном эпифизе бедренной кости — на 6-й день (Beatty D., 1949).

Крыса

Плечевая кость. Вторичные точки окостенения появляются в головке и большом бугорке плечевой кости на 8-й день после рождения. Однако в отношении времени сращения эпифизов в проксимальной области плечевой кости есть разные данные. Сообщалось (Fukuda S., Matsuoka O., 1979), что слияние центров вторичного окостенения в проксимальном эпифизе плечевой кости завершается к 52-й неделе после рождения; также есть данные (Dawson A.B., 1925), подтверждающие, что эпифиз головки плечевой кости не соединяется с ее диафизарным стержнем до 162–181-й недели после рождения. Вероятно, у возрастных мышей, крыс и кроликов может наблюдаться неполное сращение эпифизов. При таком неполном сращении эпифизарная пластинка остается видимой в течение некоторого времени после начала сращения (Fukuda S., Matsuoka O., 1979; Fukuda S, Matsuoka O., 1980).

В дистальном эпифизе плечевой кости крысы вторичные точки окостенения появляются в головке и блоке на 2-й неделе после рождения, в частности, на 8-й день постнатального периода. К 15-му дню постнатального развития в головке и блоке можно увидеть одну четко выраженную вторичную точку окостенения. К 4-й неделе отмечается сращение дистального эпифиза плечевой кости, к 42-му дню эпифизарная пластинка роста дистальной части плечевой кости больше не видна, это указывает на то, что произошло эпифизарное сращение (Fukuda S., Matsuoka O., 1979; Dawson A.B., 1925).

Бедренная кость. Вторичные точки окостенения появляются в большом вертеле и головке бедренной кости через 4 нед после рождения. По разным данным (Fukuda S., Matsuoka O., 1979; Dawson A.B., 1925), сращение большого вертела произошло на 78-й или 143–156-й неделе, а головки бедренной кости — на 104-й или на 143–156-й неделе.

На дистальном конце бедренной кости точки вторичного окостенения появляются через 2 нед после рождения. Слияние дистального эпифиза происходит между 15-й и 17-й неделей (Fukuda S., Matsuoka O., 1979).

Строение эпифизарной пластинки роста крысы сходно с человеческим. У крысы примерно к моменту отъема формируется эпифизарная пластинка роста (Kember N.F., 1972; Moss-Salentijn L., 1974). Быстрое увеличение длины каждой длинной кости передней и задней конечности наблюдалось вплоть до достижения крысами 8-недельного возраста. Рост длинных костей у самцов и самок крыс замедляется почти до полной остановки в возрасте от 15 до 17 нед (Fukuda S., Matsuoka O., 1979).

С помощью методов серийной двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии, рентгенографии, морфометрии, иммуногистохимии на крысах линии Спрег — Доули изучали изменения роста костей и накопления минералов от отъема до взрослого возраста. В течение периода роста сывороточные маркеры формирования кости остеобластами снижались с возрастом, в то время как активность резорбции кости остеокластами оставалась неизменной. Последовательный паттерн истончения и закрытия пластинок роста обычно считается очень чувствительным коррелятом зрелости скелета. У некоторых видов эпифиз может оставаться «открытым» некоторое время после достижения половой зрелости. Как ранее было продемонстрировано на крысах, в данном исследовании наблюдали гистологически «открытый» эпифиз у крыс в возрасте 1 года. Данные, полученные при помощи не только радиологического измерения длины большеберцовой кости, но и гистоморфометрического определения суточной скорости роста, указывают, что после 20-недельного возраста рост большеберцовой кости снижается. Далее наблюдается лишь незначительный рост. Гистоморфометрия пластинок роста большеберцовой кости показывает, что в этой ткани после 20-недельного возраста регистрируется лишь незначительная пролиферативная или элонгационная активность (Horton J.A. и соавт., 2008).

Мышь

По сравнению с крысой или человеком окостенение скелета мыши происходит за относительно короткий период времени (Patton J.T., Kaufman M.H., 1995).

Плечевая кость. В проксимальном эпифизе плечевой кости на 5-е сутки постнатального периода в большом бугорке развиваются вторичные точки окостенения, которые вскоре после этого объединяются и образуют единую широкую костную пластинку в эпифизе. На 7-й день постнатального периода в головке плечевой кости появляется точка окостенения. К 17-му дню постнатального развития точки головки и большого бугорка объединяются и образуют единую вторичную точку окостенения в проксимальном эпифизе. Слияние проксимального эпифиза с диафизом происходит примерно через 6–7 нед после рождения. В дистальном эпифизе в медиальных и латеральных мыщелках развиваются отдельные точки окостенения на 9-й и 19-й дни после рождения соответственно. Кроме того, на 5-й день после рождения впервые появляется вторичная точка окостенения в блоке и головке. Соединение дистального эпифиза плечевой кости с диафизом обычно происходит у мышей через 3 нед после рождения (Fukuda S., Matsuoka O., 1980; Zoetis T. и соавт., 2003).

Бедренная кость. В проксимальном отделе бедренной кости к 14-му дню после рождения развиваются точки окостенения в большом и малом вертелах. На 15-й день после

рождения в головке бедренной кости обнаруживается небольшая точка окостенения. В бедренной кости через 7 дней после рождения в медиальном мыщелке дистальной части появляется вторичная точка окостенения. На 9-й день после рождения в латеральном мыщелке развивается вторичная точка окостенения. К 13-му дню постнатального развития эти точки образуют единую широкую костную пластинку в дистальном эпифизе. К концу 1-го месяца постнатального развития проксимальный и дистальный эпифизы бедренной кости почти полностью окостеневают, однако они еще не срастаются с диафизом. Слияние проксимального эпифиза происходит примерно через 13–15 нед после рождения. Слияние дистального эпифиза происходит до 15-й недели постнатального периода, примерно между 12-й и 13-й неделей (Fukuda S., Matsuoka O., 1980).

Следует отметить, что между различными инбредными линиями мышей могут наблюдаться некоторые вариации в скорости роста костей. Так, в исследовании, сравнивающем развитие длинных костей мышей линий LG/J и SM/J, никаких существенных различий в длине костей или скорости удлинения не наблюдалось внутриутробно или в течение первой недели постнатального периода. В течение 2–5 нед постнатального периода кости мышей линии LG/J росли на 0,20–0,74 мм/нед быстрее, чем линии SM/J, но время пиковой скорости удлинения варьировалось в зависимости от элементов скелета. Наибольшая разница в скорости удлинения локтевой кости между линиями наблюдалась через 3 нед (на 0,74 мм/нед быстрее у линии LG/J). Плечевая и бедренная кости показали наибольшую разницу в скорости удлинения между линиями через 4 нед (на 0,51 и 0,64 мм/нед быстрее у линии LG/J, чем SM/J соответственно). Наибольшая разница в скорости удлинения большеберцовой кости наблюдалась через 5 нед (на 0,69 мм/нед быстрее у LG/J в возрасте 5 нед). Темпы роста длинных костей линий LG/J и SM/J значительно замедлялись, а различия в темпах роста между линиями стали намного меньше через 4 нед, когда длинные кости приближались к пропорциям взрослых, примерно через 6 нед (Sanger T.J. и соавт., 2011).

Данных по возрастным изменениям структуры и прочности костей мышей немного. Костная структура быстро развивается в возрасте от 0 до 2 мес, тогда как пиковые показатели минеральной плотности кости и размера кортикального слоя достигаются к 3–6 мес. Имеется мало сообщений, описывающих изменения скелета, происходящие во второй половине жизни мышей, особенно в отношении механических свойств. Объем трабекулярной кости достигает максимума примерно через 2 мес у мышей линии C57Bl/6, за которым следует снижение на протяжении всей жизни, более выраженное у самок, чем у самцов. У самок мышей трех инбредных линий (C57Bl/6, BALB/c, C3H/He) наблюдается ранний пик увеличения объема трабекулярной кости с признаками снижения после 6–8-месячного возраста. Размер надкостницы бедренной кости увеличивается на протяжении всей жизни у самцов мышей C57Bl/6, однако жесткость и устойчивость к переломам уменьшаются после 1 года. В исследовании изменений в структуре скелета, плотности костей на протяжении всей жизни у самок и самцов мышей BALB/c в отношении бедренной и лучевой костей было показано, что площадь кортикальной части быстро увеличивается во время роста (2–7 мес), а затем сохраняется или продолжает увеличиваться в период старения (7–20 мес). Изменения жесткости и прочности всей кости отражают показатели размера кости: быстрое увеличение в течение 2–7 мес, затем незначительные изменения или их отсутствие. Кортикальная минерализация увеличивается на протяжении всей жизни. Анализ структуры трабекулярной кости также выявил

Таблица 19

Развитие эпифизов некоторых костей у морских свинок

Эпифиз	Начало сращения, нед	Полное сращение, нед
Дистальный плечевой кости	9	14–15
Тазовой кости	9	16–17
Проксимальный бедренной кости	12	20–21
Дистальный большеберцовой кости	14–15	28–30
Дистальный бедренной кости	18–19	34–36
Дистальный малоберцовой кости	28–30	41–44
Проксимальный плечевой кости	16–17	37–40
Проксимальный большеберцовой кости	41–44	101–108
Проксимальный малоберцовой кости	85–95	116–124

возрастные изменения. В проксимальном отделе большеберцовой кости наблюдалось возрастное снижение объема трабекулярной кости с прогрессирующим уменьшением после 4-месячного возраста. Напротив, у каудального позвонка Ca7 объем трабекулярной кости увеличивался на протяжении всей жизни. В целом, кости самок в молодом возрасте были меньше, чем у самцов, но в более позднем возрасте не было существенных различий между полами. Важно отметить, что у мышей не наблюдалось более выраженных возрастных изменений у самок по сравнению с самцами, как это наблюдается у людей (Willinghamm M.D. и соавт., 2010).

Морская свинка

В исследовании на морских свинках изучали рост костей скелета методом компьютерной томографии. Определяли ряд размеров, а также среднюю и максимальную толщину костей лопатки, плечевой и бедренной костей у морских свинок в возрасте 0–1, 1–3, 3–6 мес, 6 мес — 1 года и 1–4 лет. Половая зрелость у морских свинок наступает примерно в 6–10 нед, а максимальной массы животные достигают в 8–12 мес, лопатка, плечевая и бедренная кости продолжают расти, и толщина некоторых костей меняется после 1 года (Witkowska A. и соавт., 2014).

Методом рентгенографии было изучено развитие эпифизов у морских свинок (табл. 19). Возраст эпифизарного сращения варьирует у разных видов млекопитающих. Паттерн сращения у морских свинок, который достигается к рождению, эквивалентен возрасту человека 8 лет, а таковой, наблюдаемый у морских свинок в возрасте 8 нед, наблюдается у человека в 12 лет. При этом только в возрасте 80 нед паттерн сопоставим с таковым у человека 17 лет (Zuck T.T., 1938).

Основные этапы развития скелета человека и лабораторных животных отражены в табл. 20.

Основные этапы развития скелета

Показатель	Человек	НЧП	Собака
Развитие и рост костей скелета	Точки окостенения, развивающиеся пренатально, включают центры в черепе, позвоночнике, ребрах, грудине, первичные точки в диафизах крупных трубчатых костей, их поясах и фалангах кистей и стоп. Кроме того, в течение последних нескольких недель внутриутробного развития образуются некоторые первичные точки в области лодыжки и вторичные — вокруг колена. К точкам окостенения, сливающимся в подростковом возрасте, относятся эпифизы крупных длинных костей конечностей, кистей и стоп, а также сфено-затылочный синхондроз черепа. После подросткового возраста сращение происходит в яремной пластинке роста черепа, а также во вторичных точках окостенения позвонков, лопатки, ключицы, крестца и таза. Эпифизарные пластинки роста костей человека структурно и функционально аналогичны эпифизарным пластинкам роста, развивающимся в костях других млекопитающих. У человека рост скелета начинается с формирования хрящевой матрицы, которая впоследствии заменяется костью). Линейный рост особенно длинных костей начинается с пролиферации эпифизарных хрящевых клеток и прекращается с закрытием эпифизов в период полового созревания. В целом, увеличение скорости роста длинных костей происходит в возрасте от 9 до 14 лет	При рождении присутствует, вероятно, больше точек окостенения, чем у человека. В целом, окостенение костей у новорожденных макак-резусов напоминает таковое у 5–6-летнего человека. Оссификация конечностей самцов и самок макак-резусов завершается в 5,25 и 6,5 года соответственно. У шимпанзе в среднем начало постнатального окостенения в точках длинных и коротких костей происходит примерно на 12–20 мес раньше, чем окостенение у человека	Во время постнатального развития увеличение длины диафиза происходит за счет пролиферации и созревания хондроцитов в эпифизарной пластинке роста с последующей кальцификацией матрикса. Быстрый рост костей конечностей прекращается примерно через 5 мес после рождения

Таблица 20

у человека и лабораторных животных

Кролик	Крыса	Мышь
Строение и функции эпифизарной пластинки роста кролика сходны с таковыми у человека. Увеличение длины длинных костей также происходит в результате клеточной активности эпифизарной пластинки роста. Увеличение длины конечностей происходит быстро в течение 0–8 нед после рождения. Когда животные достигают 8-недельного возраста, продольный рост конечностей замедляется до 32-й недели после рождения, после чего рост полностью прекращается. Устойчивое увеличение скорости роста бедренной кости наблюдается от нескольких дней после рождения до 3 мес. Через 3 мес происходит постепенное снижение темпов роста до 6-го месяца, когда рост прекращается. Темпы роста начинают выходить на плато в возрасте 8 нед, а к 10–14-й неделе рост практически прекращается. По сравнению с крысами и людьми кролики имеют самую высокую скорость продольного роста в день	Строение эпифизарной пластинки роста крысы сходно с человеческим. У крысы примерно к моменту отъема формируется эпифизарная пластинка роста. Быстрое увеличение длины каждой длинной кости передней и задней конечности наблюдается вплоть до достижения крысами 8-недельного возраста. Рост длинных костей у самцов и самок крыс замедляется почти до полной остановки в возрасте от 15 до 17 нед	По сравнению с крысой или человеком окостенение скелета мыши происходит за относительно короткий период времени

Показатель	Человек	НЧП	Собака
Плечевая кость	Первичные точки окостенения появляются в диафизе плечевой кости в период внутриутробного развития. При рождении 79% плечевой кости человека состоит из окостеневшего диафизарного стержня, а 21% — из неокостеневшего хрящевого материала, располагающегося преимущественно в проксимальных и дистальных эпифизах. Исследования показали, что точка вторичного окостенения в головке кости обычно появляется к 6-му месяцу после рождения, но иногда развивается на 36–40-й неделе внутриутробного развития. Сроки появления вторичной точки окостенения большого бугорка от 3-месячного возраста до 3 лет. В целом, у девочек точка появляется раньше, чем у мальчиков	При рождении у самцов макак-резусов в проксимальном эпифизе имеются две отдельных точки окостенения. В эпифизарной области дистального отдела плечевой кости при рождении имеется одна вторичная точка окостенения. Еще две точки развиваются в дистальном отделе плечевой кости в течение 1-го месяца постнатального периода. Через 9 мес после рождения отдельные точки проксимального и дистального эпифизов плечевой кости объединяются, образуя единые вторичные точки окостенения в соответствующих областях. Слияние проксимального эпифиза с диафизом у самцов и самок яванских макак происходит примерно в возрасте 6 лет и 4,75–5,5 года соответственно	Развивается из пяти вторичных точек окостенения: одна находится в диафизе, окостеневшем на момент рождения, одна — в головке и бугорках проксимального эпифиза и три — в дистальном эпифизе (по одной на медиальном и латеральном мыщелках и на медиальном надмыщелке). Вторичная точка окостенения появляется в головке плечевой кости через 1–2 нед после рождения, начинается частичное сращение эпифиза с диафизом. Закрытие эпифизарной пластинки происходит примерно в возрасте от 10 до 12 мес; однако у некоторых собак линия слияния все еще может быть заметна в 12 мес, но обычно полностью исчезает к 14 мес. В дистальном эпифизе плечевой кости центры окостенения в медиальных и латеральных мыщелках появляются на 2, 3 или 4-й неделях постнатального периода

Продолжение таблицы 20

Кролик	Крыса	Мышь
У самцов и самок японского белого кролика уже на 1-й день постнатального развития в проксимальных и дистальных эпифизах плечевой кости присутствуют вторичные точки окостенения. К 1-й неделе после рождения в длинных костях появляются все точки вторичного окостенения, за исключением точек в проксимальном эпифизе малоберцовой кости, появившихся в 2-недельном возрасте. В возрасте 32 нед проксимальный и дистальный эпифизы плечевой кости срастаются с диафизами	Вторичные точки окостенения появляются в головке и большом бугорке плечевой кости на 8-й день после рождения. Вероятно, у возрастных мышей, крыс и кроликов может наблюдаться неполное сращение эпифизов. При таком неполном сращении эпифизарная пластинка остается видимой в течение некоторого времени после начала сращения. В дистальном эпифизе плечевой кости крысы вторичные точки окостенения появляются в головке и блоке на 2-й неделе после рождения, в частности, на 8-й день постнатального периода. К 15-му дню постнатального развития в головке и блоке можно увидеть одну четко выраженную вторичную точку окостенения. К 4-й неделе отмечается сращение дистального эпифиза плечевой кости. К 42-му дню эпифизарная пластинка роста дистальной части плечевой кости больше не видна, это указывает на то, что произошло эпифизарное сращение	В проксимальном эпифизе плечевой кости на 5-е сутки постнатального периода в большом бугорке развиваются вторичные точки окостенения. Вскоре после этого эти вторичные точки окостенения объединяются и образуют единую широкую костную пластинку в эпифизе. На 7-й день постнатального периода в головке плечевой кости появляется точка окостенения. К 17-му дню постнатального развития точки головки и большого бугорка объединяются и образуют единую вторичную точку окостенения в проксимальном эпифизе. Слияние проксимального эпифиза с диафизом происходит примерно через 6–7 нед после рождения. В дистальном эпифизе в медиальных и латеральных мыщелках развиваются отдельные точки окостенения на 9-й и 19-й дни после рождения соответственно. Кроме того, на 5-й день после рождения впервые появляется вторичная точка окостенения в блоке и головке. Соединение дистального эпифиза плечевой кости с диафизом обычно происходит у мышей через 3 нед после рождения

Показатель	Человек	НЧП	Собака
Бедренная кость	Во внутриутробном периоде появляются первичные точки окостенения диафиза. Эпифиз, расположенный на дистальном конце бедренной кости, является самым крупным и быстрорастущим эпифизом в организме. В течение 6–12 мес постнатального периода начинает развиваться дистальная эпифизарная пластинка. В течение 1–3 лет постнатального периода ширина эпифиза быстро увеличивается по мере распространения оссификации по всей эпифизарной области. Сращение дистального эпифиза бедренной кости происходит у женщин и мужчин в возрасте от 14 до 18 лет и от 16 до 19 лет соответственно	У макак-резусов при рождении в головке бедренной кости имеется эпифизарная точка окостенения. Эпифизарные точки окостенения в дистальном отделе бедренной кости также присутствуют при рождении. Через 6 мес после рождения происходит вторичное окостенение. В бедренной кости самок яванских макак через 4 мес после рождения точки окостенения уже присутствовали в проксимальном и дистальном эпифизах. У самцов обезьян через 5 мес после рождения центры окостенения присутствовали в проксимальных и дистальных эпифизах. У самцов яванских макак слияние проксимальных и дистальных эпифизов соответствующего диафиза произошло в бедренной кости в возрасте 6 лет и 5,25 года соответственно. Слияние как проксимального, так и дистального эпифизов происходит у самок в возрасте 4,75 года	Через 7–10 дней после рождения в диафизе бедренной кости проявляется оссификация. Ко 2-й и 3-й неделе постнатального периода в головке бедренной кости развиваются точки окостенения. В большом вертеле и малом вертеле вторичные точки окостенения развиваются только через 8–10 нед и 2, 3 мес или 4 мес после рождения соответственно. Слияние эпифизарных пластинок головки бедренной кости, большого вертела и малого вертела происходит через 6–10, 8–11 и 10–13 мес после рождения соответственно. К 21-му дню после рождения в дистальной области бедренной кости в медиальном и латеральном надмыщелке развиваются эпифизарные пластинки роста

Окончание таблицы 20

Кролик	Крыса	Мышь
Рост бедренной кости кролика происходит быстро в течение 3 мес после рождения, после чего рост замедляется и полностью прекращается примерно к 6 мес. Это позволяет предположить, что слияние дистальных и проксимальных эпифизарных пластинок роста происходит примерно через 6 мес после рождения. Однако есть данные, что сращение головки бедренной кости и дистального эпифиза бедренной кости происходит примерно через 16 и 32 нед после рождения соответственно	Вторичные точки окостенения появляются в большом вертеле и головке бедренной кости через 4 нед после рождения. По разным данным, сращение большого вертела произошло на 78-й или 143–156-й неделе, а в головке бедренной кости — на 104-й или 143–156-й неделе. На дистальном конце бедренной кости точки вторичного окостенения появляются через 2 нед после рождения. Слияние дистального эпифиза происходит между 15-й и 17-й неделей	В проксимальном отделе бедренной кости к 14-му дню после рождения развиваются точки окостенения в большом и малом вертелах. На 15-й день после рождения в головке бедренной кости обнаруживается небольшая точка окостенения. В бедренной кости через 7 дней после рождения в медиальном мыщелке дистальной части появляется вторичная точка окостенения. На 9-й день после рождения в латеральном мыщелке развивается вторичная точка окостенения. К 13-му дню постнатального развития эти точки образуют единую широкую костную пластинку в дистальном эпифизе. К концу 1-го месяца постнатального развития проксимальный и дистальный эпифизы бедренной кости почти полностью окостеневают, однако они еще не срастаются с диафизом. Слияние проксимального эпифиза происходит примерно через 13–15 нед после рождения. Слияние дистального эпифиза происходит до 15-й недели постнатального периода, примерно между 12-й и 13-й неделей

Таблица 21

Возраст появления и слияния точек вторичного окостенения плечевой и бедренной костей у человека и лабораторных животных

Вид	Появление		Слияние	
	Проксимальный эпифиз	Дистальный эпифиз	Проксимальный эпифиз	Дистальный эпифиз
Плечевая кость				
Человек	С 34-й НВУ — 4 лет	С 6 мес — 10 лет	12–20 лет	11–19 лет
Обезьяна	При рождении	Рождение — 1 месяц	4–6 лет	1,75–4,5 года
Собака	1–2-я неделя	2–9-я неделя	10–12 мес	6–8 мес
Кролик	1-й день	1-й день	32 нед	32 нед
Хомяк	6-й день	7-й день		6 дней
Крыса	8-й день	8–30-й день	52–181 нед	31–158 дней
Мышь	5–10-й день	5–19-й день	6–7 нед	3 нед
Бедренная кость				
Человек	1–12-я неделя	36–40-я НВУ	11–19 лет	14–19 лет
Обезьяна	Рождение — 6-й месяц	Рождение	2,25–6 лет	3,25–5,75 года
Собака	1-я неделя — 4-й месяц	2–4-я неделя	6–13 мес	8–11 мес
Кошка	16-й день	7–14-й день	7–10 мес	14 мес
Кролик	1–5-й день	1-й день	16 нед	32 нед
Крыса	21–30-й день	8–14-й день	78–156 нед	15–162 нед
Мышь	14–15-й день	7–9-й день	13–15 нед	12–13 нед

Примечание. НВУ — неделя внутриутробного развития.

В табл. 21 представлены данные о возрасте появления и слияния точек вторичного окостенения плечевой и бедренной костей у человека и лабораторных животных.

Рост и прибавка массы в пределах нормы рассматриваются как часть оценки общего состояния здоровья детей и ювенильных животных. Рост и развитие костей происходят сходным образом у человека и лабораторных животных.

В заключение, влияние на постнатальное развитие скелета можно оценить в правильно спланированных исследованиях на животных, поскольку закономерности роста и развития сходны у лабораторных животных и человека (Zoetis T. и соавт., 2003).

Основные этапы развития систем органов человека представлены в табл. 22[9].

[9] Guidance for Industry S11 Nonclinical safety testing in support of development of pediatric pharmaceuticals. ICH. May 2021.

Таблица 22

Критические периоды развития основных систем органов в онтогенезе человека

Система органов	Непосредственно до родов, роды	Новорожденный (до 27-го дня после рождения)	Младенец (28 дней–23 мес)	Ребенок (2–11 лет)	Подросток (12–18 лет)	Взрослый (старше 18 лет)
Сердечно-сосудистая	Критический переход на дыхание воздухом, формирование легочного и сосудистого сопротивления, закрытие фетальных шунтов		Увеличение количества ионных каналов/дальнейшее развитие проводящей системы	Адаптивные изменения миокарда и сосудов		
Эндокринная	У плода синтез гормонов начинается во II триместре внутриутробного развития, при рождении эндокринная система уже структурно сформирована. Эндокринная система является ключевой для роста и развития			Адренархе начало полового созревания и всплеск половых гормонов	Продолжение полового созревания	
Зрительная (глаза)	Кислородчувствительный ангиогенез до рождения, при рождении глаза морфологически развиты		Развитие ретины, хрусталика, пигментация радужной оболочки заканчивается к 1 году	Тренировка зрения с 1 года до 4 лет (цветовое зрение развивается с 3 мес, фокусировка и слежение за стимулом начинается в 3 мес)	Продолжается формирование структуры хрусталика	
Пищеварительная	Сосательный и глотательный рефлексы при рождении сформированы. Критический период для функционального развития (кислотность, моторика, микробиом)		Функциональное развитие и увеличение способности к абсорбции с возрастом	Адаптация к рациону питания		
Гепатобилиарная	Структурно хорошо развита при рождении. Важный неонатальный переход в продукции желчи и выведении		Усиление метаболической и выводящей функции	Дальнейшее развитие метаболической и выводящей функции		
Иммунная	Экспансия тканей первичных и вторичных органов иммунной системы		Развитие иммунной системы, иммунитета в зависимости от времени и окружающей среды			

Окончание таблицы 22

Система органов	Непосредственно до родов, роды	Новорожденный (до 27-го дня после рождения)	Младенец (28 дней–23 мес)	Ребенок (2–11 лет)	Подросток (12–18 лет)	Взрослый (старше 18 лет)
Покровная	Формирование поверхностных слоев кожи	Формируются функции (баьерная, терморегуляция, чувствительность). Большая площадь поверхности относительно массы тела по сравнению со взрослыми	Увеличение кислотности кожи, формирование микробиома к иммунной функции. Пубертатный рост волос и интенсификация секреции сальных желез			
Нервная	Завершена дифференцировка, начало миелинизации	Максимально соотношение массы мозга к массе тела при рождении. Продолжение формирования нейронных связей, миелиновых оболочек и глии. Нейротрансмиттеры, проводящие системы созревают с различной скоростью		Совершенствование сенсоро-моторного контроля, обучения, памяти		Развитие ЦНС продолжается во взрослом возрасте
Дыхательная	Критический переход при рождении к дыханию воздухом, продолжается формирование альвеол. Сурфактант присутствует при рождении, секретируется во время родов		Дальнейшее развитие альвеол	Увеличение площади поверхности альвеол с достижением максимальной аэробной функции к взрослому возрасту		
Выделительная	Нефрогенез завершается к родам		Функциональное развитие	Рост канальцев, функциональное созревание, включая эритропоэтин и ангиотензин		
Репродуктивная	Мейоз ооцитов и опускание семенников	Опускание семенников, постнатальный выброс половых гормонов	Период покоя		Экспансия клеток Сертоли. Развитие молочных желез. Спермархе/менархе	
Скелетная	Развитие пластинок роста	Пластинки роста есть при рождении. Критический период быстрого роста, индуцируемый гормоном роста и гормонами щитовидной железы	Замедление роста	Пубертатный рост	Закрытие пластинок роста	

Примечание. Цветовые обозначения: критический период структурного и функционального роста и развития; активный период роста и/или функционального созревания; медленно продолжающийся рост и/или функциональное созревание; полностью сформировано.

Приложение 1

Соотношение возраста человека и лабораторных животных

Для человека установлены следующие категории возраста [10]:
1) недоношенные новорожденные;
2) новорожденные от 0 до 27 дней;
3) младенцы от 28 дней до 23 мес;
4) дети (от 2 до 11 лет);
5) подростки (от 12 до 18 лет).

P.C. Barrow и G. Schmitt (2017) предлагают следующее соотношение возраста человека и лабораторных животных (табл. 1).

В руководстве ICH S11[11] периоды онтогенеза лабораторных животных разделены на следующие этапы — новорожденный, начало потребления твердой пищи, отъем от матери, половое созревание, взрослый организм. Приблизительный возраст наступления этих событий у основных видов лабораторных животных представлен в табл. 2.

Для доклинических исследований одной из самых значимых проблем является подбор адекватной модели тест-системы. Наибольшую сложность в данном случае представляют исследования, необходимые для различных возрастных групп. Так, исследования многих вакцин и препаратов требуют испытаний на моделях, воспроизводящих развитие детей и подростков. При этом ряд препаратов необхо-

Таблица 1

Соотношение возраста человека и лабораторных животных

Вид	Новорожденный	Младенец	Ребенок	Подросток
Человек	0–28 дней	1–23 мес	2–12 лет	12–16 лет
Обезьяна	0–15 дней	0,5–6 мес	0,5–3 года	3–4 года
Собака	0–21 дней	3–6 нед	6–20 нед	5–7 мес
Свинья	0–15 дней	2–4 нед	4–14 нед	4–6 мес
Кролик	4–10 дней	1,5–5 нед	5–12 нед	3–6 мес
Крыса	4–12 дней	1,5–3 нед	3–5 нед	5–10 нед
Мышь	0–10 дней	1,5–3 нед	3–5 нед	5–7 нед

[10] ICH Topic E 11. Clinical Investigation of Medicinal Products in the Pediatric Population. Step 5. January 2001.
[11] Guidance for Industry S11 Nonclinical safety testing in support of development of pediatric pharmaceuticals. ICH. May 2021.

Таблица 2

Возраст наступления основных периодов онтогенеза у лабораторных животных

Вид	Новорожденный	Первое потребление твердой пищи	Отъем от матери	Половая зрелость	Взрослый организм
Обезьяна	Менее 1 мес	~ 3 мес	~ 6 мес	~ 3–4 года	~ 4 года
Карликовая свинья	Менее 2 нед	~ 2–3 нед	~ 4–6 нед	~ 4–6 мес	Более 6 мес
Собака	Менее 3 нед	~ 3 нед	~ 8 нед	~ 5–8 мес (M) ~ 6–12 мес (F)	Более 12 мес
Крыса	В течение 1–10 дней	~ 15 дней	На 21–25-й день	~ 42 дня (M) ~ 35 дней (F)	70 дней

Примечание. M — самец; F — самка.

димо тестировать с учетом геронтологических особенностей. В настоящее время существует выбор из нескольких видов лабораторных животных, которые могут быть использованы для проведения доклинических исследований. Для некоторых видов, таких как крысы и мыши, есть немало публикаций, предлагающих формулы и графики пересчета соотношений возраста животных и человека. Для некоторых тест-систем таких данных значительно меньше, что не всегда позволяет уверенно использовать в исследовании животных того или иного возраста.

Также существует проблема, связанная с видовыми отличиями между человеком и разными классами животных, кроме того, отмечаются различия в скорости развития тех или иных систем. В связи с этим была проведена собственная оценка соотношения возраста лабораторных животных и человека.

Материал и методы

Для оценки соотношения возраста человека и животного, касающегося сроков развития того или иного органа, системы или функции, были получены данные из открытых источников: статей, монографий, директив, посвященных физиологии человека и животного. Всего было использовано 127 источников, из которых боле 95% составляли иностранные публикации. Данные из этих публикации были аккумулированы в таблице 1 (приложение 1), позволяющей соотнести изучаемые онтогенетические события для человека и животного. В анализе использовали только парные данные, которые удалось однозначно соотнести для обоих видов.

Поскольку сроки некоторых событий в публикациях предоставлены в виде диапазона, а некоторые в виде срока окончания того или иного процесса, то все данные анализировали по верхней границе, самому позднему сроку наступления события.

Для единообразия и удобства анализа все сроки были пересчитаны, при этом учитывали количество дней с момента рождения, момент рождения был принят

за 0. Для событий, происходящих на этапе внутриутробного развития данные были представлены в виде отрицательных чисел. Так, 100-й день внутриутробного развития человека рассчитывали по формуле:

[280 (средняя продолжительность беременности человека) – 100] × (–1) = –180.

Поскольку вид распределения сроков наступления онтогенетических событий нельзя отнести к нормальному распределению, данные анализировали непараметрическими методами.

Для обработки полученных данных был применен корреляционный анализ по методу Спирмена. Для всех пар данных построены графики зависимости возраста человека и животного. В тех случаях, когда это было возможно, предлагали формулы уравнений аппроксимации.

Следует отметить, что в научной литературе в основном соотношение возраста человека и лабораторных животных выводится на основании времени наступления основных событий онтогенеза (прекращение молочного вскармливания, наступление половой зрелости и т.д.). При этом проводили расчеты исходя из времени наступления ключевых моментов онтогенеза основных органов и систем органов человека в сравнении с различными видами лабораторных животных. Данный подход позволил исследователям более точно определить необходимый возраст лабораторного животного, учитывая цели эксперимента. Это особенно важно в тех случаях, когда необходимо изучить потенциальное влияние на определенную систему органов (например, если цель исследования — изучение нейротоксических эффектов).

Ниже представлены данные литературы и результаты собственных исследований.

Грызуны

Данные литературы

В научной литературе одним из широко применяемых подходов является установление соотношения 1 года жизни человека к определенному промежутку времени жизни животного на основании сравнения различных событий онтогенеза.

Обсуждается, что соотношение возраста лабораторных грызунов и человека может быть описано разными путями. Например, исходя из средней продолжительности жизни крысы 3 года, мыши 2 года, хомяка 3 года и человека 80 лет, 1 год жизни человека соответствует 13,8 дня жизни крысы, 9 дням жизни мыши и 13,67 дня жизни хомяка. Однако понятно, что скорость развития грызунов очень высокая. Крысы, например, становятся половозрелыми примерно в 6-недельном возрасте. Поэтому для оценки соотношения возрастов могут быть использованы такие ключевые моменты развития млекопитающих, как продолжительность молочного вскармливания, отъем от матери, период введения в рацион первой твердой пищи. Так, крысята начинают уверенно потреблять твердую пищу примерно на 18-й день после рождения. Доля материнского молока в рационе начинает сокращаться примерно с возраста 20 дней, тогда как время, затрачиваемое на прием твердой пищи, уве-

личивается. Если принять, что средний возраст отъема от груди у людей составляет примерно 6 мес (180 дней), а у лабораторных крыс — 3 нед (возраст 21 день), у мышей — 28 дней, у хомяков — 21 день, то 1 год жизни человека соответствует 42,4 дня жизни крысы, 56,77 дня жизни мыши и 42,59 дня жизни хомяка (Sengupta P., 2013; Dutta S., Sengupta P., 2016; Dutta S., Sengupta P., 2019).

Сравнение возраста полового созревания грызунов (крысы — 38 дней, мыши — 42 дня, хомяки — 42 дня) и возраста достижения половой зрелости человеком (примерно 11,5 года) приводит к заключению, что 1 год жизни человека соответствует 3,3 дня жизни крысы и 3,65 дня мыши и хомяка.

Следующий критерий — достижение взрослого возраста. Оценивается по росту скелета. Примерно в возрасте 7–8 мес (около 210 дней) рост скелета у самцов и самок крыс *Sprague-Dawley* замедляется. У человека зона роста костей окончательно закрывается примерно в возрасте 20 лет. Исходя из этого соотношения, 1 год человека — 10, 5 дней крысы. Если принять, что мыши достигают взрослого возраста в 70 дней, хомяки — в 180 дней, то 1 год человека — 2,6 дня жизни мыши и 9 дней жизни хомяка.

Другой критерий — репродуктивное старение. У самок крыс происходит репродуктивное старение в возрасте от 15 до 20 мес. У мышей и хомяков репродуктивное старение наступает в возрасте около 15 мес. Традиционный маркер репродуктивного старение у женщин — это менопауза, наступающая в среднем в 51 год. Исходя их этого, соотношения — 1 год жизни человека — 11, 8 дня крысы или 8,82 дня жизни мыши и хомяка.

Если сравнить последующий период старения вплоть до смерти, то в фазе старения 17,1 дня жизни крысы, 2,069 дня жизни мыши и 21,73 дня жизни хомяка равны 1 году жизни человека.

Рассчитанные с использованием такого подхода соотношения возраста человека и лабораторных грызунов суммированы в табл. 3 (Sengupta P., 2013; Dutta S., Sengupta P., 2016; Dutta S., Sengupta P., 2019).

Таблица 3

Соотношения возраста крысы, мыши, хомяка и человека

Показатель	Соотношение 1 года жизни человека и дней жизни крысы, мыши, хомяка в различные периоды онтогенеза		
	1 год жизни человека равен:		
	у крысы	у мыши	у хомяка
Продолжительность всей жизни	13,2	9	13,67
Период вскармливания	42,4	56,77	42,59
Достижение половой зрелости	3,3	3,65	3,65
Взрослый возраст	10,5	2,60	9
Репродуктивное старение	11,8	8,82	8,82
Старение	17,1	2,069	21,73
Среднее	16,4	13,8	16,58

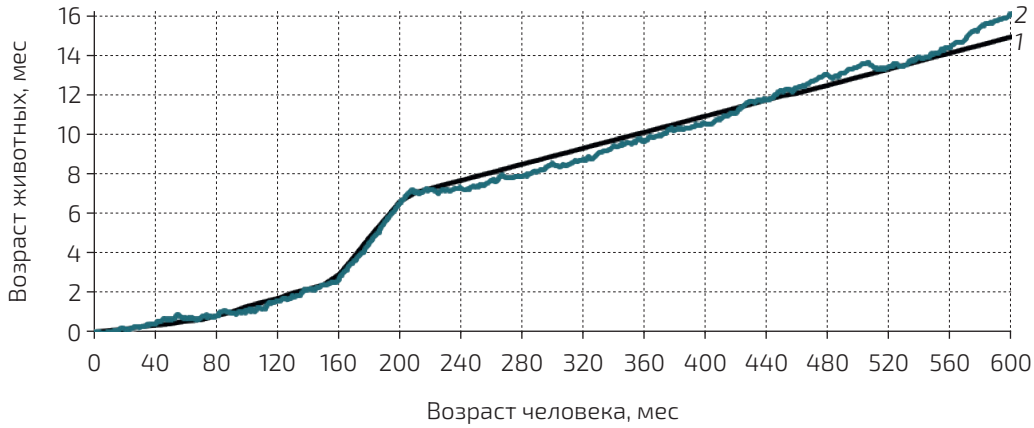


Рис. 1. Сопоставление возраста человека и лабораторных крыс: 1 — сопоставление возраста при полном соответствии стадий онтогенеза; 2 — график, предполагающий учет неполноты информации

Схожий по смыслу подход взят за основу российскими учеными, которые на основе анализа возраста наступления определенных этапов онтогенеза (таких, как появление первого коренного зуба, первая овуляция, практически полная остановка роста, менопауза для особей женского пола) построили математическую модель, позволяющую соотнести возраст лабораторного животного и человека (рис. 1) (Бутов А.А., Шабалин А.С., 2015).

Следует отметить, что все эти расчеты и/или модели строятся на основании численных данных о наступлении и/или продолжительности того или иного этапа онтогенеза. Поэтому от того, какие данные взяты за основу расчетов, зависит результат вычислений. Как отмечают ряд авторов, точных сведений о продолжительности определенных периодов жизни лабораторных животных в научной литературе относительно немного, а ряд имеющихся данных вариативен. По результатам обзорно-синтетического исследования опубликованных научных данных по соотношению возрастов наиболее часто используемых видов лабораторных животных и человека коллективом российских ученых на основании всестороннего анализа данных о периодах онтогенеза животных выведены стандартные формулы, и построены калибровочные кривые, отражающие соотношение возрастных периодов животных в соответствии с возрастом человека. Были проанализированы данные лабораторных животных, для которых имеются соответствующие исследования возрастной радиочувствительности (мыши, крысы, хомячки, собаки).

Авторы рекомендуют использовать калибровочную кривую, приведенную на рис. 2, как «табельную» референсную зависимость для определения соотношений возрастов мыши и человека. Калибровочный график для оценки соотношений возрастов хомяка и человека представлен на рис. 3.

Для оценки возраста крыс предлагаются два варианта зависимостей, построенные на основании различных данных (рис. 4, *а*, *б*).

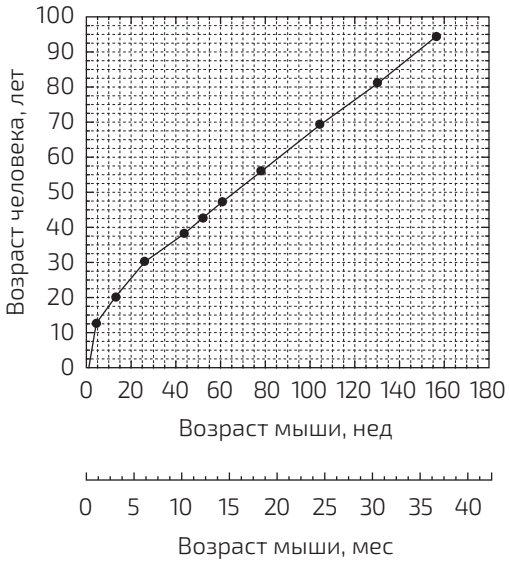


Рис. 2. Калибровочный график для оценки соотношений возрастов мыши и человека. Оптимальное уравнение, описывающее зависимость: $y=4{,}058x - 0{,}043x^2$; $r=0{,}996$; $p<0{,}001$

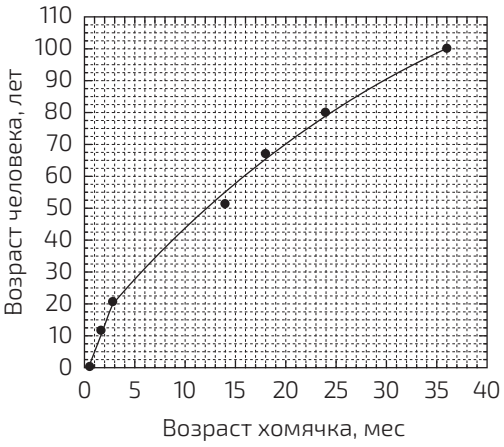


Рис. 3. Калибровочный график для оценки соотношений возрастов хомяка и человека. Двухфазная кривая; функции построения: период от рождения до половой зрелости (2,8 мес — хомячок; 20 лет — человек): $y=3{,}860x - 1{,}240x^2$; $r=0{,}997$; $p=0{,}024$; от периода половой зрелости до смерти: $y=4{,}546x - 0{,}049x^2$; $r=0{,}990$; $p<0{,}001$

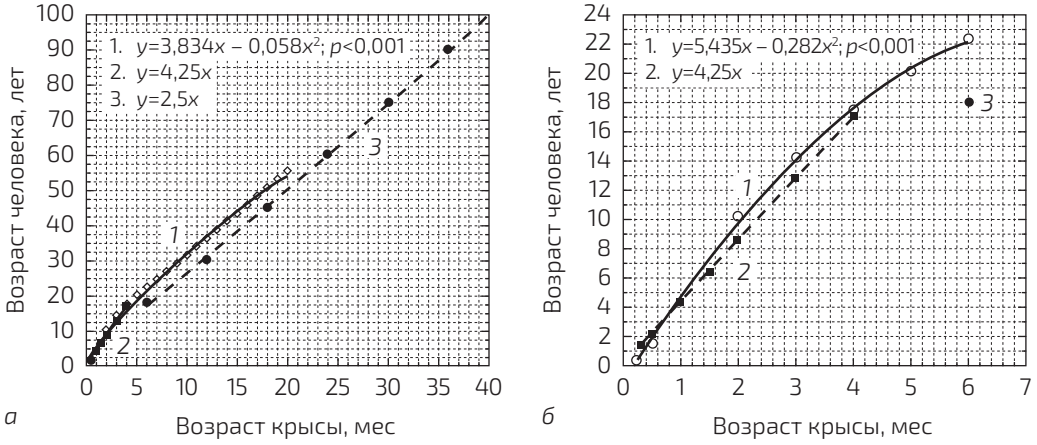


Рис. 4. Сопоставление возрастов крысы и человека по различным данным (цифрами обозначены источники данных)

Исследователь может выбрать, какой из представленных функций пересчета пользоваться. С точки зрения авторов, начиная от возраста зрелости (то есть для крысы от 6 мес, а человека от 18 лет), целесообразно подходить с формальных позиций и использовать следующий подход: если возраст крысы более 6 мес, то для получения аналогичного возраста человека в годах надо умножить это значение на 2,5 (Котеров А.Н. и соавт., 2018).

Американские ученые на основании данных литературы (проанализировано около 1,5 млн рефератов базы данных PubMed) сопоставили закономерности возрастного распределения заболеваний у мышей и людей. Для 223 заболеваний были установлены соотношения возрастов. Так, возраст 30 лет у человека соответствует 120 дням у мышей при лейкемии и 295 дням при анемии. Созданная на основании проведенного анализа база содержит около 10 000 связей между заболеваниями и возрастом. Авторы предполагают, что более тщательный выбор возраста мышей, в котором они будут взяты в исследование для изучения той или иной болезни с учетом установленных корреляций возраста заболеваний человека и мыши, будет способствовать получению более ценных результатов (Geifman N., Rubin E., 2013).

Предложен способ определения биологического возраста человека и животных путем расчета энтропии организма, исходя из предположения о наличии тесной связи между энтропией в организме и его биологическим возрастом. Организмы с меньшей энтропией в любой точке на оси времени обладают бóльшими перспективами в плане продолжительности жизни. И наоборот, организмы, у которых энтропия в данный момент времени выше, имеют меньше шансов прожить долгую жизнь. Во-вторых, между ожидаемой продолжительностью жизни индивида как величиной абсолютной и его биологическим возрастом как величиной относительной фактически прожитым годам, имеется обратная связь. Энтропию организма человека предлагается рассчитывать по определенной формуле, учитывающей в том числе такие показатели, как относительная к массе тела масса сердца (в %), число сердечных сокращений, содержание кислорода в альвеолярном воздухе легких (в %), средняя продолжительность жизни в регионе проживания индивида в данный период времени, фактический возраст (Устьянцев С. Л., 2017).

Этапы онтогенетичекого развития крысы представлены в табл. 4.

Собственные данные

В результате анализа таблицы сроков развития различных систем были выбраны пары соответствующих событий для каждого вида. Эти результаты были представлены в виде графика соотношения дней по различным системам (рис. 5). Обобщить эти данные без исключения некоторых из них из анализа не представлялось возможным, поскольку разные системы человека и животных развиваются с разной скоростью и характеризуются индивидуальными особенностями. Для того чтобы получить аппроксимирующую зависимость, из общего массива были удалены 4 точки, характеризующие развитие костной системы. Эти точки отмечены на графике овалом. Для остальных данных было рассчитано уравнение нелинейной аппроксимирующей зависимости, которое представлено на графике.

Этапы онтогенетического

Система органов	Основные изменения
Сердечно-сосудистая	Критичные физиологические изменения при рождении (формирование сосудистого сопротивления). Адаптивные изменения миокарда и сосудов. Значительное увеличение количества кардиомиоцитов и ионных каналов к возрасту 21 день
Эндокринная	Большинство желез хорошо развиты при рождении, необходимы для роста и развития
Зрительная (глаза)	Морфологическое развитие сетчатки, хрусталика, радужной оболочки, роговицы, век, экстраокулярных мышц продолжается до ПНД 14. Открытие глаз на ПНД 14. Глаза морфологически полностью развиты к моменту отъема: в период полового созревания продолжается функциональное развитие зрения
Пищеварительная	Незрелая при рождении, не синтезируется соляная кислота в желудке и низкая секреция ферментов поджелудочной железы до ПНД 14. Проксимальный отдел тонкого кишечника хорошо проницаем, возможна абсорбция неразрушенных белков. Адаптационные изменения к возрасту 3 нед в связи с изменением в рационе питания
Гепатобилиарная	Структурно незрела при рождении. Значительное развитие печеночных балок, увеличение метаболической активности в течение первых 4 нед после рождения
Иммунная	Быстрое развитие вторичных иммунных тканей, формирование иммунной памяти в зависимости от окружающей среды и времени. Т-зависимый антительный ответ (TDAR) обычно развивается после ПНД 45
Покровная	Критическая роль при рождении (барьерная, терморегуляция, регуляция водно-солевого обмена, проводимость, чувствительность); утолщение эпидермиса в первые 2 нед после рождения. Шерстный покров развивается постнатально, достигает взрослых характристик к ПНД 21. Половой диморфизм к ПНД 35–42

Таблица 4

развития крысы

Новорожденный (~ ПНД 1–10)	1-я твердая пища (~ ПНД 15)	Отъем (~ ПНД 21–25)	Половое созревание ~ ПНД 42 (M), ~ ПНД 35 (F)	Взрослый организм (~ ПНД 70)

Система органов	Основные изменения
Нервная	Структурное созревание обонятельных луковиц, мозжечка, гиппокампа, коры полушарий в первые 3 нед после рождения. Максимальное число нейронов и отношения головной мозг/масса тела к ПНД 7, экстенсивный постнатальный апоптоз нейронов, прунинг и миграция. Миелинизация спинного мозга постнатально в каудокраниальном направлении, развитие рефлексов, сенсомоторной функции, затем функции обучения и памяти. Созревание проводящих систем, опиоидных рецепторов/метаболизма, ГАМК-, серотонин-, норадренергических путей происходит с разной скоростью
Дыхательная	Саккулярная фаза развития легких при рождении. Формирование альвеол происходит в течение 2–3 нед после рождения
Выделительная	Нефрогенез не завершен при рождении. Значительное увеличение скорости клубочковой фильтрации и выделительной функции в возрасте 3–5 нед
Репродуктивная	Период снижения продукции андрогенов клетками Лейдига в первые 3 нед после рождения, что необходимо для экспансии клеток Сертоли и половых клеток. Дальнейшее формирование репродуктивной системы и появление полового диморфизма в период полового созревания (возраст 5–7 нед)
Скелетная	Быстрый постнатальный рост, рост в период взросления. Пластинки роста длинных костей мало заметны, до ПНД 14–21 остаются открытыми во взрослом возрасте

Примечание. M — самец; F — самка; ПНД — день постнатального развития.

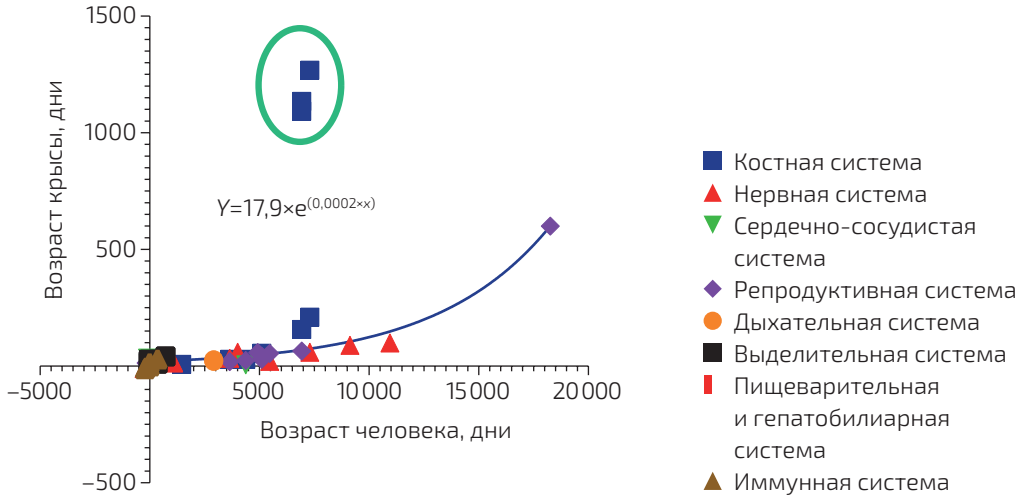


Рис. 5. График соотношения возраста крысы и человека. Зеленым овалом выделены данные, сильно отклоняющиеся от общей зависимости. В анализ эти значения включены не были

Окончание таблицы 4

Новорожденный (~ ПНД 1–10)	1-я твердая пища (~ ПНД 15)	Отъем (~ ПНД 21–25)	Половое созревание ~ ПНД 42 (M), ~ ПНД 35 (F)	Взрослый организм (~ ПНД 70)

Далее был проведен анализ соотношения возраста человека и крысы по системам независимо от остальных систем.

На первом этапе был проведен корреляционный анализ, в ходе которого оценили, есть ли согласованность между сроками наступления того или иного физиологического события в каждой из изученных систем между человеком и животным (табл. 5).

Анализ данных показал, что сроки развития и появления тех или иных органов и систем, относящихся к сердечно-сосудистой, дыхательной и выделительной системам у крыс не коррелированы с соответствующими событиями у человека. Возможно отсутствие корреляционной зависимости связано с недостаточным количеством данных по этим системам, и в дальнейшем, при увеличении количества данных и по этим системам, удастся получить статистически значимую корреляционную зависимость.

Далее был проведен анализ данных по остальным системам, и результаты вместе с уравнениями функций аппроксимации приведены на рис. 6–9. На нижеследующих графиках был приведен обратный порядок соотношения возраста человека от возраста крысы. Поскольку никакой реальной зависимости в данном случае быть не может, это было сделано для удобства дальнейшего использования формул расчета.

Таблица 5

Данные статистического анализа

Система	*n*	Коэффициент корреляции Спирмена	*p*
Костная	10	0,91	0,0006
Нервная	19	0,89	<0,0001
Сердечно-сосудистая	5	–0,21	0,76
Репродуктивная	11	0,93	<0,0001
Дыхательная	3	–0,87	0,667
Выделительная	7	0,22	0,646
Пищеварительная и гепатобилиарная	3	0,87	0,667
Иммунная	5	0,97	0,0333

Примечание. n — количество событий, описанных в литературе для обоих видов. Красным цветом выделены статистически незначимые коэффициенты корреляции.

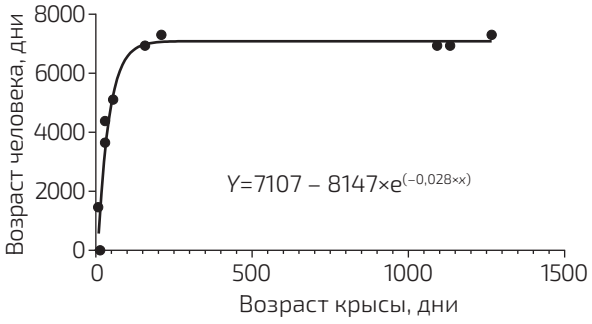


Рис. 6. Костная система

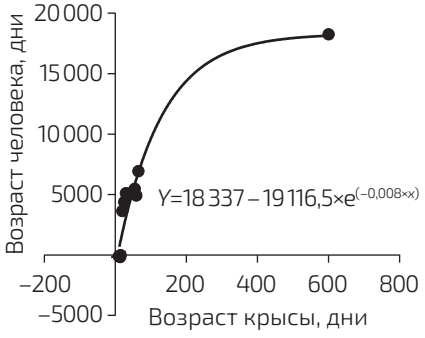


Рис. 7. Репродуктивная система

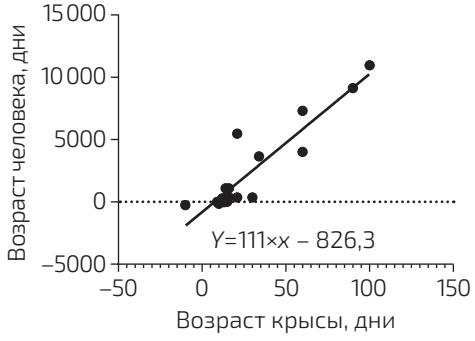


Рис. 8. Нервная система

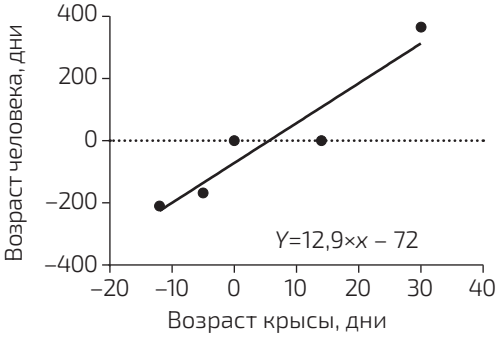


Рис. 9. Иммунная система

Таблица 6

Пример выбора предпочтительного возраста крыс
для доклинических исследований объектов, влияющих на различные системы

Система	Возраст человека	Возраст крысы, дни
Костная	10 лет	31
Нервная	То же	40
Репродуктивная	»	33
Иммунная	0,5 года	19

Таблица 7

Формулы для пересчета возраста человека на возраст крыс и обратно

Система	Формула пересчета	
	Человек → крыса	Крыса → человек
Общая	$Y=17{,}9\times e^{(0{,}0002\times X)}$	$X=5000\times\ln\frac{Y}{17{,}9}$
Костная	$X=-36{,}26\times\ln\frac{Y-7107}{-8147}$	$Y=7107-8147\times e^{(-0{,}028\times X)}$
Нервная	$X=\frac{Y+826{,}3}{111}$	$Y=111\times X-826{,}3$
Репродуктивная	$X=-125\times\ln\frac{Y-18337}{-19116{,}5}$	$Y=18337-19116{,}5\times e^{(-0{,}008\times X)}$
Иммунная	$X=\frac{Y+71{,}98}{12{,}85}$	$Y=12{,}85\times X-71{,}98$

Для иммунной системы на имеющихся данных нами была получена зависимость в очень узком диапазоне от 80 дня внутриутробного развития до 1 года, что не позволяет нам экстраполировать данные на более поздние периоды развития.

На основании полученных результатов можно предложить подход для дифференцированного подбора тест-систем для выполнения доклинических исследований, требующих учета возраста. Так в табл. 6 представлен пример выбора предпочтительного возраста крыс для доклинических исследований объектов, влияющих на различные системы.

В табл. 7 приведены формулы для пересчета возраста с человека на крыс и обратно. Далее приведены примеры пересчета.

Пример: если в исследовании использованы крысы в возрасте 9 дней, то этот возраст крысы будет соответствовать возрасту человека:

$$Y=111\times X - 826{,}3=111\times 9 - 826{,}3=172{,}7 \text{ дня (5,8 мес).}$$

Если необходимо изучить влияние лекарственного средства на нервную систему у человека в возрасте 6 лет, то этот возраст человека будет соответствовать возрасту крысы:

$$X=Y + 826{,}3/111=6\times 365 \text{ дней} + 826{,}3/111=27 \text{ дней.}$$

Мышь

На рисунке 10 представлено соотношение возрастов мыши и человека, в таблице 8 — данные статистического анализа.

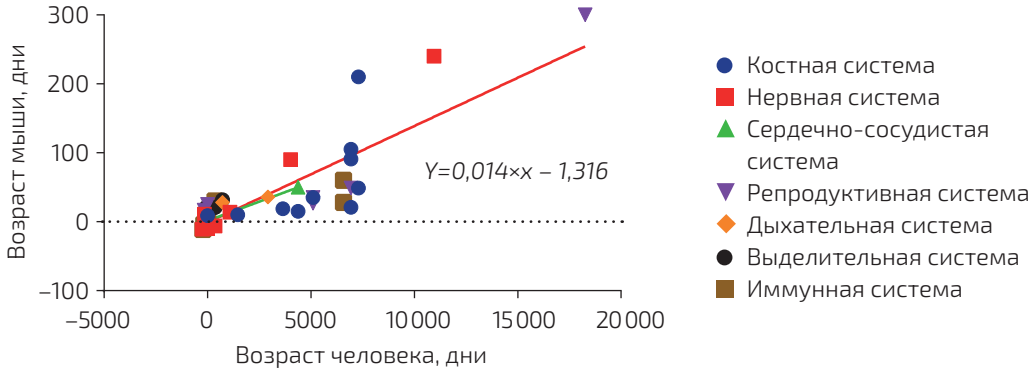


Рис. 10. График соотношения возрастов мыши и человека

Таблица 8

Данные статистического анализа

Система	*n*	Коэффициент корреляции Спирмена	*p*
Костная	10	0,89	0,0012
Нервная	7	0,89	0,012
Сердечно-сосудистая	3	1,00	0,3333
Репродуктивная	6	0,99	0,0056
Выделительная	6	0,39	0,4667
Иммунная	7	0,93	0,0079

Примечание. n — количество событий, описанных в литературе для обоих видов. Красным цветом выделены статистически незначимые коэффициенты корреляции.

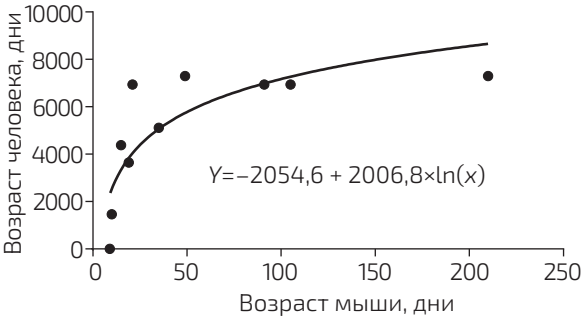


Рис. 11. Костная система

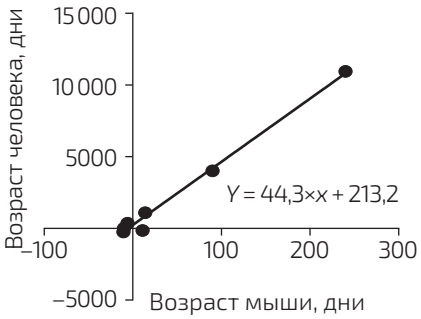


Рис. 12. Нервная система

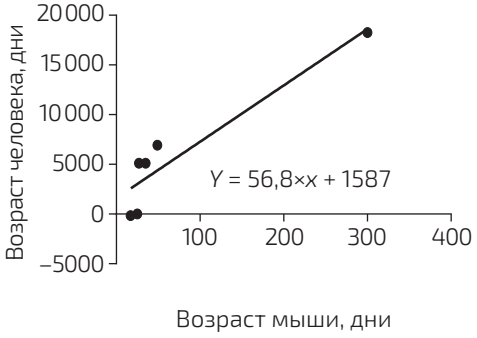


Рис. 13. Репродуктивная система

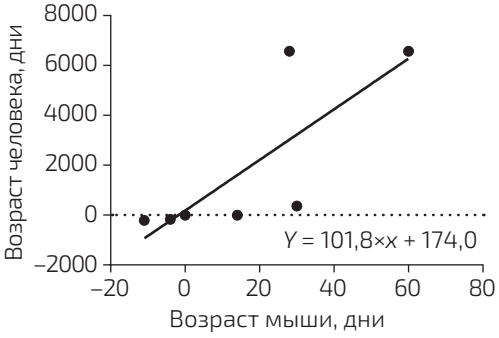


Рис. 14. Иммунная система

Таблица 9

Формулы для пересчета возраста человека на возраст мыши и обратно

Система	Формула пересчета	
	Человек → мышь	Мышь → человек
Общая	$Y=0,014\times X-1,316$	$X=\frac{Y+1,316}{0,014}$
Костная	$X=e^{\frac{Y+2054,6}{-2006,8}}$	$Y=-2054,6+2006,8\times\ln(X)$
Нервная	$X=\frac{Y-213,2}{44,3}$	$Y=44,3\times X+213,2$
Репродуктивная	$X=\frac{Y-1587}{56,8}$	$Y=56,8\times X+1587$
Иммунная	$X=\frac{Y-174}{101,8}$	$Y=101,8\times X+174,0$

Результаты анализа данных по отдельным системам, и результаты вместе с уравнениями функций аппроксимации приведены на рис. 11–14.

В табл. 9 приведены формулы для пересчета возраста с человека на мышь и обратно.

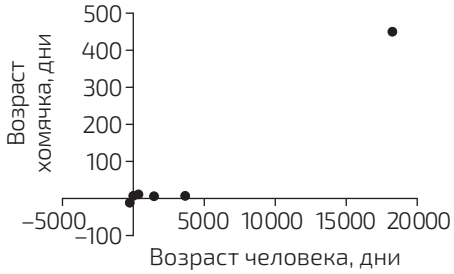


Рис. 15. График соотношения возраста хомяка и человека

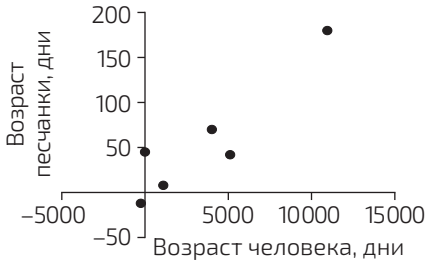


Рис. 16. График соотношения возраста песчанки и человека

Таблица 10

Данные статистического анализа

n	Коэффициент корреляции Спирмена	*p*
6	0,64	0,20

Примечание. n — количество событий, описанных в литературе для обоих видов. Красным цветом выделены статистически незначимые коэффициенты корреляции.

Таблица 11

Данные статистического анализа

n	Коэффициент корреляции Спирмена	*p*
6	0,71	0,14

Примечание. n — количество событий, описанных в литературе для обоих видов. Красным цветом выделены статистически незначимые коэффициенты корреляции.

Хомяк

На рисунке 15 представлено соотношение возрастов хомяка и человека, в табл. 10 — данные статистического анализа.

Песчанка

На рисунке 16 представлено соотношение возрастов чесчанки и человека, в табл. 11 — данные статистического анализа.

Морская свинка

На рисунке 17 представлено соотношение возрастов морской свинки и человека, в табл. 12 — данные статистического анализа.

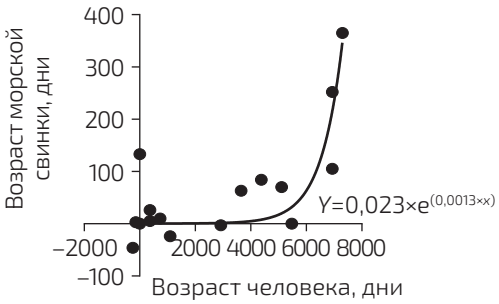


Рис. 17. График соотношения возраста морской свинки и человека

Таблица 12

Данные статистического анализа

n	Коэффициент корреляции Спирмена	*p*
17	0,63	0,0084

Примечание. n — количество событий, описанных в литературе для обоих видов.

Таблица 13

Формулы для пересчета возраста с человека на морскую свинку и обратно

Система	Формула пересчета	
	Человек → морская свинка	Морская свинка → человек
Общая	$Y=0{,}023\times e^{(0{,}0013\times X)}$	$X=760\times \ln\frac{Y}{0{,}023}$

В табл. 13 приведены формулы для пересчета возраста с человека на морскую свинку и обратно.

Кролик

Данные литературы

Для определения соотношения возраста кролика и человека исследователи (Dutta S., Sengupta P., 2018; Sengupta P., Dutta S., 2020) предлагают подход, аналогичный описанному для грызунов, основанный на сравнении продолжительности жизни и возраста наступления ключевых периодов онтогенеза.

Исходя из средней продолжительности жизни лабораторного кролика 10 лет и человека 80 лет, 1 год жизни человека соответствует 45,625 дням жизни кролика.

Крольчата начинают потреблять твердую пищу примерно на 14–21-й день жизни, но находятся на молочном вскармливании до возраста 4–6 нед. Если взять значение этого параметра 28 дней и принять, что средний возраст отъема от груди у людей составляет примерно 6 мес (180 дней), то 1 год жизни человека соответствует 56,77 дням жизни кролика.

Полового созревания кролики в среднем достигают в возрасте 150 дней. Для человека этот возраст приблизительно оценивается как 11,5 года. Исходя из этой логики, 1 год человека равен 13,04 дням жизни кролика.

Следующий критерий — достижение взрослого возраста, оценивается по росту скелета. Если принять, что кролики достигают взрослого возраста в 1 год, то 1 год жизни человека — это 18,25 дня жизни кролика.

Другой критерий — репродуктивное старение. У кроликов репродуктивная функция сохраняется до 6 лет. Традиционный маркер репродуктивного старение у женщин — это менопауза, наступающая в среднем в 51 год. Исходя их этого соотношения, 1 год жизни человека — это 42,94 дня жизни кролика.

Если сравнить последующий период старения вплоть до смерти, то фаза старения 50,34 дня жизни кролика соответствуют 1 году жизни человека.

Поскольку в биомедицинских исследованиях используются кролики различных пород, между которыми есть отличия во времени наступления ключевых моментов онтогенеза (табл. 14), предложив в публикации 2018 г. обобщенный подход, в 2020 г. авторы опубликовали статью, в которой приведено соотношение возраста различных пород лабораторных кроликов к 1 году жизни человека (табл. 15).

Таблица 14

Показатели развития основных пород лабораторных кроликов

Показатель	Порода кроликов				
	Новозеландский белый	Новозеландский красный	Голландский	Калифорнийский	Польский
Масса тела при рождении, г	30–80	~55	35–40	~54	30,35
Скорость роста, 1 г в 8 нед	15–20	15–25	10–12	21–24	9–12
Возраст наступления первого эструса, мес	5–6	5–7	4–5	6–7	~4
Масса тела на момент первого эструса, г	1700–3000	2000–3000	500–800	1500–2500	500–700
Половая зрелость	5–7 мес (~150 дней)	5–7 мес (~180 дней)	~120 дней	6–7 мес (~180 дней)	~120 дней
Менопауза, годы	5–7 (~6 лет)	5–7 (~6 лет)	3–5 (~4 года)	5–7 (~6 лет)	3–4 (~3,5 года)
Продолжительность беременности, дни	31–32	28–35	30–33	28–32	28–34
Прекращение молочного вскармливания, дни	28	28	35	35–42	35
Достижение взрослого возраста	1 год (~355 дней)	52–80 нед (~455 дней)	6–10 мес (~240 дней)	1 год (~355 дней)	6–10 мес (~240 дней)
Продолжительность жизни, годы	10	8–10	5–8	8	5–8

Таблица 15

Соотношение 1 года жизни человека к дням жизни различных пород лабораторных кроликов

Показатель	Порода кроликов				
	Новозеландский белый	Новозеландский красный	Голландский	Калифорнийский	Польский
Продолжительность всей жизни	45,625	36,5	27,38	36,5	27,38
Период вскармливания	56,77	56,77	71,01	85,28	71,01
Половая зрелость	13,04	15,65	13,04	15,65	10,43
Взрослый возраст	18,25	22,75	30,41	18,25	30,41
Репродуктивное старение	42,94	42,94	28,62	42,94	25,05
Старение	50,34	25,17	25,17	25,17	31,46
Среднее	37,8	33,3	32,6	37,3	32,6

Собственные данные

На рисунке 18 представлено соотношение возрастов кролика и человека, в табл. 16 — данные статистического анализа.

Графики для оценки соотношения возраста кролика и человека при развитии различных систем органов представлены на рис. 19 и 20.

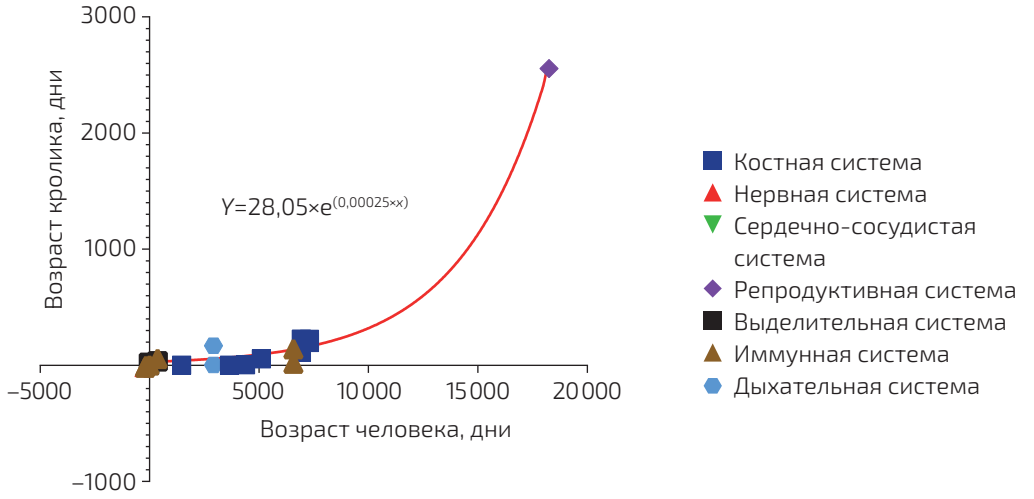


Рис. 18. График соотношения возраста кролика и человека

Таблица 16

Данные статистического анализа

Система	*n*	Коэффициент корреляции Спирмена	*p*
Костная	10	0,89	0,0014
Иммунная	6	0,99	0,0056

Примечание. n — количество событий, описанных в литературе для обоих видов.

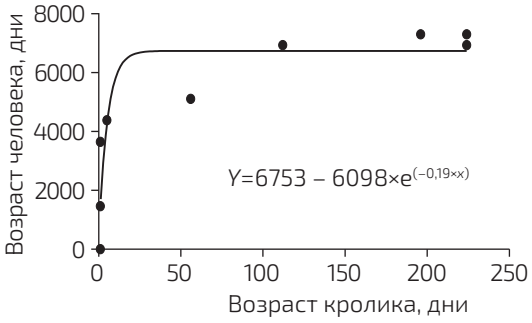


Рис. 19. Костная система

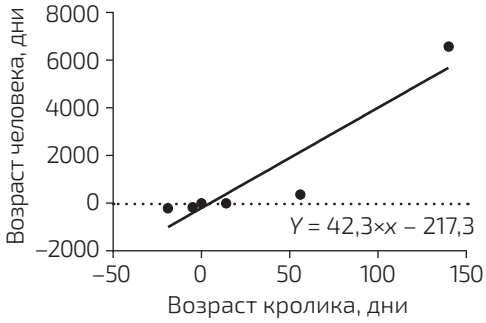


Рис. 20. Иммунная система

Таблица 17

Формулы для пересчета возраста человека на возраст кролика и обратно

Система	Формула пересчета	
	Человек → кролик	Кролик → человек
Общая	$Y=28{,}05\times e^{(0{,}00025\times X)}$	$X=4000\times\ln\frac{Y}{28{,}05}$
Костная	$X=-5{,}3\times\ln\frac{Y-6753}{-6098}$	$Y=6753-6098\times e^{(-0{,}19\times X)}$
Иммунная	$X=\frac{Y+217{,}3}{42{,}3}$	$Y=42{,}3\times X-217{,}3$

В табл. 17 приведены формулы для пересчета возраста с человека на кролика и обратно.

Собака и карликовая свинья

По результатам обзорно-синтетического исследования и опубликованных научных данных по соотношению возраста наиболее часто используемых видов лабораторных животных и человека коллективом российских ученых на основании всестороннего анализа данных о периодах онтогенеза животных выведены стандартные формулы и построены калибровочные кривые, отражающие соотношение возрастных периодов животных с показателями возраста человека (Котеров А.Н. и соавт., 2018).

Калибровочный график для оценки соотношений возрастов собаки и человека приведен на рис. 21. При этом авторы отмечают, что проверить выведенную зависимость путем сравнения данных о конкретных возрастных границах физиологических периодов собаки и человека не удалось по причине недостаточности данных (не было информации для всего жизненного цикла), а также потому, что даже в случае наличия информации указанные границы соответствующих диапазонов оказывались слишком широкими (Котеров А.Н. и соавт., 2018).

Основные периоды онтогенеза собаки представлены в табл. 18, карликовой свиньи — в табл. 19.

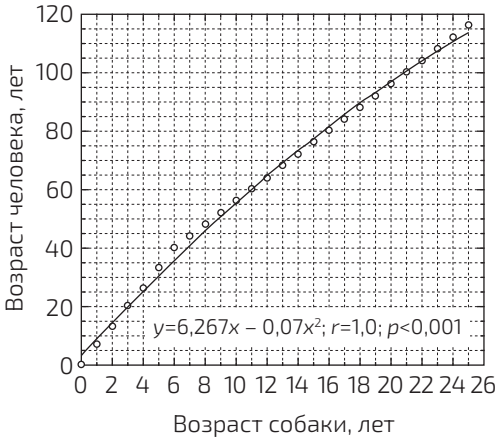


Рис. 21. Калибровочный график для оценки соотношения возраста собаки и человека

Основные этапы

Система органов	Основные изменения
Сердечно-сосудистая	Критичные физиологические изменения при рождении (формирование сосудистого сопротивления). Адаптивные изменения миокарда и сосудов. Значительное увеличение кровяного давления и снижение частоты сердечных сокращение в период от 1 до 6 мес после рождения
Эндокринная	Развитие эндокринной системы и начало продукции гормонов происходит внутриутробно. Эндокринная регуляция необходима для роста и развития, усиления функции в период полового созревания
Зрительная (глаза)	Морфологическое развитие практически завершено при рождении, глаза открываются в возрасте 10–14 дней. Созревание сетчатки к возрасту 7 нед, роговица становится прозрачной, пигментация радужной оболочки завершается к возрасту около 8 нед. Зрение полностью сформировано к возрасту 12–14 нед
Пищеварительная	При рождении ЖКТ полностью сформирован, сосательный/глотательный рефлексы полностью сформированы на 1–2-й день после рождения. Молозиво матери стимулирует созревание кишечника и рост. Метаболическая функция развивается преимущественно в период от рождения до отъема
Гепатобилиарная	Структурно созревает к возрасту 1 нед. Функция секреции желчи устанавливается более медленно (от 30 до 70% взрослого уровня достигается в возрасте 4–6 нед)
Иммунная	Отсутствие гаммаглобулинов при рождении: необходимы материнские (колостральные) IgG (поступление с молозивом) в первые 12–24 ч после рождения. Иммунные ткани полностью структурно и функционально сформированы при рождении или сразу вскоре после рождения. Быстрый постнатальный рост тимуса достигает максимального размера на момент отъема с инволюцией в период полового созревания
Покровная	Критические в период после рождения функции (барьерная, гидратация, чувствительность) развиваются в период до 2 нед. Некоторый шерстный покров, ногти есть при рождении, в период вскармливания кожа кончика носа и подушечки лап утолщаются, происходит развитие шерстного покрова, характерного для взрослого животного

Таблица 18

онтогенетического развития собаки

Новорожденный (менее 3 нед)	1-я твердая пища (~3 нед)	Отъем (~8 нед)	Половое созревание ~ 5–8 мес (M), ~ к 6–12 мес (F)	Взрослый (более 12 мес)

Система органов	Основные изменения
Нервная	Повышенный тонус сгибателей при рождении, затем в 1-ю неделю развиваются разгибатели. Неонатальные (примитивные) рефлексы исчезают около ПНД 28. Локомоторная функция развивается быстро в течение первых 8 нед. Структурное созревание спинного мозга происходит к возрасту 6 нед, но скорость нервной проводимости увеличивается в период 6–12 мес. Быстрое развитие когнитивных функций с критическим периодом для обучения около 18–28-го ПНД
Дыхательная	Развитие легких продолжается постнатально и через 1–2 нед после рождения обычно сравнимо со степенью развития легких новорожденного ребенка. Постоянная частота дыхательных движений (ЧДД) устанавливается к 8 нед, ЧДД снижается по мере роста организма в период полового созревания. Развитие легких продложается до возраста 8 нед с достижением максимальной альвеолярной емкости в возрасте около 1 года
Выделительная	Почки структурно и функционально незрелы при рождении, завершение нефрогенеза происходит в возрасте около 2 нед. Удлинение канальцев и формирование почки до возраста 3 нед с достижением взрослых характеристик к моменту отъема. Способность концентрировать мочу развита пренатально, но способность поддерживать кислотно-щелочной балланс происходит постнатально
Репродуктивная	Семенники опускаются постнатально в возрасте 5–6 нед. Самцы достигают половой зрелости в возрасте около 5–8 мес, самки около 6–12 мес
Скелетная	Появление точек оссификации длинных костей в период 1–10 нед после рождения. Конечности не способны выдерживать массу тела до возраста 2 нед. Наиболее быстрый период роста длинных костей завершается в возрасте 5 мес, медленный рост продолжается до возраста около 18 мес

Примечание. ПНД — день постнатального развития; M — самец; F — самка.

Основные этапы онтогенетического

Система органов	Основные изменения
Сердечно-сосудистая	Критичные физиологические изменения при рождении (формирование сосудистого сопротивления). Адаптивные изменения миокарда, сосудов и рост
Эндокринная	Развитие эндокринной системы и начало продукции гормонов происходит внутриутробно. Эндокринная регуляция необходима для роста и развития, усиления функции в период полового созревания

Окончание таблицы 18

Новорожденный (менее 3 нед)	1-я твердая пища (~3 нед)	Отъем (~8 нед)	Половое созревание ~ 5–8 мес (M), ~ к 6–12 мес (F)	Взрослый (более 12 мес)

Таблица 19

развития гетингенской карликовой свиньи

Новорожденный (менее 2 нед)	1-я твердая пища (~ 2–3 нед)	Отъем (~ 4–6 нед)	Половая зрелость (~ 4–6 мес)	Взрослый (более ~ 6 мес)

Система органов	Основные изменения
Зрительная (глаза)	Глаза морфологически хорошо развиты при рождениии, глаза открываются в течение 1–3 дней после рождения. Полное открытие век к возрасту 3 нед, что позволяет проводить офтальмологический осмотр
Пищеварительная	Развитие сопоставимо в высокой степени с постнатальным развитием ЖКТ человека; способность к абсорбции развита неонатально. Постнатально начинает вырабатываться соляная кислота, устанавливается микробиота, моторика; адаптация пищеварительной/транспортной функции происходит к моменту отъема
Гепатобилиарная	Структурно и функционально незрелая при рождении, взрослые характеристики достигаются к возрасту 4 нед. Быстрое развитие метаболической функции особенно в первые 3–4 мес
Иммунная	Минимальный врожденный и пассивный иммунитет при рождении, поросятам необходимы материнские антитела в первые 2–4 ч после рождения. Анатомически полностью развивается к возрасту около 4 нед. Быстрое развитие вторичных иммунных тканей и иммунной памяти как функции времени и изменений окружающей среды
Покровная	Критические функции есть при рождении (барьерная, проводящая, чувствительность). Недостаточная терморегуляция с рождения и до возраста 2–3 нед
Нервная	Характеризующийся половым диморфизмом постнатальный рост головного мозга быстрый до отъема и продолжается в период половой зрелости. Миелин, глия и большинство нейронов коры есть при рождении. Нервно-мышечная система более функционально зрелая при рождении, чем нервно-мышечная система человека при рождении
Дыхательная	Легкие хорошо развиты при рождении, развитие альвеол полностью завершается в первые 2 нед постнатально. Продолжающийся рост и функциональное развитие в период полового созревания
Выделительная	Нефроны формируются до возраста около 3 нед. Функциональная зрелось в возрасте около 3 мес
Репродуктивная	Опускание структурно хорошо развитых семенников при рождении. Половая зрелость у самцов в возрасте 4–5 мес, у самок в 5–6 мес
Скелет	Способность стоять после рождения, подвижность увеличиваются в первые несколько дней после рождения. Быстрый постнатальный рост с закрытием эпифизарных пластинок роста в возрасте 18 мес

Окончание таблицы 19

Новорожденный (менее 2 нед)	1-я твердая пища (~ 2–3 нед)	Отъем (~ 4–6 нед)	Половая зрелость (~ 4–6 мес)	Взрослый (более ~ 6 мес)

Собака

Собственные данные

На рисунке 22 представлено соотношение возрастов собаки и человека, в табл. 20 — данные статистического анализа.

Графики для оценки соотношения возраста собаки и человека при развитии различных систем органов представлены на рис. 23–25.

В табл. 21 приведены формулы для пересчета возраста с человека на собаку и обратно.

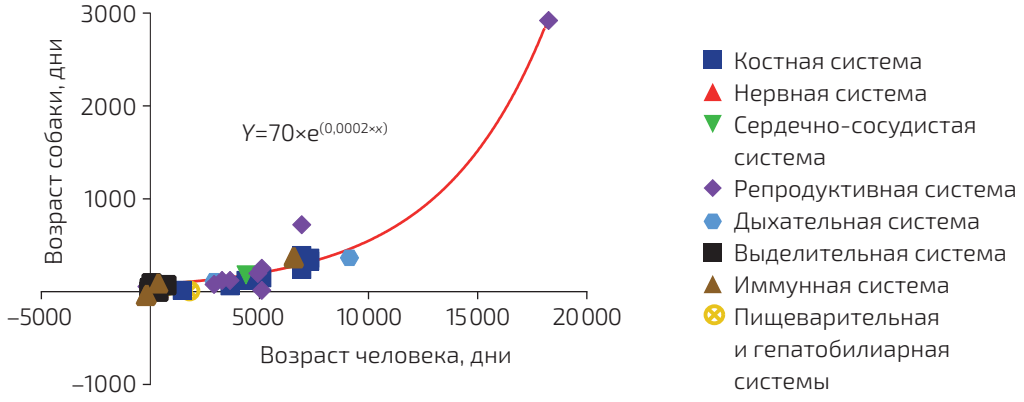


Рис. 22. График соотношения возраста собаки и человека

Таблица 20

Данные статистического анализа

Система	*n*	Коэффициент корреляции Спирмена	*p*
Костная	10	0,90	0,0008
Репродуктивная	10	0,67	0,03
Выделительная	6	0,29	0,6
Иммунная	5	0,97	0,033
Пищеварительная и гепатобилиарная	3	–0,5	0,9999

Примечание. n — количество событий, описанных в литературе для обоих видов. Красным цветом выделены статистически незначимые коэффициенты корреляции.

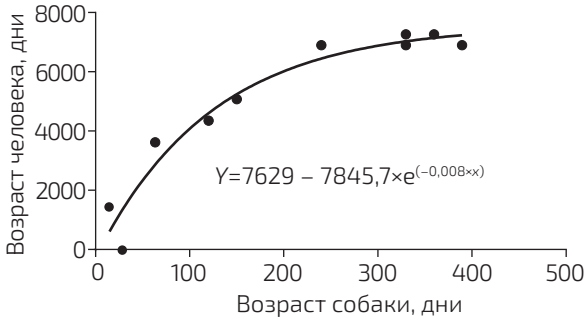


Рис. 23. Костная система

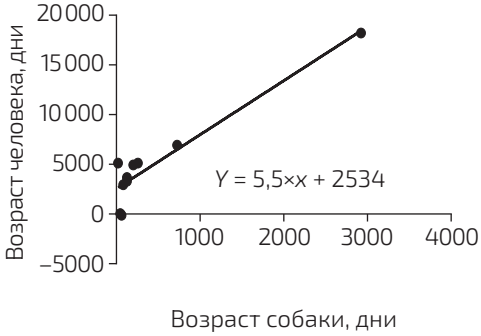


Рис. 24. Репродуктивная система

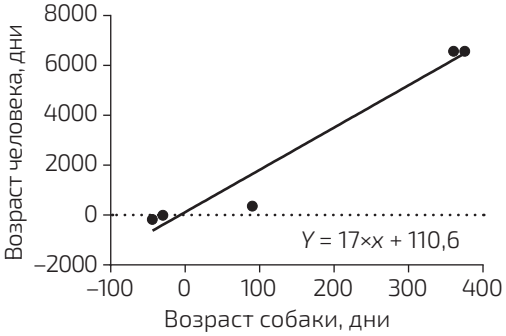


Рис. 25. Иммунная система

Таблица 21

Формулы для пересчета возраста человека на возраст собаки и обратно

Система	Формула пересчета	
	Человек → собака	**Собака → человек**
Общая	$Y=70\times e^{(0,0002\times X)}$	$X=5000\times \ln\frac{Y}{70}$
Костная	$X=-125\times \ln\frac{Y-7629}{-7845,7}$	$Y=7629-7845,7\times e^{(-0,008\times X)}$
Репродуктивная	$X=\frac{Y-2534}{5,5}$	$Y=5,5\times X+2534$
Иммунная	$X=\frac{Y-110,6}{17}$	$Y=17\times X+110,6$

Карликовая свинья

Собственные данные

На рисунке 26 представлено соотношение возрастов карликовой свиньи и человека, в табл. 22 — данные статистического анализа.

В табл. 23 приведены формулы для пересчета возраста с человека на карликовую свинью и обратно.

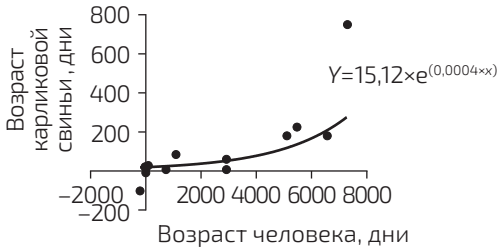


Рис. 26. График соотношения возраста карликовой свиньи и человека

Таблица 22

Данные статистического анализа

n	Коэффициент корреляции Спирмена	*p*
14	0,81	0,0008

Примечание. n — количество событий, описанных в литературе для обоих видов.

Таблица 23

Формулы для пересчета возраста человека на возраст карликовой свиньи и обратно

Система	Формула пересчета	
	Человек → карликовая свинья	Карликовая свинья → человек
Общая	$Y=15{,}12\times e^{(0{,}0004\times X)}$	$X=2500\times \ln\frac{Y}{15{,}12}$

Кошка

Данные литературы

Для домашних котов построена модель, учитывающая биологический возраст животных, с помощью которой проведен пересчет возраста домашнего кота и человека (табл. 24) (Cambridge R., 2017).

У кошек взрослый паттерн медленных волн головного мозга и фазы быстрого сна формируются к возрасту 40 дней (Villablanca J.R. и соавт., 2001).

В отношении коры головного мозга у кошек идентифицированы периоды созревания сосудов надсильвиевой извилины, взрослый паттерн достигается к возрасту 6 нед (Ben Hamida C. и соавт., 1983).

Собственные данные

На рисунке 27 представлено соотношение возрастов кошки и человека, в табл. 25 — данные статистического анализа.

Таблица 24

Соотношение возраста кошки и человека

Возраст кота, годы	Соответствующий возраст человека, годы
1	16,6364
2	23,2728
3	27,4092
4	31,5456
5	35,682
6	39,8184
7	43,9548
8	48,0912
9	52,2276
10	56,364

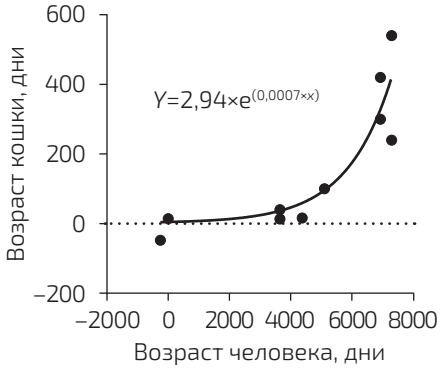


Рис. 27. График соотношения возраста кошки и человека

Таблица 25

Данные статистического анализа

n	Коэффициент корреляции Спирмена	*p*
10	0,91	0,0007

Примечание. n — количество событий, описанных в литературе для обоих видов.

Таблица 26

Формулы для пересчета возраста человека на возраст кошки и обратно

Система	Формула пересчета	
	Человек → кошка	Кошка → человек
Общая	$Y=2,94\times e^{(0,0007\times X)}$	$X=1428\times \ln\frac{Y}{2,94}$

В табл. 26 приведены формулы для пересчета возраста с человека на кошку и обратно.

Хорек

Данные литературы

Периоды онтогенетического развития хорька представлены в табл. 27 (Pollock C., 2007).

Следует отметить, что хорьки не являются широко используемым видом в исследованиях ювенильной токсичности. Вероятно, это обусловлено и тем фактом, что количество исторических справочных данных по онтогенетическому развитию органов и систем органов хорьков гораздо меньше по сравнению, например, с объемом справочных данных по грызунам.

При этом хорьки широко используются в исследованиях по моделированию различных заболеваний, в том числе при изучении влияния возраста на патогенез.

Так, на модели хорьков изучали зависимость от возраста метаболических нарушений при муковисцидозе. Диабет, связанный с муковисцидозом, у людей тесно связан с экзокринной недостаточностью поджелудочной железы, однако мало что известно о том, как эти два патологических процесса одновременно развиваются при муковисцидозе. На генетически модифицированных хорьках с муковисцидозом было показано, что в возрасте 1 мес у этих животных спонтанно развивается гипергликемия как результат воспаления поджелудочной железы, которому

Таблица 27

Параметры развития хорька

Параметр	Возраст
Достижение взрослого возраста	3–4 мес
Половое созревание	4–5 мес
Половая зрелость	6–12 мес
Продолжительность жизни	6–8 лет (максимально 10–12 лет)
Масса тела взрослого животного	0,6–1,2 кг (самцы крупнее самок, масса тела от 0,8 до 1,2 кг)
Продолжительность беременности	41–43 дня
Масса тела при рождении	6–12 г
Прекращение молочного вскармливания	6–8 нед
Открытие глаз и ушной раковины	32 и 24 дня

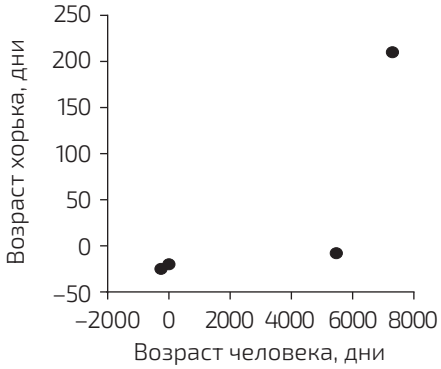


Рис. 28. График соотношения возраста хорька и человека

Таблица 28

Данные статистического анализа

n	Коэффициент корреляции Спирмена	*p*
4	1	0,08

Примечание. n — количество событий, описанных в литературе для обоих видов. Красным цветом выделены статистически незначимые коэффициенты корреляции.

предшествовали фиброз поджелудочной железы и снижение числа β-клеток. Удивительно, но через 2–3 мес происходит спонтанная нормализация уровня глюкозы с последующей промежуточной гипергликемией. Воспаление поджелудочной железы быстро уменьшалось после 2-месячного возраста, в этот период увеличивалось количество β-клеток. Заключается, что на этой модели активное экзокринное воспаление поджелудочной железы при муковисцидозе отрицательно влияет на β-клетки, но сопровождается возобновлением островков. Авторы предполагают, что очень молодые люди с муковисцидозом могут испытывать преходящий гликемический кризис с последующей адаптацией островков поджелудочной железы (Yi Y. и соавт., 2016).

Иллюстрацией того, как в зависимости от возраста может меняться чувствительность организма человека к воздействию, и насколько хорошо эта закономерность воспроизводится на лабораторных животных, может служить зависимая от возраста восприимчивость к вирусу SARS-CoV-2. Хотя распространенность серотипов SARS-CoV-2 у здоровых людей существенно не различается в разных возрастных группах, у людей в возрасте 65 лет и старше наблюдается более высокая смертность от COVID-19 по сравнению с более молодыми людьми. В исследованиях на хорьках три возрастные группы хорьков были инфицированы SARS-CoV-2. Вирус SARS-CoV-2 был выделен у всех хорьков независимо от возраста, но у старых хорьков (3 года и более) наблюдались более высокие вирусные нагрузки, более длительное назальное выделение вируса, а также выраженная воспалительная инфильтрация легких и более тяжелые клинические симптомы по сравнению с молодыми (6 мес и менее) и взрослыми животными (1–2 года) (Kim Y.I. и соавт., 2021).

Собственные данные

На рисунке 28 представлено соотношение возрастов кошки и человека, в табл. 28 — данные статистического анализа.

Нечеловекообразные приматы (НЧП)

Данные литературы

Одним из часто используемых в доклинических исследованиях видов НЧП являются яванские макаки (*Macaca fascicularis*). Яванские макаки также известны как длиннохвостые макаки или макаки-крабоеды (*M. Cynomolgus*, *M. irus*). В настоящее время в исследованиях в основном используются яванские макаки маврикийского и азиатского происхождения.

Хотя у яванских макак многие ключевые процессы и этапы постнатального развития сходны с таковыми у человека, эти животные рождаются более развитыми по сравнению с людьми в отношении некоторых систем органов, включая центральную нервную, скелетную, дыхательную и пищеварительную системы. У яванских макак большинство систем органов структурно и функционально достаточно развиты при рождении или развиваются в первые 3–6 мес после рождения. Однако процесс развития не ограничивается 6 мес, все системы органов продолжают функционально совершенствоваться до достижения зрелости. В целом, дыхательная, пищеварительная, выделительная и кроветворная системы достигают взрослых характеристик в возрасте 3 лет; женская репродуктивная, сердечно-сосудистая и гепатобилиарная системы — в возрасте 4 лет, а центральная нервная система, скелетная, иммунная, мужская репродуктивная и эндокринная системы — в возрасте 5–9 лет. Крайне важно учитывать сравнительную биологию и периоды развития органов между яванскими макаками и людьми при использовании этих животных в качестве модели в биомедицинских исследованиях (Li X. и соавт., 2023).

Средний возраст достижения зрелости систем органов у яванских макак представлен на рис. 29.

Центральная нервная система (ЦНС) у яванских макак более развита при рождении, чем у человека, однако активное развитие продолжается до 3–4 лет. Некоторые сложные нейрональные связи или функции могут формироваться до возраста 5 лет и старше. В целом, тактильные, слуховые и зрительные системы макак более развиты при рождении, чем у людей (Li X. и соавт., 2023).

Эндокринная система органов развивается у яванских макак и человека сходным образом, морфологически и функционально эндокринные органы хорошо развиты еще до рождения. Активное развитие завершается через 3 мес после рождения, но продолжение роста и совершенствование может происходить медленно, до 5–6 лет (Li X. и соавт., 2023).

Развитие репродуктивной системы у яванских макак сходно с таковым человека. Различные факторы окружающей среды могут влиять на развитие и функционирование системы репродуктивных органов, например, питание и социальное взаимодействие (Li X. и соавт., 2023).

Половое созревание яванских макак происходит к возрасту 3,3–4,1 года для самок и 5,5 года для маврикийских самцов или 6,7 года для азиатских самцов. Однако в зависимости от генетического происхождения и окружающей среды возраст полового созревания может различаться. Самцы маврикийского происхождения

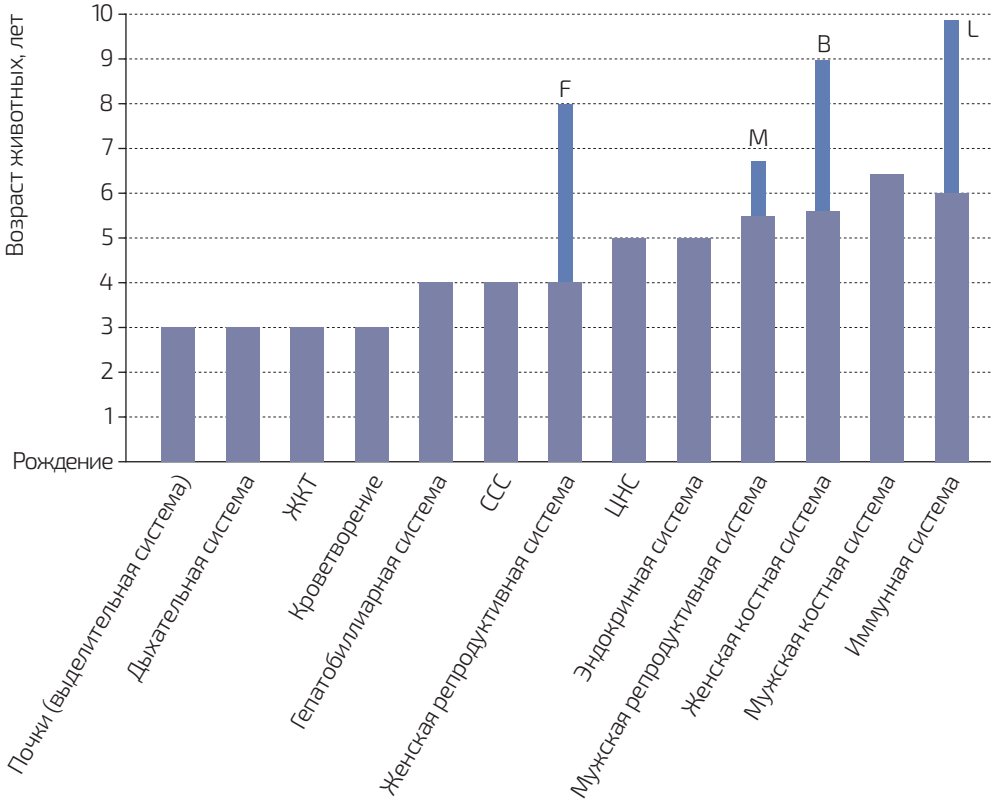


Рис. 29. Средний возраст достижения зрелости систем органов у яванских макак: самки (F) обычно считаются половозрелыми в возрасте 3–4 лет, однако репродуктивная функция достигает пика в возрасте 8–20 лет; самцы (M) маврикийских яванских макак достигают взрослых характеристик почти на 2 года раньше, чем азиатские яванские макаки; B — плотность костной ткани в телах позвонков самок достигает пика в возрасте 9 лет; L — возрастные изменения в определенных соотношениях и фенотипах субпопуляций лимфоцитов могут длиться до 9–10 лет (Li X. и соавт., 2023)

становятся половозрелыми почти на 2 года раньше (в среднем в 4,6 года), чем самцы азиатского происхождения (в среднем в 6,5 года) (Li X. и соавт., 2023).

Основные периоды онтогенеза яванских макак представлены в табл. 29.

Собственные данные

На рисунке 30 представлено соотношение возрастов НЧП и человека, в табл. 30 — данные статистического анализа.

Графики для оценки соотношения возраста НЧП и человека при развитии различных систем органов представлены на рис. 31–35.

В табл. 31 приведены формулы для пересчета возраста с человека на НЧП и обратно.

Основные этапы развития

Система органов	Основные изменения
Сердечно-сосудистая	Критичные физиологические изменения при рождении (формирование сосудистого сопротивления). Адаптивные изменения миокарда и сосудов. Увеличение количества кардиомиоцитов до возраста 3 мес, затем быстрый рост
Эндокринная	Большинство желез хорошо развиты при рождении, необходимы для роста и развития. Ретикулярная зона коры надпочечников развивается в период от 3 до 6 мес (адренархе). Эндокринная функция половых желез развивается в период полового созревания
Зрительная (глаза)	Глаза морфологически хорошо развиты при рождении, открыты при рождении. Постнатальное развитие хрусталика и центральной ямки
Пищеварительная	Функционально развита при рождении, развитие сравнимо с постнатальным развитием ЖКТ человека. Постнатально начинает вырабатываться соляная кислота, устанавливается микробиота, моторика. Адаптивные изменения пищеварительной/транспортной функции, микробиома происходят к моменту отъема для адаптации к новому рациону
Гепатобилиарная	Структурно хорошо развита при рождении. Быстрое развитие функции метаболизма особенно в первые 3–6 мес
Иммунная	После рождения экспансия иммунных тканей. Быстрое формирование вторичных иммунных тканей и развитие иммунной памяти как функции времени и окружающей среды
Покровная	Функциональная (барьерная функция, водная регуляция, терморегуляция, проводимость, чувствительность) при рождении, есть шерстный покров

Таблица 29

систем органов у яванских макак

Новорожденный (менее 1 мес)	1-я твердая пища (~ 3 мес)	Отъем (~ 6 мес)	Половое созревание (~3–4 лет)	Взрослый (~ 4 лет)

Система органов	Основные изменения
Нервная	Определенное последовательное и быстрое развитие до взрослого возраста. Постнатальный апоптоз, прунинг и миграция происходят наиболее интенсивно до момента отъема. Миелин и глия есть при рождении, дальнейшее развитие происходит постнатально. Нейротрансмиттерные и проводящие пути созревают с разной скоростью (в том числе формирование ГАМК, дофаминовой, серотониновой, норадреналиновой систем отличается по скорости развития)
Дыхательная	Структурно развита при рождении, быстрый рост постнатально
Выделительная	Нефрогенез завершен при рождении. Быстрое увеличение скорости клубочковой фильтрации и выделительной функции в первые 6 мес
Репродуктивная	Семенники опускаются при рождении, содержат половые клетки, клетки Сертоли, клетки Лейдига. Развитие фолликулов и атрезия фолликулов начинаются в возрасте 3–6 мес. Последующие изменения репродуктивной системы (менархе и спермархе) происходят в начале полового созревания, изменения продолжаются до раннего взрослого периода
Скелет	Новорожденные способны цепляться за мать с самого рождения. Пластинки роста есть при рождении. Наиболее быстрый рост происходит до отъема, затем рост становится более медленным до тех пор, пока пластинки роста не закроются во взрослом состоянии

Окончание таблица 29

Новорожденный (менее 1 мес)	1-я твердая пища (~ 3 мес)	Отъем (~ 6 мес)	Половое созревание (~3–4 лет)	Взрослый (~ 4 лет)

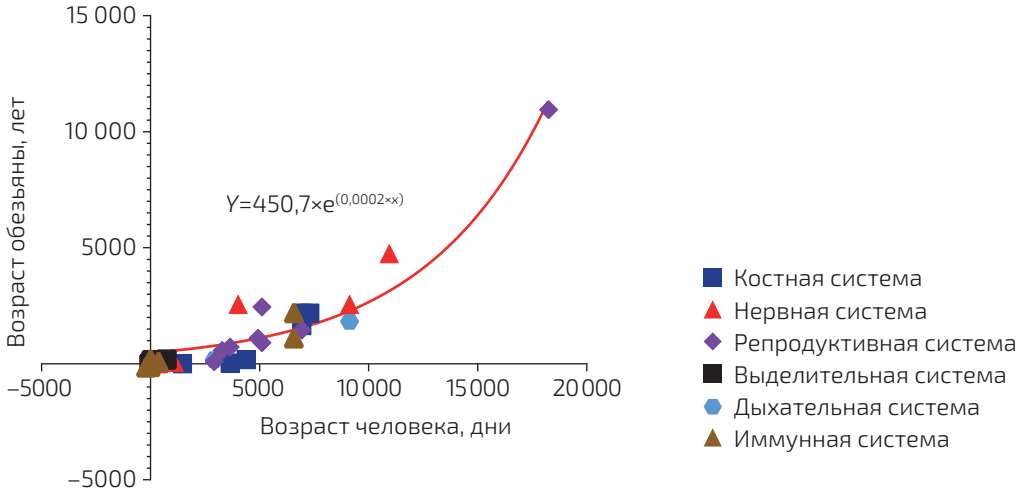


Рис. 30. График соотношения возраста НЧП и человека

Таблица 30

Данные статистического анализа

Система	*n*	Коэффициент корреляции Спирмена	*p*
Костная	8	0,95	0,0012
Нервная	8	0,82	0,0155
Репродуктивная	8	0,92	0,0025
Выделительная	7	0,81	0,04
Иммунная	7	0,93	0,008

Примечание. n — количество событий, описанных в литературе для обоих видов.

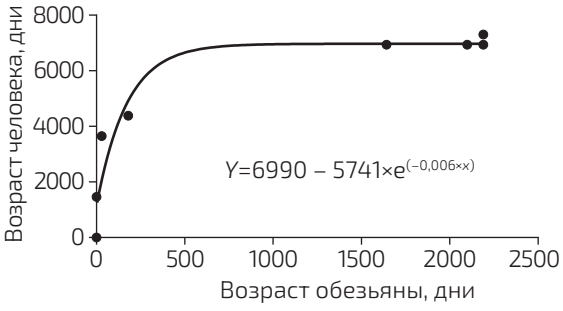


Рис. 31. Костная система

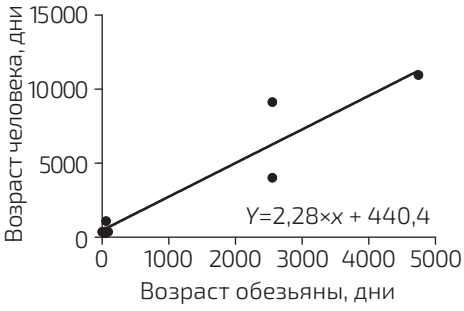


Рис. 32. Нервная система

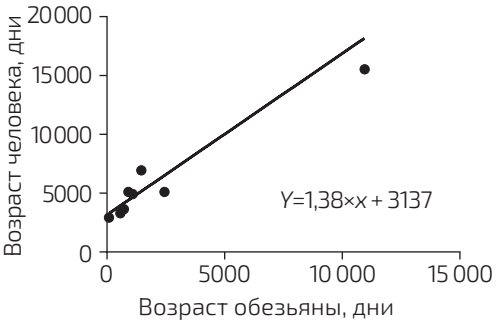


Рис. 33. Репродуктивная система

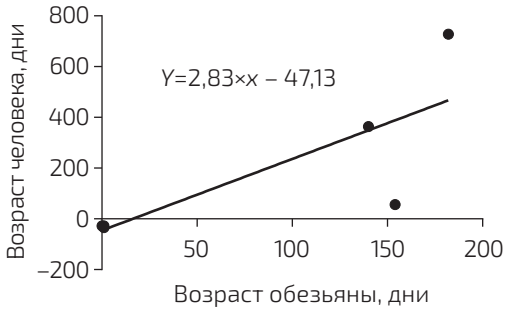


Рис. 34. Выделительная система

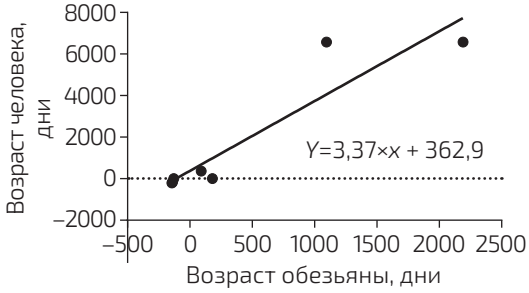


Рис. 35. Иммунная система

Таблица 31

Формулы для пересчета возраста человека на возраст НЧП и обратно

Система	Формула пересчета	
	Человек → обезьяна	Обезьяна → человек
Общая	$Y=450{,}7\times e^{(0{,}0002\times X)}$	$X=5000\times\ln\frac{Y}{450{,}7}$
Костная	$X=-1666\times\ln\frac{Y-6990}{-5741}$	$Y=6990-5741\times e^{(-0{,}006\times X)}$
Нервная	$X=\frac{Y-440{,}4}{2{,}3}$	$Y=2{,}3\times X+440{,}4$
Репродуктивная	$X=\frac{Y-3137}{1{,}4}$	$Y=1{,}4\times X+3137$
Выделительная	$X=\frac{Y+47{,}13}{2{,}83}$	$Y=2{,}83\times X+47{,}13$
Иммунная	$X=\frac{Y-362{,}9}{3{,}4}$	$Y=3{,}4\times X+326{,}9$

Обсуждение

Авторы считают, что подход дифференцированного определения возраста по исследуемым в доклиническом испытании системам является более точным и позволит создавать более правильные доклинические модели, отражающие особенности развития как животного организма, так и человека. Полученные в результатах работы формулы и цифры на настоящий момент можно считать предварительными. Наибольшую предсказательную силу и точность формул для расчета можно будет получить путем сбора и накопления сведений. В связи с этим авторы будут очень благодарны за любую помощь в увеличении и обновлении полученной на данный момент базы данных.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adelman R.D., Wright J. Systolic blood pressure and heart rate in the growing beagle puppy // Dev. Pharmacol. Ther. 1985. Vol. 8. N. 6. P. 396–401. DOI: 10.1159/000457064.
2. Akahori M., Takatori A., Kawamura S. et al. No regional differences of cytochrome P450 expression in the liver of Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) // Exp. Anim. 2005. Vol. 54. N. 2. P. 131–136. DOI: 10.1538/expanim.54.131.
3. Alcorn J., McNamara P.J. Ontogeny of hepatic and renal systemic clearance pathways in infants: part II // Clin. Pharmacokinet. 2002. Vol. 41. P. 1077–1094. DOI: 10.2165/00003088-200241120-00003.
4. Alexander B., Guzail M.A., Foster C.S. Morphological changes during hepatocellular maturity in neonatal rats // Anat. Rec. 1997. Vol. 248. N. 1. P. 104–109. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0185(199705)248:1<104::AID-AR12>3.0.CO;2-T.
5. Andersen A.C., Floyd M. Growth and development of the femur in the Beagle // Am. J. Vet. Res. 1963. Vol. 24. P. 348–351.
6. Archer O., Papermaster B., Robert R. Thymectomy in rabbit and mouse: consideration of time of lymphoid peripheralization. In book: The Thymus in Immunobiology: Structure, Function, and Role in Disease / Ed. by R.A. Good, A.E. Gabrielsen. Hoeber Medical Division. Harper & Row, 1964. P. 414–435.
7. Archer O.K., Sutherland D.E., Good R.A. Appendix of the rabbit: a homologue of the bursa in the chicken? // Nature. 1963. Vol. 26. N. 200. P. 337–339. DOI: 10.1038/200337a0.
8. Archer O.K., Sutherland D.E., Good R.A. The developmental biology of lymphoid tissue in the rabbit. Consideration of the role of thymus and appendix // Lab. Invest. 1964. Vol. 13. P. 259–271.
9. Bailey G.P., Marien D. The value of juvenile animal studies “What have we learned from preclinical juvenile toxicity studies? II” // Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol. 2011. Vol. 92. N. 4. P. 273–291. DOI: 10.1002/bdrb.20328.
10. Barrow P.C., Schmitt G. Juvenile Nonclinical Safety Studies in Support of Pediatric Drug Development // Methods Mol. Biol. 2017. Vol. 1641. P. 25–67. DOI: 10.1007/978-1-4939-7172-5_2.
11. Bartelink I.H., Rademaker C.M., Schobben A.F. et al. Guidelines on paediatric dosing on the basis of developmental physiology and pharmacokinetic conside-

rations // Clin. Pharmacokinet. 2006. Vol. 45. P. 1077–1097. DOI: 10.2165/00003088-200645110-00003.
12. Batchelder C.A., Duru N., Lee C.I. et al. Myeloid-lymphoid ontogeny in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) // Anat. Rec. (Hoboken). 2014. Vol. 297. N. 8. P. 1392–1406. DOI: 10.1002/ar.22943.
13. Bauer H.C., Bauer H. Neural induction of the blood-brain barrier: still an enigma // Cell Mol. Neurobiol. 2000. Vol. 20. N. 1. P. 13–28. DOI: 10.1023/a:1006939825857.
14. Beatty D. Osteogenesis in the golden hamster. A Thesis submitted to Oregon State Colledge in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science. June 1949.
15. Ben Hamida C., Bisconte J.C., Margules S. Postnatal maturation of the vascularisation of the suprasylvian gyrus of the cat // J. Anat. 1983. Vol. 137. N. Pt 2. P. 371–385.
16. Berman W.Jr., Musselman J. Myocardial performance in the newborn lamb // Am. J. Physiol. 1979. Vol. 237. N. 1. P. H66–H70. DOI: 10.1152/ajpheart.1979.237.1.H66.
17. Bernstein J. Morphologic development and anatomy. In book: The kidneys and urinary tract / Ed. By A.M. Rudolph. Rudolph's pediatrics. Norwalk, CT: Appleton & Lange, 1991. P. 1223–1224.
18. Bhat R., Chari G., Meller J. et al. Ramarao S., Vidyasagar D. Bile flow and composition in preterm, term and infant baboons // Biol. Neonate. 1997. Vol. 72. N. 4. P. 235–242. DOI: 10.1159/000244489.
19. Bodey B., Bodey B.Jr., Siegel S.E. et al. Involution of the mammalian thymus, one of the leading regulators of aging // In Vivo. 1997. Vol. 11. N. 5. P. 421–440.
20. Boyden E.A., Tompsett D.H. The postnatal growth of the lung in the dog // Acta Anat (Basel). 1961. Vol. 47. P. 185–215. DOI: 10.1159/000141809.
21. Bristol J.B., Williamson R.C. Large bowel growth // Scand. J. Gastroenterol Suppl. 1984. Vol. 93. P. 25–34.
22. Buddington R.K. Nutrition and ontogenetic development of the intestine // Can J. Physiol. Pharmacol. 1994. Vol. 72. N. 3. P. 251–259. DOI: 10.1139/y94-039.
23. Buddington R.K. Postnatal changes in bacterial populations in the gastrointestinal tract of dogs // Am. J. Vet. Res. 2003. Vol. 64. N. 5. P. 646–651. DOI: 10.2460/ajvr.2003.64.646.
24. Buse E. Development of the immune system in the cynomolgus monkey: the appropriate model in human targeted toxicology? // J. Immunotoxicol. 2005. Vol. 2. N. 4. P. 211–216. DOI: 10.1080/15476910500362937.
25. Buse E., Habermann G., Vogel F. Thymus development in *Macaca fascicularis* (Cynomolgus monkey): an approach for toxicology and embryology // J. Mol. Histol. 2006. Vol. 37. N. 3–4. P. 161–170. DOI: 10.1007/s10735-006-9057-2.
26. Buse E., Zoller M., van Esch E. The macaque ovary, with special reference to the cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) // Toxicol. Pathol. 2008. Vol. 36. P. 24S–66S. DOI: 10.1177/0192623308327407.
27. Cambridge R. Modeling the Age Difference between Humans and Felis catus Biological Cat Age: The Actual Age of a Cat // J. Anim. Res. Nutr. 2017. Vol. 2. N. 2. P. 14. DOI: 10.21767/2572-5459.100034.
28. Carlile A.E., Beck F. Maturation of the ileal epithelium in the young rat // J. Anat. 1983. Vol. 137. N. Pt 2. P. 357–369.

29. Chastant-Maillard S., Freyburger L., Marcheteau E. et al. Timing of the intestinal barrier closure in puppies // Reprod. Domest. Anim. 2012. Vol. 47. N. Suppl 6. P. 190–193. DOI: 10.1111/rda.12008.
30. Cheung C.C., Thornton J.E., Kuijper J.L. et al. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat // Endocrinology. 1997. Vol. 138. N. 2. P. 855–858. DOI: 10.1210/endo.138.2.5054.
31. Chiang S.Y., Wu H.C., Lin S.Y., et al. Usp11 controls cortical neurogenesis and neuronal migration through Sox11 stabilization // Sci. Adv. 2021. Vol. 12. N. 7. P. eabc6093. DOI: 10.1126/sciadv.abc6093.
32. Clancy B., Finlay B.L., Darlington R.B. et al. Extrapolating brain development from experimental species to humans // Neurotoxicology. 2007. Vol. 28. N. 5. P. 931–937. DOI: 10.1016/j.neuro.2007.01.014.
33. Cline J.M., Wood C.E. The Mammary Glands of Macaques // Toxicol. Pathol. 2008. Vol. 36. N. 7. P. 134s–141s. DOI: 10.1177/0192623308327411.
34. Colony P.C., Kois J.M., Peiffer L.P. Structural and enzymatic changes during colonic maturation in the fetal and suckling rat // Gastroenterology. 1989. Vol. 97. N. 2. P. 338–347. DOI: 10.1016/0016-5085(89)90069-3.
35. Conrad M.S., Dilger R.N., Johnson R.W. Brain growth of the domestic pig (*Sus scrofa*) from 2 to 24 weeks of age: a longitudinal MRI study // Dev. Neurosci. 2012. Vol. 34. N. 4. P. 291–298. DOI: 10.1159/000339311.
36. Cooper M.D., Perey D.Y., Gabrielsen A.E. et al. Production of an antibody deficiency syndrome in rabbits by neonatal removal of organized intestinal lymphoid tissues // Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 1968. Vol. 33. N. 1. P. 65–88. DOI: 10.1159/000229975.
37. Dawes G.S., Johnston B.M., Walker D.W. Relationship of arterial pressure and heart rate in fetal, new-born and adult sheep // J. Physiol. 1980. Vol. 309. P. 405–417. DOI: 10.1113/jphysiol.1980.sp013516.
38. Dawson A.B. The age order of epiphyseal union in the long bones of the albino rat // Anat. Rec. 1925. Vol. 31. P. 1–17. DOI: 10.1002/ar.1090310102.
39. Day M.J. Immune system development in the dog and cat // J. Comp. Pathol. 2007. Vol. 137. Suppl 1. P. S10–S15. DOI: 10.1016/j.jcpa.2007.04.005.
40. Dehorter N., Del Pino I. Shifting Developmental Trajectories During Critical Periods of Brain Formation // Front. Cell Neurosci. 2020. Vol. 10. N. 14. P. 283. DOI: 10.3389/fncel.2020.00283.
41. Deren J.S. Development of structure and function in the fetal and newborn stomach // Am. J. Clin. Nutr. 1971. Vol. 24. N. 1. P. 144–159. DOI: 10.1093/ajcn/24.1.144.
42. Dobbing J., Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt // Early Hum. Dev. 1979. Vol. 3. P. 79–83. DOI: 10.1016/0378-3782(79)90022-7.
43. Dutta S., Joshi K.R., Sengupta P., Bhattacharya K. Unilateral and bilateral cryptorchidism and its effect on the testicular morphology, histology, accessory sex organs, and sperm count in laboratory mice // J. Hum. Reprod. Sci. 2013. Vol. 6. N. 2. P. 106–110. DOI: 10.4103/0974-1208.117172.
44. Dutta S., Sengupta P. Age of Laboratory Hamster and Human: Drawing the Connexion // Biomedical and Pharmacology Journal. 2019. Vol. 12. N. 1. P. 49–56. DOI: 10.13005/bpj/1612.

45. Dutta S., Sengupta P. Men and mice: Relating their ages // Life Sci. 2016. Vol. 152. P. 244–248. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.10.025.
46. Dutta S., Sengupta P. Rabbits and men: relating their ages // J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol. 2018. Vol. 29. N. 5. P. 427–435. DOI: 10.1515/jbcpp-2018-0002.
47. Emmen J. Testicular factors involved in testis descent. 2000, June 14. http://hdl.handle.net/1765/20988 (дата обращения: 08.2024).
48. Evan A.P. Jr., Stoeckel J.A., Loemker V. et al. Development of the intrarenal vascular system of the puppy kidney // Anat. Rec. 1979. Vol. 194. N. 2. P. 187–199. DOI: 10.1002/ar.1091940202.
49. Faqi A.S. Juvenile Toxicity Testing to Support Clinical Trials in Pediatric Population. In book: A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development, Second Edition. Elsevier Inc, 2017. P. 263–272. DOI: 10.1016/B978-0-12-803620-4.00011-6.
50. Felsburg P.J. Overview of immune system development in the dog: comparison with humans // Hum. Exp. Toxicol. 2002. Vol. 21. N. 9–10. P. 487–492. DOI: 10.1191/0960327102ht286oa.
51. Fouser L., Avner E.D. Normal and abnormal nephrogenesis // Am. J. Kidney Dis. 1993. Vol. 21. N. 1. P. 64–70. DOI: 10.1016/s0272-6386(12)80723-2.
52. Frazier K.S. Species Differences in Renal Development and Associated Developmental Nephrotoxicity // Birth Defects Res. 2017. Vol. 109. N. 16. P. 1243–1256. DOI: 10.1002/bdr2.1088.
53. Fujimoto K., Terao K., Cho F. et al. Age-related immunoglobulin levels in cynomolgus monkeys // Jpn. J. Med. Sci. Biol. 1982. Vol. 35. N. 1. P. 17–23. DOI: 10.7883/yoken1952.35.17.
54. Fujiwara S., Armstrong R.M., Cinader B. Age and organ dependent variations in the number of thymus derived RTLA bearing cells // Immunol. Commun. 1974. Vol. 3. N. 3. P. 275–284. DOI: 10.3109/08820137409057324.
55. Fukuda S., Cho F., Honjo S. Bone growth aud development of secondary ossification centers of extremities in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) // Jikken Dobutsu. 1978. Vol. 27. N. 4. P. 387–397. DOI: 10.1538/expanim1978.27.4_387.
56. Fukuda S., Matsuoka O. Maturation process of secondary ossification centers in the rat and assessment of bone age // Jikken Dobutsu. 1979. Vol. 28. N. 1. P. 1–9. DOI: 10.1538/expanim1978.28.1_1.
57. Fukuda S., Matsuoka O. Comparative studies on maturation process of secondary ossification centers of long bones in the mouse, rat, dog and monkey // Jikken Dobutsu. 1980. Vol. 29. N. 3. P. 317–326. DOI: 10.1538/expanim1978.29.3_317.
58. Fukuda S., Matsuoka O. Radiographic studies on maturation process of secondary ossification centers in long bones of the Japanese white rabbit // Jikken Dobutsu. 1981. Vol. 30. N. 4. P. 497–501. DOI: 10.1538/expanim1978.30.4_497.
59. Geifman N., Rubin E. The mouse age phenome knowledgebase and disease-specific inter-species age mapping // PLoS One. 2013. Vol. 8. N. 12. P. e81114. DOI: 10.1371/journal.pone.0081114.
60. Geiger M., Gendron K., Willmitzer F. et al. Unaltered sequence of dental, skeletal, and sexual maturity in domestic dogs compared to the wolf // Zoological Lett. 2016. Vol. 2. N. 1. P. 16. DOI: 10.1186/s40851-016-0055-2.

61. Gilardi C., Kalebic N. The Ferret as a Model System for Neocortex Development and Evolution // Front. Cell Dev. Biol. 2021. Vol. 29. N. 9. P. 661759. DOI: 10.3389/fcell.2021.661759.
62. Goldsmith D.I., Jodorkovsky R.A., Sherwinter J. et al. Glomerular capillary permeability in developing canines // Am. J. Physiol. 1986. Vol. 251. N. 3 Pt 2. P. F528–F531. DOI: 10.1152/ajprenal.1986.251.3.F528.
63. Goldman J.M., Laws S.C., Balchak S.K. et al. Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations // Crit. Rev. Toxicol. 2000. Vol. 30. N. 2. P. 135–196. DOI: 10.1080/10408440091159185.
64. Goldman J.M., Murr A.S., Cooper R.L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies // Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol. 2007. Vol. 80. N. 2. P. 84–97. DOI: 10.1002/bdrb.20106.
65. Golub R., Cumano A. Embryonic hematopoiesis // Blood Cells Mol. Dis. 2013. Vol. 51. N. 4. P. 226–231. DOI: 10.1016/j.bcmd.2013.08.004.
66. Gomez R.A., Norwood V.F. Recent advances in renal development // Curr. Opin. Pediatr. 1999. Vol. 11. N. 2. P. 135–140. DOI: 10.1097/00008480-199904000-00007.
67. Gomez R.A., Sequeira Lopez M.L., Fernandez L. et al. The maturing kidney: development and susceptibility // Ren. Fail. 1999. Vol. 21. N. 3–4. P. 283–291. DOI: 10.3109/08860229909085090.
68. Grumbach M.M. The neuroendocrinology of human puberty revisited // Horm. Res. 2002. Vol. 57. Suppl 2. P. 2–14. DOI: 10.1159/000058094.
69. Gustafsson B.E. The physiological importance of the colonic microflora // Scand. J. Gastroenterol. Suppl. 1982. Vol. 77. P. 117–131.
70. Guthrie S., Plummer J.M., Vaughan L.C. Post natal development of the canine elbow joint: a light and electron microscopical study // Res. Vet. Sci. 1992. Vol. 52. N. 1. P. 67–71. DOI: 10.1016/0034-5288(92)90060-f.
71. Haberny K.A., Paule M.G., Scallet A.C. et al. Ontogeny of the N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor system and susceptibility to neurotoxicity // Toxicol. Sci. 2002. Vol. 68. P. 9–17. DOI: 10.1093/toxsci/68.1.9.
72. Hall R.A., Widdowson E.M. Response of the organs of rabbits to feeding during the first days after birth // Biol. Neonate. 1979. Vol. 35. N. 3–4. P. 131–139. DOI: 10.1159/000241164.
73. Hammelrath L., Škokić S., Khmelinskii A. et al. Morphological maturation of the mouse brain: An *in vivo* MRI and histology investigation // Neuroimage. 2016. Vol. 15(125). P. 144–152. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2015.10.009.
74. Harada E., Kiriyama H., Kobayashi E. et al. Postnatal development of biliary and pancreatic exocrine secretion in piglets // Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol. 1988. Vol. 91. N. 1. P. 43–51. DOI: 10.1016/0300-9629(88)91590-3.
75. Hare W.C. Radiographic anatomy of the canine pectoral limb. II. Developing limb // J. Am. Vet. Med. Assoc. 1959. Vol. 15(135). P. 305–310.
76. Hare W.C. The ages at which the centers of ossification appear roentgenographically in the limb bones of the dog // Am. J. Vet. Res. 1961. Vol. 22. P. 825–835.
77. Hayward A.R., Simons M.A., Lawton A.R. et al. Pre-B and B cells in rabbits. Ontogeny and allelic exclusion of kappa light chain genes // J. Exp. Med. 1978. Vol. 148. N. 5. P. 1367–1377. DOI: 10.1084/jem.148.5.1367.

78. Heikel H.V. On ossification and growth of certain bones of the rabbit; with a comparison of the skeletal age in the rabbit and in man // Acta Orthop. Scand. 1960. Vol. 29. P. 171–184. DOI: 10.3109/17453675908988796.
79. Henning S.J. Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism // Am. J. Physiol. 1981. Vol. 241. N. 3. P. G199–G214. DOI: 10.1152/ajpgi.1981.241.3.G199.
80. Hew K.W., Keller K.A. Postnatal anatomical and functional development of the heart: a species comparison // Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol. 2003. Vol. 68. N. 4. P. 309–320. DOI: 10.1002/bdrb.10034.
81. Heyns C.F., de Klerk D.P. The gubernaculum during testicular descent in the pig fetus // J. Urol. 1985. Vol. 133. N. 4. P. 694–699. DOI: 10.1016/s0022-5347(17)49163-4.
82. Hisano N. Postnatal development of vagina, clitoris and urethral glands of the golden hamster // Acta Anat. (Basel). 1977. Vol. 97. N. 4. P. 371–378. DOI: 10.1159/000144756.
83. Hislop A., Howard S., Fairweather D.V. Morphometric studies on the structural development of the lung in *Macaca fascicularis* during fetal and postnatal life // J. Anat. 1984. Vol. 138. N. Pt 1. P. 95–112.
84. Hoerter J., Mazet F., Vassort G. Perinatal growth of the rabbit cardiac cell: possible implications for the mechanism of relaxation // J. Mol. Cell Cardiol. 1981. Vol. 13. N. 8. P. 725–740. DOI: 10.1016/0022-2828(81)90255-8.
85. Holdsworth S.R., Glasgow E.F., Atkins R.C. et al. Cell characteristics of cultured glomeruli from different animal species // Nephron. 1978. Vol. 22. N. 4–6. P. 454–459. DOI: 10.1159/000181513.
86. Holsapple M.P., West L.J., Landreth K.S. Species comparison of anatomical and functional immune system development // Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol. 2003. Vol. 68. N. 4. P. 321–334. DOI: 10.1002/bdrb.10035.
87. Horster M. Nephron function and perinatal homeostasis // Ann. Rech. Vet. 1977. Vol. 8. N. 4. P. 468–482.
88. Horton J.A., Bariteau J.T., Loomis R.M. et al. Ontogeny of skeletal maturation in the juvenile rat // Anat. Rec. (Hoboken). 2008. Vol. 291. N. 3. P. 283–292. DOI: 10.1002/ar.20650.
89. Hoshi H., Horie K., Tanaka K. et al. Patterns of age-dependent changes in the numbers of lymph follicles and germinal centres in somatic and mesenteric lymph nodes in growing C57Bl/6 mice // J. Anat. 2001. Vol. 198. N. Pt 2. P. 189–205. DOI: 10.1046/j.1469-7580.2001.19820189.x.
90. Hostetler J.R., Ackerman G.A. Lymphopoiesis and lymph node histogenesis in the embryonic and neonatal rabbit // Am. J. Anat. 1969. Vol. 124. N. 1. P. 57–75. DOI: 10.1002/aja.1001240105.
91. Howard E. DNA content of rodent brains during maturation and aging, and autoradiography of postnatal DNA synthesis in monkey brain // Prog. Brain Res. 1973. Vol. 40. N. 0. P. 91–114. DOI: 10.1016/S0079-6123(08)60681-0.
92. Hussain N., Clive J., Bhandari V. Current incidence of retinopathy of prematurity, 1989–1997 // Pediatrics. 1999. Vol. 104. N. 3. P. e26. DOI: 10.1542/peds.104.3.e26.
93. Huttenlocher P.R., Dabholkar A.S. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex // J. Comp. Neurol. 1997. Vol. 387. N. 2. P. 167–178. DOI: 10.1002/(sici)1096-9861(19971020)387:2<167::aid-cne1>3.0.co;2-z.

94. Inui A., Itamoto K., Takuma T. et al. Age-related changes of bone mineral density and microarchitecture in miniature pigs // J. Vet. Med. Sci. 2004. Vol. 66. N. 6. P. 599–609. DOI: 10.1292/jvms.66.599.
95. Ishizaka T., Yoshimatsu Y., Ozawa M, et al. Age-related differences of QT interval and autonomic nervous system activity in female cynomolgus monkeys. Comparative study // J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 2009. Vol. 60. N. 3. P. 288–295. DOI: 10.1016/j.vascn.2009.06.003.
96. Jarkovská D., Janatová T., Hruda J. et al. The physiological closure of ductus arteriosus in the rat. An ultrastructural study // Anat. Embryol. (Berl). 1989. Vol. 180. N. 5. P. 497–504. DOI: 10.1007/BF00305125.
97. Jasper P.J., Zhai S.K., Kalis S.L. et al. B lymphocyte development in rabbit: progenitor B cells and waning of B lymphopoiesis // J. Immunol. 2003. Vol. 171. N. 12. P. 6372–6380. DOI: 10.4049/jimmunol.171.12.6372.
98. Jeklova E., Leva L., Faldyna M. Lymphoid organ development in rabbits: major lymphocyte subsets // Dev. Comp. Immunol. 2007. Vol. 31. N. 6. P. 632–644. DOI: 10.1016/j.dci.2006.10.002.
99. Jensen M.S., Jensen S.K., Jakobsen K. Development of digestive enzymes in pigs with emphasis on lipolytic activity in the stomach and pancreas // J. Anim. Sci. 1997. Vol. 75. N. 2. P. 437–445. DOI: 10.2527/1997.752437x.
100. Johnson M.H. Functional brain development in humans // Nat. Rev. Neurosci. 2001. Vol. 2. N. 7. P. 475–483. DOI: 10.1038/35081509.
101. Jones M.R., Lingampally A., Wu J. et al. Evidence for Overlapping and Distinct Biological Activities and Transcriptional Targets Triggered by Fibroblast Growth Factor Receptor 2b Signaling between Mid- and Early Pseudoglandular Stages of Mouse Lung Development // Cells. 2020. Vol. 9. N. 5. P. 1274. DOI: 10.3390/cells9051274.
102. Kavlock R.J., Gray J.A. Evaluation of renal function in neonatal rats // Biol. Neonate. 1982. Vol. 41. N. 5–6. P. 279–288. DOI: 10.1159/000241563.
103. Kawabata I., Homma T., Tabe H. et al. Apoptosis of germinal centers in postnatal development of rabbit tonsil // Acta Otolaryngol. Suppl. 1996. Vol. 523. P. 60–63.
104. Kember N.F. Comparative patterns of cell division in epiphyseal cartilage plates in the rat // J. Anat. 1972. Vol. 111. N. Pt 1. P. 137–142.
105. Kerr G.R., Couture J., Allen J.R. Growth and development of the fetal Rhesus monkey. VI. Morphometric analysis of the developing lung // Growth. 1975. Vol. 39. N. 1. P. 67–84.
106. Kim Y.I., Yu K.M., Koh J.Y. et al. Age-dependent pathogenic characteristics of SARS-CoV-2 infection in ferrets // Nat. Commun. 2022. Vol. 13. N. 1. P. 21. DOI: 10.1038/s41467-021-27717-3.
107. Kleinman L.I. Developmental renal physiology // Physiologist. 1982. Vol. 25. N. 2. P. 104–110.
108. Knight K.L., Crane M.A. Generating the antibody repertoire in rabbit // Adv. Immunol. 1994. Vol. 56. P. 179–218. DOI: 10.1016/s0065-2776(08)60452-6.
109. Koyanagi T., Nakanishi Y., Murayama N. et al. Age-related changes of hepatic clearances of cytochrome P450 probes, midazolam and *R-/S*-warfarin in combination with caffeine, omeprazole and metoprolol in cynomolgus monkeys using *in vitro–in vivo* correlation // Xenobiotica. 2015. Vol. 45. N. 4. P. 312–321. DOI: 10.3109/00498254.2014.979271.

110. Kuper C.F., van Bilsen J., Cnossen H., et al. Development of immune organs and functioning in humans and test animals: Implications for immune intervention studies // Reprod. Toxicol. 2016. Vol. 64. P. 180–190. DOI: 10.1016/j.reprotox.2016.06.002.
111. Ladics G.S., Smith C., Bunn T.L. et al. Characterization of an approach to developmental immunotoxicology assessment in the rat using SRBC as the antigen // Toxicol Meth. 2000. Vol. 10. N. 4. P. 283–311. DOI: 10.1080/105172300750048755.
112. Laffan S.B., Posobiec L.M., Uhl J.E., Vidal J.D. Species Comparison of Postnatal Development of the Female Reproductive System // Birth Defects Res. 2018. Vol. 110. N. 3. P. 163–189. DOI: 10.1002/bdr2.1132.
113. Landreth K.S. Critical windows in development of the rodent immune system // Hum. Exp. Toxicol. 2002. Vol. 21. N. 9–10. P. 493–498. DOI: 10.1191/0960327102ht287oa.
114. Langley-Evans S.C., Welham S.J., Jackson A.A. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat // Life Sci. 1999. Vol. 64. N. 11. P. 965–974. DOI: 10.1016/s0024-3205(99)00022-3.
115. Lau C., Kavlock R.J. 1994. Functional toxicity in the developing heart, lung, and kidney. In book: Developmental Toxicology. 2nd ed. / Ed. By C.A. Kimmel, J. Buelke-Sam. New York: Raven Press, 1994. P. 119–188.
116. Lee M.M., Gustafson M.L., Ukiyama E. et al. Developmental changes in mullerian inhibiting substance in the cynomolgus monkey, *Macaca fascicularis* // J. Clin. Endocrinol Metab. 1994. Vol. 78. N. 3. P. 615–621. DOI: 10.1210/jcem.78.3.8126132.
117. Lee W.W., Nam K.H., Terao K. et al. Age-related increase of peripheral CD4+ CD8+ double-positive T lymphocytes in cynomolgus monkeys: longitudinal study in relation to thymic involution // Immunology. 2003. Vol. 109. N. 2. P. 217–225. DOI: 10.1046/j.1365-2567.2003.01646.x.
118. Lees C.J., Ramsay H. Histomorphometry and bone biomarkers in cynomolgus females: a study in young, mature, and old monkeys // Bone. 1999. Vol. 24. N. 1. P. 25–28. DOI: 10.1016/s8756-3282(98)00149-5.
119. Levitt P. Structural and functional maturation of the developing primate brain // J. Ped. 2003. Vol. 143. P. S35–S45. DOI: 10.1067/s0022-3476(03)00400-1.
120. Lewin G., Hurtt M.E. Pre- and Postnatal Lung Development: An Updated Species Comparison // Birth Defects Res. 2017. Vol. 109. N. 19. P. 1519–1539. DOI: 10.1002/bdr2.1089.
121. Lewis O.J. The blood supply of developing long bones with special reference to the metaphyses // J. Bone Joint Surg. Br. 1956. Vol. 38-B. N. 4. P. 928–933. DOI: 10.1302/0301-620X.38B4.928.
122. Li X., Santos R., Bernal J.E. et al. Biology and postnatal development of organ systems of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) // J. Med. Primatol. 2023. Vol. 52. N. 1. P. 64–78. DOI: 10.1111/jmp.12622.
123. Loepke A.W., Istaphanous G.K., McAuliffe J. J. et al. The effects of neonatal isoflurane exposure in mice on brain cell viability, adult behavior, learning, and memory // Anesth. Analg. 2009. Vol. 108. N. 1. P. 90–104. DOI: 10.1213/ane.0b013e31818cdb29.
124. Luetjens C.M., Weinbauer G.F. Functional assessment of sexual maturity in male macaques (*Macaca fascicularis*) // Regul. Toxicol. Pharmacol. 2012. Vol. 63. N. 3. P. 391–400. DOI: 10.1016/j.yrtph.2012.05.003.

125. Lumbers E.R. Functions of the renin-angiotensin system during development // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 1995. Vol. 22. N. 8. P. 499–505. DOI: 10.1111/j.1440-1681.1995.tb02057.x.
126. Mackey M.S., Stevens M.L., Ebert D.C. et al. The ferret as a small animal model with BMU-based remodeling for skeletal research // Bone. 1995. Vol. 17. N. 4. Suppl. P. 191S–196S. DOI: 10.1016/8756-3282(95)00330-g.
127. Mackie R.I., Sghir A., Gaskins H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract // Am. J. Clin. Nutr. 1999. Vol. 69. N. 5. P. 1035S–1045S. DOI: 10.1093/ajcn/69.5.1035s.
128. Makori N., Tarantal A.F., Lü F.X. et al Functional and morphological development of lymphoid tissues and immune regulatory and effector function in rhesus monkeys: cytokine-secreting cells, immunoglobulin-secreting cells, and CD5(+) B-1 cells appear early in fetal development // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2003. Vol. 10. N. 1. P. 140–153. DOI: 10.1128/cdli.10.1.140-153.2003.
129. Marshall-Clarke S., Reen D., Tasker L. et al. Neonatal immunity: how well has it grown up? // Immunol. Today. 2000. Vol. 21. N. 1. P. 35–41. DOI: 10.1016/s0167-5699(99)01548-0.
130. Marshall G.R., Wickings E.J., Nieschlag E. Testosterone can initiate spermatogenesis in an immature nonhuman primate, *Macaca fascicularis* // Endocrinology. 1984. Vol. 114. N. 6. P. 2228–2233. DOI: 10.1210/endo-114-6-2228.
131. Martin P.L., Weinbauer G.F. Developmental toxicity testing of biopharmaceuticals in nonhuman primates: previous experience and future directions / Int. J. Toxicol. 2010. Vol. 29. N. 6. P. 552–568. DOI: 10.1177/1091581810378896.
132. Marty M.S., Chapin R.E., Parks L.G. et al., Development and maturation of the male reproductive system // Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol. 2003. Vol. 68. N. 2. P. 125–136. DOI: 10.1002/bdrb.10015.
133. Masoud I., Shapiro F., Kent R. et al. Longitudinal study of the growth of the New Zealand white rabbit: cumulative and biweekly incremental growth rates for body length, body weight, femoral length, and tibial length // J. Orthop. Res. 1986. Vol. 4. N. 2. P. 221–231. DOI: 10.1002/jor.1100040211.
134. de Matos A.S., Kugelmeier T., Guimarães D.A.A. et al. Early puberty in short-haired Guinea pigs kept in laboratory animal facilities // Anim. Reprod. 2022. Vol. 19. N. 1. P. e20210068. DOI: 10.1590/1984-3143-AR2021-0068.
135. Mauderly J.L. Effect of age on pulmonary structure and function of immature and adult animals and man // Fed. Proc. 1979. Vol. 38. N. 2. P. 173–177.
136. McCormick M. J., Lowe P. J., Ashworth M.A. Analysis of the relative contributions of the proximal and distal epiphyseal plates to the growth in length of the tibia in the New Zealand white rabbit // Growth. 1972. Vol. 36. N. 2. P. 133–144.
137. McElroy P.J., Willcox N., Catty D. Early precursors of B lymphocytes. I. Rabbit/mouse species differences in the physical properties and surface phenotype of pre-B cells, and in the maturation sequence of early B cells // Eur. J. Immunol. 1981. Vol. 11. N. 2. P. 76–85. DOI: 10.1002/eji.1830110203.
138. Menard D., Calvert R. Fetal and postnatal development of the small and large intestine: patterns and regulation. In book: Growth of the gastrointestinal tract: gastrointestinal hormones and growth factors / Ed. by J. Morrisset, T.E. Solomon. Boca Raton, FL: CRC Press, 1991. P. 159–174.

139. Michejda M. Growth standards in the skeletal age of rhesus monkey (*M. mulatta*) chimpanzee (*Pan tryglodytes*) and man // Dev. Biol. Stand. 1980. Vol. 45. P. 45–50.
140. Milla P.J. The weanling's gut // Acta Paediatr. Scand. Suppl. 1986. Vol. 323. P. 5–13. DOI: 10.1111/j.1651-2227.1986.tb10345.x.
141. Milner R.D., Pownall L. Hepatic cellular development in the rabbit // Biol. Neonate. 1981. Vol. 40. N. 3–4. P. 204–208. DOI: 10.1159/000241492.
142. Miranda F.G., Souza I.P., Viegas F.M. et al. Radiographic study of the development of the pelvis and hip and the femorotibial joints in domestic cats // J. Feline Med. Surg. 2020. Vol. 22. N. 6. P. 476–483. DOI: 10.1177/1098612X19854809.
143. Momma K., Ito T., Ando M. In situ morphology of the foramen ovale in the fetal and neonatal rat // Pediatr. Res. 1992. Vol. 32. N. 6. P. 669–672. DOI: 10.1203/00006450-199212000-00008.
144. Monie I.W. Comparative development of the nervous, respiratory, and cardiovascular systems // Environ. Health Perspect. 1976. Vol. 18. P. 55–60. DOI: 10.1289/ehp.761855.
145. de Morais-Pinto L., da Veiga M.L., Almeida da Anunciação A.R. Central nervous system development of cats (*Felis catus L.* 1758) // Res. Vet. Sci. 2021. Vol. 141. P. 81–94. DOI: 10.1016/j.rvsc.2021.10.015.
146. Morohashi K., Baba T., Tanaka M. Steroid hormones and the development of reproductive organs // Sex. Dev. 2013. Vol. 7. N. 1–3. P. 61–79. DOI: 10.1159/000342272.
147. Moss-Salentijn L. Studies of long bone growth. I. Determination of differential elongation in paired growth plates of the rat // Acta Anat. (Basel). 1974. Vol. 90. N. 1. P. 145–160.
148. Müller J., Skakkebaek N.E. Quantification of germ cells and seminiferous tubules by stereological examination of testicles from 50 boys who suffered from sudden death // Int. J. Androl. 1983. Vol. 6. N. 2. P. 143–156. DOI: 10.1111/j.1365-2605.1983.tb00333.x.
149. Nakatsu T., Uwabe C., Shiota K. Neural tube closure in humans initiates at multiple sites: evidence from human embryos and implications for the pathogenesis of neural tube defects // Anat Embryol. (Berl). 2000. Vol. 201. N. 6. P. 455–466. DOI: 10.1007/s004290050332.
150. Nam K.H, Akari H., Terao K. et al. Age-related changes in major lymphocyte subsets in cynomolgus monkeys // Exp. Anim. 1998. Vol. 47. P. 159–166. DOI: 10.1538/expanim.47.159.
151. Nap R.C., Hazewinkel H.A. Growth and skeletal development in the dog in relation to nutrition; a review // Vet. Q. 1994. Vol. 16. N. 1. P. 50–59. DOI: 10.1080/01652176.1994.9694417.
152. Neubert R., Helge H., Neubert D. 1996. Nonhuman primates as models for evaluating substance-induced changes in the immune system with relevance for man. In book: Experimental immunotoxicology / Ed. by R.J. Smialowicz, M.P. Holsapple. Boca Raton: CRC Press, 1996. P. 63–98.
153. Noell N.W. Metabolic injuries of the visual cell // Am. J. Opthamol. 1955. Vol. 40. P. 60–70.
154. Nold J.B., Benjamin S.A., Miller G.K. Alterations in immune responses in prenatally irradiated dogs // Radiat. Res. 1988. Vol. 115. N. 3. P. 472–480.

155. Norris M.L., Adams C.E. Aggressive behaviour and reproduction in the mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*, relative to age and sexual experience at pairing // J. Reprod. Fertil. 1972. Vol. 31. N. 3. P. 447–450. DOI: 10.1530/jrf.0.0310447.
156. Ojeda S.R., Andrews W.W., Advis J.P. et al. Recent advances in the endocrinology of puberty // Endocr. Rev. 1980. Vol. 1. N. 3. P. 228–257. DOI: 10.1210/edrv-1-3-228.
157. Ojeda S.R., Roth C., Mungenast A. et al. Neuroendocrine mechanisms controlling female puberty: new approaches, new concepts // Int. J. Androl. 2006. Vol. 29. N. 1. P. 256–263; discussion 286-90. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2005.00619.x.
158. Olbing H., Blaufox M.D., Aschinberg L.C. et al., Postnatal changes in renal glomerular blood flow distribution in puppies // J. Clin. Invest. 1973. Vol. 52. N. 11. P. 2885–2895. DOI: 10.1172/JCI107485.
159. Orlic D., Gray B.A., Carmichael R.D. et al. Lymphocyte infiltration of gut epithelium in fetal and neonatal rabbits // Biol Neonate. 1981. Vol. 40. N. 1–2. P. 91–98. DOI: 10.1159/000241476.
160. O'Shaughnessy P.J., Sheffield J.W. Effect of temperature and the role of testicular descent on post-natal testicular androgen production in the mouse // J. Reprod. Fertil. 1991. Vol. 91. N. 1. P. 357–364. DOI: 10.1530/jrf.0.0910357.
161. Pácha J. Development of intestinal transport function in mammals // Physiol. Rev. 2000. Vol. 80. N. 4. P. 1633–1667. DOI: 10.1152/physrev.2000.80.4.1633.
162. Parker G.A., Picut C.A., Swanson C. et al. Histologic Features of Postnatal Development of Immune System Organs in the Sprague-Dawley Rat // Toxicol. Pathol. 2015. Vol. 43. N. 6. P. 794–815. DOI: 10.1177/0192623315578720.
163. Patton J.T., Kaufman M.H. The timing of ossification of the limb bones, and growth rates of various long bones of the fore and hind limbs of the prenatal and early postnatal laboratory mouse // J. Anat. 1995. Vol. 186. N. Pt 1. P. 175–185.
164. Paulsen D.B., Buddington K.K., Buddington R.K. Dimensions and histologic characteristics of the small intestine of dogs during postnatal development // Am. J. Vet. Res. 2003. Vol. 64. N. 5. P. 618–626. DOI: 10.2460/ajvr.2003.64.618.
165. Peri B.A., Rothberg R.M. Transmission of maternal antibody prenatally and from milk into serum of neonatal rabbits // Immunology. 1986. Vol. 57. N. 1. P. 49–53.
166. Picut C.A., Dixon D., Simons M.L. et al Postnatal ovary development in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters // Toxicol Pathol. 2015. Vol. 43. N. 3. P. 343–353. DOI: 10.1177/0192623314544380.
167. Picut C.A., Remick A.K. 2016. Female reproductive system. In book: Atlas of histology of the juvenile rat / Ed. by G.A. Parker, C.A. Picut. Cambridge: Academic Press, 2016. P. 203–205.
168. Picut C.A., Remick A.K., Asakawa M.G. et al. Histologic features of prepubertal and pubertal reproductive development in female Sprague-Dawley rats // Toxicol. Pathol. 2014. Vol. 42. N. 2. P. 403–413. DOI: 10.1177/0192623313484832.
169. Pinto-Fochi M.E., Negrin A.C., Scarano W.R. et al. Sexual maturation of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): a histological, hormonal and spermatic evaluation // Reprod. Fertil. Dev. 2016. Vol. 28. N. 6. P. 815–823. DOI: 10.1071/RD14074.
170. Plant T.M. Neurobiological bases underlying the control of the onset of puberty in the rhesus monkey: a representative higher primate // Front. Neuroendocrinol. 2001. Vol. 22. N. 2. P. 107–139. DOI: 10.1006/frne.2001.0211.

171. Pohl C.R., deRidder C.M., Plant T.M. Gonadal and nongonadal mechanisms contribute to the prepubertal hiatus in gonadotropin secretion in the female rhesus monkey (*Macaca mulatta*) // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995. Vol. 80. N. 7. P. 2094–2101. DOI: 10.1210/jcem.80.7.7608261.
172. Pollock C. Emergency medicine of the ferret // Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract. 2007. Vol. 10. N. 2. P. 463–500. DOI: 10.1016/j.cvex.2007.02.002.
173. Pressler R., Auvin S. Comparison of Brain Maturation among Species: An Example in Translational Research Suggesting the Possible Use of Bumetanide in Newborn // Front. Neurol. 2013. Vol. 4. P. 36. DOI: 10.3389/fneur.2013.00036.
174. Quigley K.S., Shair H.N., Myers M.M. Parasympathetic control of heart period during early postnatal development in the rat // J. Auton. Nerv. Syst. 1996. Vol. 10. N. 59(1–2). P. 75–82. DOI: 10.1016/0165-1838(96)00010-0.
175. Rajfer J. Endocrinological study of testicular descent in the rabbit // J. Surg. Res. 1982. Vol. 33. N. 2. P. 158–163. DOI: 10.1016/0022-4804(82)90023-3.
176. Rakic P., Bourgeois J.P., Eckenhoff M.F. et al. Concurrent overproduction of synapses in diverse regions of the primate cerebral cortex // Science. 1986. Vol. 232. N. 4747. P. 232–235. DOI: 10.1126/science.3952506.
177. Rakusan K. Postnatal development of the heart. In book: Hearts and heart-like organs. Vol. 1. New York: Academic Press, 1980. P. 301–348.
178. Rendas A., Branthwaite M., Reid L. Growth of pulmonary circulation in normal pig-structural analysis and cardiopulmonary function // J. Appl. Physiol Respir Environ Exerc Physiol. 1978. Vol. 45. N. 5. P. 806–817. DOI: 10.1152/jappl.1978.45.5.806.
179. Rezzani R., Nardo L., Favero G. et al. Thymus and aging: morphological, radiological, and functional overview // Age (Dordr). 2014. Vol. 36. N. 1. P. 313–351. DOI: 10.1007/s11357-013-9564-5.
180. Ring P.A. Ossification and growth of the distal ulnar epiphysis of the rabbit // J. Anat. 1955. Vol. 89. N. 4. P. 457–463.
181. Rizzi S., Ori C., Jevtovic-Todorovic V. Timing versus duration: determinants of anesthesia-induced developmental apoptosis in the young mammalian brain // Ann. N Y Acad. Sci. 2010. Vol. 1199. P. 43–51. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05173.x.
182. Rodier P.M. Chronology of neuron development: animal studies and their clinical implications // Dev. Med. Child Neurol. 1980. Vol. 22. N. 4. P. 525–545. DOI: 10.1111/j.1469-8749.1980.tb04363.x.
183. Romagnoli S., Schlafer D.H. Disorders of sexual differentiation in puppies and kittens: a diagnostic and clinical approach // Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2006. Vol. 36. N. 3. P. 573–606. DOI: 10.1016/j.cvsm.2005.12.007.
184. Romijn H.J., Hofman M.A., Gramsbergen A. At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? // Early Hum. Dev. 1991 Vol. 26. N. 1. P. 61–67. DOI: 10.1016/0378-3782(91)90044-4.
185. Rudicel S., Lee K.E., Pelker R.R. Dimensions of the rabbit femur during growth // Am. J. Vet. Res. 1985. Vol. 46. N. 1. P. 268–269.
186. Sabin F.R., Miller F.R., Smithburn K.C. et al. Changes in the bone marrow and blood cells of developing rabbits // J. Exp. Med. 1936. Vol. 64. N. 1. P. 97–120. DOI: 10.1084/jem.64.1.97.

187. Sanger T.J., Norgard E.A., Pletscher L.S. et al. Developmental and genetic origins of murine long bone length variation // J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol. 2011. Vol. 316B. N. 2. P. 146–161. DOI: 10.1002/jez.b.21388.
188. Sano S., Takahama Y., Sugawara T. et al. Stat3 in thymic epithelial cells is essential for postnatal maintenance of thymic architecture and thymocyte survival // Immunity. 2001. Vol. 15. N. 2. P. 261–273. DOI: 10.1016/s1074-7613(01)00180-7.
189. Satoh K., Shirota F., Tsunajima T. et al. Limitation of heart growth in neonatal piglets by simvastatin and atorvastatin: comparison with pravastatin // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2001. Vol. 280. N. 6. P. H2746-H2751. DOI: 10.1152/ajpheart.2001.280.6.H2746.
190. Savage D.C. The microbial flora in the gastrointestinal tract // Prog. Clin. Biol. Res. 1981. Vol. 77. P. 893–908.
191. Scheuer L., Black S. Developmental juvenile osteology. Elsevier. San Diego: Academic Press, 2000. 587 p.
192. Scheuplein R., Charnley G., Dourson M. Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity. I. Biological basis // Regul. Toxicol. Pharmacol. 2002. Vol. 35. N. 3. P. 429–447. DOI: 10.1006/rtph.2002.1558.
193. Schwartz G.J., Olson J., Kittelberger A.M. et al. Postnatal development of carbonic anhydrase IV expression in rabbit kidney // Am. J. Physiol. 1999. Vol. 276. N. 4. P. F510-F520. DOI: 10.1152/ajprenal.1999.276.4.F510.
194. Seikaly M.G., Arant B.S. Jr. Development of renal hemodynamics: glomerular filtration and renal blood flow // Clin. Perinatol. 1992. Vol. 19. N. 1. P. 1–13.
195. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's // Int. J. Prev. Med. 2013. Vol. 4. N. 6. P. 624–630.
196. Sengupta P., Dutta S. Mapping the Age of Laboratory Rabbit Strains to Human // Int. J. Prev. Med. 2020. Vol. 11. P. 194. DOI: 10.4103/ijpvm.IJPVM_530_18.
197. Sequeira Lopez M.L., Gomez R.A. Development of the renal arterioles // J. Am. Soc. Nephrol. 2011. Vol. 22. N. 12. P. 2156–2165. DOI: 10.1681/ASN.2011080818.
198. Shaffer E.A., Zahavi I., Gall D.G. Postnatal development of hepatic bile formation in the rabbit // Dig. Dis. Sci. 1985. Vol. 30. N. 6. P. 558–563. DOI: 10.1007/BF01320263.
199. Shomer N.H., Holcombe H., Harkness J.E. Biology and Diseases of Guinea Pigs // Laboratory Animal Medicine. 2015. P. 247–283. DOI: 10.1016/B978-0-12-409527-4.00006-7.
200. Siew M.L., Kitchen M. J, te Pas A.B., et al.. Pulmonary transition at birth. In book: The lung. Development, aging and the environment. 2nd ed. / Ed. by R. Harding, K.E. Pinkerton. Oxford: Elsevier, 2015. P. 251–264.
201. Silva F.M.O., Alcantara D., Carvalho R.C. et al. Development of the central nervous system in guinea pig (*Cavia porcellus*, *Rodentia*, *Caviidae*) // Pesquisa Veterinária Brasileira. 2016. Vol. 36. N. 8. P. 753–760. DOI: 10.1590/S0100-736X2016000800013.
202. Silverman A.J., Desnoyers P. Post-natal development of the median eminence of the guinea pig // Anat. Rec. 1975. Vol. 183. N. 3. P. 459–475. DOI: 10.1002/ar.1091830310.
203. Skaggs H., Chellman G.J., Collinge M. et al. Comparison of immune system development in nonclinical species and humans: Closing information gaps for immunoto-

xicity testing and human translatability // Reprod. Toxicol. 2019. Vol. 89. P. 178–188. DOI: 10.1016/j.reprotox.2019.06.005.
204. Smith M.W. Postnatal development of transport function in the pig intestine // Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol. 1988. Vol. 90. N. 4. P. 577–582. DOI: 10.1016/0300-9629(88)90670-6.
205. Smith R.A., Glomski C.A. Embryonic and fetal hemopoiesis in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) // Anat. Rec. 1977. Vol. 189. N. 3. P. 499–517. DOI: 10.1002/ar.1091890309.
206. Somberg R.L., Robinson J.P., Felsburg P.J. T lymphocyte development and function in dogs with X-linked severe combined immunodeficiency // J. Immunol. 1994. Vol. 153. N. 9. P. 4006–4015.
207. Sosa G.A., Roux M.E. Development of T lymphocytes in the nasal-associated lymphoid tissue (NALT) from growing Wistar rats // Clin. Dev. Immunol. 2004. Vol. 11. N. 1. P. 29–34. DOI: 10.1080/10446670410001670463.
208. Stapleton F.B., Arant B.S., Jr. Ontogeny of renal uric acid excretion in the mongrel puppy // Pediatr. Res. 1981. Vol. 15. N. 12. P. 1513–1516. DOI: 10.1203/00006450-198112000-00012.
209. Steiniger B., Ulfig N., Risse M. et al. Fetal and early post-natal development of the human spleen: from primordial arterial B cell lobules to a non-segmented organ // Histochem. Cell Biol. 2007. Vol. 128. N. 3. P. 205–215. DOI: 10.1007/s00418-007-0296-4.
210. Sturrock R.R. Myelination of the mouse corpus callosum // Neuropathol. Appl. Neurobiol. 1980. Vol. 6. N. 6. P. 415–420. DOI: 10.1111/j.1365-2990.1980.tb00219.x.
211. Swords W.E., Wu C.C., Champlin F.R. et al. Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora // Biol. Neonate. 1993. Vol. 63. N. 3. P. 191–200. DOI: 10.1159/000243931.
212. Tada T., Kishimoto H. Ultrastructural and histological studies on closure of the mouse ductus arteriosus // Acta Anat. (Basel). 1990. Vol. 139. N. 4. P. 326–334. DOI: 10.1159/000147020.
213. Tavoloni N., Jones M.J., Berk P.D. Postnatal development of bile secretory physiology in the dog // J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 1985. Vol. 4. N. 2. P. 256–267. DOI: 10.1097/00005176-198504000-00018.
214. Tavoloni N., Schaffner F. Bile secretory apparatus in the newborn dog: relationship between structural and functional immaturities // Biol. Neonate. 1989. Vol. 55. N. 2. P. 124–135. DOI: 10.1159/000242906.
215. Terao K., Rose L.M., Sackett G.P. et al. Development of lymphocyte subsets in pigtailed macaques // Hum. Immunol. 1988. Vol. 21. P. 33–48. DOI: 10.1016/0198-8859(88)90079-1.
216. Thomson A.B., Keelan M. The development of the small intestine // Can J. Physiol. Pharmacol. 1986. Vol. 64. N. 1. P. 13–29. DOI: 10.1139/y86-003.
217. Thorngren K.G., Hansson L.I. Cell production of different growth plates in the rabbit // Acta Anat. (Basel). 1981. Vol. 110. N. 2. P. 121–127. DOI: 10.1159/000145421.
218. Thurlbeck W.M. Postnatal growth and development of the lung // Am. Rev. Respir. Dis. 1975. Vol. 111. N. 6. P. 803–844. DOI: 10.1164/arrd.1975.111.6.803.
219. Toma M., Felisi M., Bonifazi D. et al. Paediatric Medicines in Europe: The Paediatric

Regulation-Is It Time for Reform? // Front. Med. (Lausanne). 2021. Vol. 8. P. 593281. DOI: 10.3389/fmed.2021.593281.
220. Toofanian F., Targowski S.P. Morphogenesis of rabbit small intestinal mucosa // Am. J. Vet. Res. 1982. Vol. 43. N. 12. P. 2213–2219.
221. Tortereau A., Howroyd P., Lorentsen H. Onset of puberty and normal histological appearances of the reproductive organs in peripubertal female Göttingen minipigs // Toxicol. Pathol. 2013. Vol. 41. N. 8. P. 1116–1125. DOI: 10.1177/0192623313482777.
222. Tóth-Heyn P., Drukker A., Guignard J.P. The stressed neonatal kidney: from pathophysiology to clinical management of neonatal vasomotor nephropathy // Pediatr. Nephrol. 2000. Vol. 14. N. 3. P. 227–239. DOI: 10.1007/s004670050048.
223. Van Wagenen G., Asling C.W. Roentgenographic estimation of bone age in the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) // Am. J. Anat. 1958. Vol. 103. N. 2. P. 163–185. DOI: 10.1002/aja.1001030202.
224. Villablanca J.R., de Andrés I., Olmstead C.E. Sleep-waking states develop independently in the isolated forebrain and brain stem following early postnatal midbrain transection in cats // Neuroscience. 2001. Vol. 106. N. 4. P. 717–731. DOI: 10.1016/s0306-4522(01)00329-3.
225. Walker D.G. Functional differentiation of the kidney. In book: Intra-uterine development / ed. By A.C. Barnes. Philadelphia: Lea and Febiger, 1968. P. 245–252.
226. Walsh S.Z., Myer W.W., Lind J. 1974. The human fetal and neonatal circulation. Function and structure. Springfield, Illinois: Charles C. Thomas, 1974.
227. Walthall K., Cappon G.D., Hurtt M.E. et al. Postnatal development of the gastrointestinal system: a species comparison // Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol. 2005. Vol. 74. N. 2. P. 132–156. DOI: 10.1002/bdrb.20040.
228. Watanabe K.S., Schain R.J. Postnatal growth and development of the gerbil brain // Exp. Neurol. 1980. Vol. 69. N. 2. P. 290–298. DOI: 10.1016/0014-4886(80)90212-5.
229. Watson R.E., Desesso J.M., Hurtt M.E. et al. Postnatal growth and morphological development of the brain: a species comparison // Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol. 2006. Vol. 77. N. 5. P. 471–484. DOI: 10.1002/bdrb.20090.
230. Weinbauer G.F., Niehoff M., Niehaus M. et al. Physiology and Endocrinology of the Ovarian Cycle in Macaques // Toxicol. Pathol. 2008. Vol. 36. N. 7S. P. 7S–23S. DOI: 10.1177/0192623308327412.
231. Widdowson E.M. Development of the digestive system: comparative animal studies // Am. J. Clin. Nutr. 1985. Vol. 41. N. 2 Suppl. P. 384–390. DOI: 10.1093/ajcn/41.2.384.
232. Wildt D.E., Seager S.W., Chakraborty P.K. Behavioral, ovarian and endocrine relationships in the pubertal bitch // J. Anim. Sci. 1981. Vol. 53. N. 1. P. 182–191. DOI: 10.2527/jas1981.531182x.
233. Wilkinson F. Eye and brain growth in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) // Behav. Brain Res. 1986. Vol. 19. N. 1. P. 59–69. DOI: 10.1016/0166-4328(86)90048-3.
234. Williams B.H., Popek E.J., Hart R.A. et al. Iniencephaly and other neural tube defects in a litter of ferrets (*Mustela putorius furo*) // Vet. Pathol. 1994. Vol. 31. N. 2. P. 260–262. DOI: 10.1177/030098589403100218.
235. Willinghamm M.D., Brodt M.D., Lee K.L. et al. Age-related changes in bone structure and strength in female and male BALB/c mice // Calcif. Tissue Int. 2010. Vol. 86. N. 6. P. 470–483. DOI: 10.1007/s00223-010-9359-y.

236. Winkler G.C., Cheville N.F. Morphometry of postnatal development in the porcine lung // Anat. Rec. 1985. Vol. 211. N. 4. P. 427–433. DOI: 10.1002/ar.1092110409.
237. Witham E.A., Meadows J.D., Shojaei S., et al. Prenatal exposure to low levels of androgen accelerates female puberty onset and reproductive senescence in mice // Endocrinology. 2012. Vol. 153. N. 9. P. 4522–4532. DOI: 10.1210/en.2012-1283.
238. Witkowska A., Alibhai A., Hughes C. et al. Computed tomography analysis of guinea pig bone: architecture, bone thickness and dimensions throughout development // PeerJ. 2014. Vol. 2. N. 2. P. e615. DOI: 10.7717/peerj.615.
239. Witte M.K., Stork J.E., Blumer J.L. Diuretic therapeutics in the pediatric patient // Am. J. Cardiol. 1986. Vol. 57. N. 2. P. 44A–53A. DOI: 10.1016/0002-9149(86)91006-4.
240. Wood S.L., Beyer B.K., Cappon G.D. Species comparison of postnatal CNS development: functional measures // Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol. 2003. Vol. 68. N. 5. P. 391–407. DOI: 10.1002/bdrb.10037.
241. Wooding F.B., Smith M.W., Craig H. The ultrastructure of the neonatal pig colon // Am. J. Anat. 1978. Vol. 152. N. 3. P. 269–285. DOI: 10.1002/aja.1001520302.
242. Xie L., Zhou Q., Liu S. et al. Normal thoracic radiographic appearance of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) // PLoS ONE. 2014. Vol. 9. N. 1. P. 1–6. DOI: 10.1371/journal.pone.0084599.
243. Yang T.J., Gawlak S.L. Lymphoid organ weights and organ: body weight ratios of growing beagles // Lab. Anim. 1989. Vol. 23. N. 2. P. 143–146. DOI: 10.1258/002367789780863619.
244. Yi Y., Sun X., Gibson-Corley K. et al. A Transient Metabolic Recovery from Early Life Glucose Intolerance in Cystic Fibrosis Ferrets Occurs During Pancreatic Remodeling // Endocrinology. 2016. Vol. 157. N. 5. P. 1852–1865. DOI: 10.1210/en.2015-1935.
245. Yonamine H., Ogi N., Ishikawa T. et al. Radiographic studies on skeletal growth of the pectoral limb of the beagle // Nihon Juigaku Zasshi. 1980. Vol. 42. N. 4. P. 417–425. DOI: 10.1292/jvms1939.42.417.
246. Yu B., Chiou W.S. The morphological changes of intestinal mucosa in growing rabbits // Lab. Anim. 1997. Vol. 31. N. 3. P. 254–263. DOI: 10.1258/002367797780596301.
247. Zagon I.S., McLaughlin P.J. Effect of chronic maternal methadone exposure on perinatal development // Biol. Neonate. 1977. Vol. 31. N. 5–6. P. 271–282. DOI: 10.1159/000240975.
248. Zeiss C.J. Comparative Milestones in Rodent and Human Postnatal Central Nervous System Development // Toxicol. Pathol. 2021. Vol. 49. N. 8. P. 1368–1373. DOI: 10.1177/01926233211046933.
249. Zeltner T.B., Burri P.H. The postnatal development and growth of the human lung. II // Morphology. Respir. Physiol. 1987. Vol. 67. N. 3. P. 269–282. DOI: 10.1016/0034-5687(87)90058-2.
250. Zoetis T., Hurtt M.E. Species comparison of lung development // Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol. 2003. Vol. 68. N. 2. P. 121–124. DOI: 10.1002/bdrb.10014.
251. Zoetis T., Hurtt M.E. Species comparison of anatomical and functional renal development // Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol. 2003a. Vol. 68. N. 2. P. 111–120. DOI: 10.1002/bdrb.10013.

252. Zoetis T., Tassinari M.S., Bagi C. et al. Species comparison of postnatal bone growth and development // Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol. 2003. Vol. 68. N. 2. P. 86–110. DOI: 10.1002/bdrb.10012.
253. Zuck T.T. Age order of epiphyseal union in the guinea pig // The Anatomical Record. 1938. Vol. 70. N. 4. P. 389–399. DOI: 10.1002/ar.1090700403.
254. de Zwart L.L., Haenen H.E., Versantvoort C.H. et al. Role of biokinetics in risk assessment of drugs and chemicals in children // Regul. Toxicol. Pharmacol. 2004. Vol. 39. N. 3. P. 282–309. DOI: 10.1016/j.yrtph.2004.02.006.
255. Бутов А.А., Шабалин А.С. Стохастическая имитационная модель сопоставления возраста лабораторных животных (млекопитающих) и человека // Успехи геронтологии. 2015. Т. 28. № 4. С. 620–623.
256. Енгалычева Г.Н., Сюбаев Р.Д. Разработка педиатрических препаратов: ключевые факторы риска и программа доклинических исследований // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2023. Т. 13. № 1. С. 14–26. DOI: 10.30895/1991-2919-2023-500.
257. Котеров А.Н., Ушенкова Л.Н., Зубенкова Э.С. и др. Соотношение возрастов основных лабораторных животных (мышей, крыс, хомячков и собак) и человека: актуальность для проблемы возрастной радиочувствительности и анализ опубликованных данных // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2018. Т. 63. № 1. С. 5–27.
258. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1 / Под ред. А.Н. Миронова и др. Москва, 2012.
259. Ткачук Е.А., Мартынович Н.Н. Особенности пищеварительной системы у детей. Методика исследования. Семиотика поражений. Учебное пособие. Иркутск. ИГМУ, 2020.
260. Устьянцев С.Л. Способ определения биологического возраста у человека или животного. Патент RU 2 622 184 C1. Дата регистрации: 13.06.2017.

Использование альтернативных тест-систем в доклинической практике

https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-9-7-s8

Е. Г. Киркина [1], А. И. Богомолов [2], Е. Е. Воронежская [2], К. А. Макавеева [1], И. В. Мизгирев [3], А. В. Калуев [4], В. Д. Плотникова [5], Н. Д. Шамаев [6,7,8]

[1] *АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,*
[2] *ФГБУН Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН,*
[3] *ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России,*
[4] *ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России,*
[5] *ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского»,*
[6] *ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,*
[7] *Казанская государственная медицинская академия — филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России,*
[8] *ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России*

Традиционные методы доклинических исследований на животных (чаще всего на крысах и мышах) вызывают повышенное внимание со стороны общественности и организаций защиты животных, так как они могут быть связаны с болью и страданиями. В связи с этим в последние годы все большее внимание уделяется альтернативным методам доклинических исследований, включающим использование рыб и беспозвоночных. Такие модели имеют свои преимущества: более высокую скорость размножения, меньшие размеры и более дешевое содержание. Протоколы OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development, Организация экономического сотрудничества и развития) являются международными стандартами для проведения доклинических исследований. Они включают в себя рекомендации по различным аспектам исследований, таким как характеристика исследуемого вещества, методы тестирования, оценка данных и отчетность. При использовании альтернативных методов для доклинических исследований на рыбах и насекомых важно соблюдать принципы гуманного отношения к животным и обеспечивать их благополучие, а также строго следовать протоколам OECD, чтобы результаты исследований были надежными, и можно было сделать обоснованные выводы о безопасности и эффективности препаратов.

В настоящее время существует достаточно много подходов к доклиническим исследованиям лекарственных средств. Согласно официальным протоколам, раздел 2 OECD посвящен тестированию с использованием животных, не являющихся млекопитающими. Раздел включает 54 различных теста, например, тест на острую иммобилизацию с использованием *Daphnia* sp. (OECD 202), тесты на токсичность с применением разных видов рыб (OECD 203, OECD 204) и др. Чаще всего эти протоколы необходимы для исследования экотоксичности. В рамках доклинических исследований эти тесты используются для прогнозирования токсичности, системной циркуляции, биораспределения и терапевтической эффективности наномедицинских препаратов и могут выступать в качестве эффективной альтернативной модели скрининга для уменьшения количества экспериментов на высших позвоночных. Кроме того, эти модели достаточно дешевы и позволяют быстро проводить скрининг медицинских препаратов в условиях *in vivo*, таким образом сокращая разрыв между исследованиями *in vitro* и опытами на грызунах. Стоит отметить, что подобные модели просты в уходе и имеют высокую схожесть основных биологических функций с человеком.

Ниже приведены таблицы (табл. 1–3) с наименованиями протоколов OECD в соответствии с используемой моделью и видом животного. Для удобства они распределены на три вида: **водные животные** (рыбы, амфибии и ракообразные, см. табл. 1), **животные, передвигающиеся по воздуху** (птицы, пчелы и дрозофилы, см. табл. 2) и **группа наземных животных, насекомых и личинок** (см. табл. 3), включающая червей, членистоногих, личинки насекомых и (отдельно) микроорганизмы.

Изучение токсичности химических веществ, воздействия загрязнителей на акватические организмы или для тестирования лекарственных препаратов в рамках эксперимента может быть проведено с использованием в качестве тест-системы водных организмов, в частности, рыб.

Данио рерио, зебраданио (zebrafish, *Danio rerio*)

Протоколы OECD для проведения экспериментов на рыбах включают такие параметры, как выживаемость, рост, размножение и поведение. Важность опыта использования рыб зебраданио (*Danio rerio*) в сочетании с искусственным интеллектом для предсказания фармакологического профиля разных препаратов подчеркнул в своем докладе «Роль зебраданио (*Danio rerio*) в преклиническом скрининге» Алан Валерьевич Калуев, профессор РАН и руководитель группы ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России. Зебраданио сегодня являются вторым (после мышей) организмом, используемым в биомедицине. Они активно применяются в трансляционной нейробиологии благодаря простоте их использования, низкой стоимости, эволюционно-консервативной физиологии, генетической трактабильности, имеют 70% гомологии генома с человеческим, а также быстро развиваются и имеют возможность высокопроизводительного скрининга препаратов и мутаций. Зебраданио также используются для изучения острого и хронического стресса, тревоги, депрессивных состояний, психозов, токсидромов, эпилепсии и аддикции (Калуев А.В., 2023).

Таблица 1

Типы протоколов OECD для водных животных

Вид животного	Используемая модель	№ OECD
	Рыбы	
Данио рерио, зебрафиш (*Danio rerio*)	Модели: депрессии и стресса, исследования гормонопрепаратов; оценки влияния наркотических веществ, изучения острой токсичности; оценки влияния различных веществ на развитие и стимуляцию ооцитов; генетических исследований; нейроденегеративных заболеваний, ожирения, диабета, сердечно-сосудистых заболеваний; эндокринной, острой, хронической, репродуктивной, эмбриональной токсичности, токсичности при ранних стадиях развития	250, 203, 204, 210, 212, 215, 229, 230, 234, 236
Медака (*Oryzias latipes*)	Экотоксичность, эндокринная токсичность	240
	Амфибии	
Гладкая шпорцевая лягушка (*Xenopus laevis*)	Изучение кроссовера и мутации популяции, оценка приспособленности популяции, а также цикла эволюционного алгоритма, эндокринная и онтогенетическая токсичность	241, 248
Аксолотль (Ambistoma mexicanum)	Изучение процессов регенерации, рубцевания и фиброзов	—
	Ракообразные	
Дафния (*Daphnia* sp.)	Модель для исследования кардиотоксичности, репродуктивной токсичности, острой и эндокринной токсичности	202, 211, 253, 230
	Моллюски	
Обыкновенный прудовик, новозеландская грязевая улитка (*Lymnaea stagnalis*)	Экотоксичность, изучение нейрофизиологии, нейромедиаторов	242

Примечание. Здесь и в табл. 3: «—» — протокол OECD для данного вида животных отсутствует.

Таблица 2

Типы протоколов OECD для животных, передвигающихся по воздуху

Вид животного	Используемая модель	№ OECD
Птицы		
Кряква/перепелка виргинская/ голубь/перепел японский/ фазан кольчатый/ красноногая куропатка (*Anas platyrhynchos*, *Colinus virginianus*, *Columba*, *Coturnix japonica*, *Phasianus colchicus*, *Alectoris rufa*)	Модель пищевой и экологической токсичности	205
Кряква/перепел Бобуайт/ японский перепел (*Anas platyrhynchos*, *Northern Bobwhite*, *Coturnix japonica*)	Модель для изучения репродуктивной и экологической токсичности	206
Виргинский перепел/ немой перепел (низкая способность к срыгиванию) (*Colinus virginianus*, *Coturnix japonica*)	Модель для оценки острой пероральной и экологической токсичности	223
Насекомые		
Медоносные пчелы (*Ápis melliféra*)	Модель острой пероральной токсичности, острой контактной и хронической токсичности	213, 214, 245
Дрозофила (*Drosophila melanogaster*)	Модель для изучения генетической токсичности и мутагенеза (нейродегенеративных заболеваний)	477
Шмель (*Bombus terrestris L.*)	Острая пероральная и острая контактная токсичность	246, 247

Таблица 3

Типы протоколов OECD для наземных животных, насекомых и личинок

Вид животного	Используемая модель	№ OECD
Личинки насекомых		
Хирономиды (комары-звонцы) (*Chironomidae*)	Экологическая токсичность бентосных организмов	218, 219, 235
Медоносная пчела (*Apis mellifera*)	Острая токсичность	237
Большие навозные мухи (*Scathophagidae*)	Модель для изучения токсичности паразитицидов	228
Большая восковая моль (*Galleria mellonella L.*)	Модель для исследования вирулентности и патогенности различных инфекционных агентов, а также механизма иммунного ответа	—
Черви		
Люмбрикулиды/ дождевой червь/энхитреиды (*Lumbriculidae*, *Lumbricina*, *Enchytraeidae*)	Экотоксичность (влияние длительного воздействия химических веществ, острая токсичность, репродуктивная способность, ингибирование активности анаэробных бактерий)	225, 207, 222, 220, 224
Членистоногие		
Коллемболы (*Collembola*)	Экотоксичность (влияние химических веществ в почве на репродуктивную способность)	232
Клещи		
Хищный клещ (*Cunaxidae*)	Экотоксичность (влияние химических веществ в почве на репродуктивную способность)	226
Микроорганизмы		
Микроорганизмы из ила (*Dechloromonas*, *Pseudmonas*, *Bacteroides*, *Candidatus*, *Methanofastidiosum*, *Desulfomicrobium*)	Экотоксичность (бентос, трансформация углерода, азота)	209, 216–219, 225

Зебраданио является уникальным инструментом для моделирования широкого спектра заболеваний человека в диапазоне от редких орфанных генетических болезней до таких социально значимых нозологий, как сердечно-сосудистые, нейродегенеративные и онкологические заболевания. Старший научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Игорь Викторович Мизгирев в своем докладе «Зебрафиш (*Danio rerio*): опыт использования в онкологии» подробно рассказал, как на этих рыбах создается множество моделей опухолевого роста, основанных как на использовании химических канцерогенов, так и на получении опухолей генно-инженерным путем, посредством введения в зиготы рыб векторной ДНК, содержащей различные онкогены под управлением тканеспецифических промоторов. Также на *D. rerio* были созданы трансплантабельные опухолевые штаммы, ведущие свое происхождение от опухолей, индуцированных у клональных гомозиготных рыб, являющихся генетическими аналогами инбредных линий грызунов. В опухолях рыб активировались те же онкогены и контролируемые ими сигнальные каскады, что и в злокачественных новообразованиях млекопитающих и человека. Таким образом, онкологические модели, основанные на использовании *D. rerio* в качестве экспериментального организма, являются по своим биологическим характеристикам и клиническому течению полными аналогами моделей, разработанных на грызунах. При этом стоимость экспериментов на зебраданио существенно ниже стоимости аналогичных исследований на млекопитающих по причине небольших размеров этих организмов, возможности выполнения многих манипуляций не на взрослых животных, а на эмбрионах и личинках, а также меньшей трудоемкости стандартных операций по поддержанию рыб в лабораторных условиях.

Таким образом, зебраданио представляет собой перспективный модельный организм для исследований в области нейробиологии, включая трансляционные исследования, направленные на оперативный перенос научных данных в клиническую практику (Калуев А.В. и соавт., 2023). Это особенно касается таких областей, как нейро- и психофармакология. В настоящее время зебраданио является наиболее подходящим объектом для испытаний потенциальных антидепрессантов, анксиолитиков, антипсихотиков и других терапевтических средств благодаря своей доступности, небольшим размерам и консервативности основных нейробиологических мишеней (гомологичные структуры мозга) (Lachowicz J., Niedziałek K.K. и соавт., 2021), нейротрансмиттеров и их рецепторов (Kalueff A.V. и соавт., 2014), что делает их актуальными для терапии, применяемой у человека (Калуев А.В. и соавт., 2023).

Медака (*Oryzias latipes*)

Медака (*Oryzias latipes*), еще одна рыба, которая рассматривается как модельный организм и широко используется во многих областях биологических исследований, особенно в токсикологии. У медаки короткий период беременности, и они плодовиты — эти характеристики делают их удобными для выращивания в лаборатории. Они могут выдерживать холод и легко транспортируются. Исследователи проанализировали почти все аспекты жизненного цикла медаки, включая половое пове-

дение, генетическую наследственность окраски, нерестовые привычки, питание, патологии, эмбриональное развитие, экологию и т.д. (Shima A., Mitani H., 2004).

У этого организма относительно небольшой геном (около 800 М пар оснований, вдвое меньше, чем у другой популярной модельной рыбы зебраданио), а также время генерации 7 нед (вместо 9 нед у зебраданио) и более устойчивый рост в широком диапазоне температур (6–40 °C, или 43–104 °F) (Nor Azra M. и соавт., 2022).

Трансгенных медака относительно легко получить. Их генетически модифицировали, чтобы они выделяли различные человеческие гормоны, экспрессировали промоторные последовательности других рыб, а также вырабатывали не только противомикробные белки, но и тот, который заставляет медака светиться флюоресцентным зеленым, желтым или красным светом (Iwai T. и соавт., 2009). Существует также множество мутаций, которые проявляются у медаки случайным образом, например, мутантный штамм без чешуи и с очень длинными плавниками.

Гладкая шпорцевая лягушка (*Xenopus laevis*)

Xenopus laevis — бесхвостая амфибия, которая используется в качестве основной модели позвоночных для изучения эмбрионального развития. Среди преимуществ этого вида можно отметить эволюционную близость к высшим позвоночным с точки зрения физиологии, экспрессии генов и развития органов.

X. laevis является важным модельным организмом для изучения эволюционной биологии развития, токсикологии, этологии, нейробиологии, эндокринологии, иммунологии и биологии опухолей. Благодаря развитию редактирования генома она также заняла важное место в области генетики. По этим причинам *X. laevis* представляется мощной и альтернативной моделью для изучения влияния на экологию и биомедицинские проблемы. Жизненный цикл этой лягушки, а также возможность получать гаметы от взрослых особей в течение всего года и эмбрионы путем искусственного оплодотворения позволяют проводить экспериментальные исследования нескольких биологических показателей, таких как гаметогенез, эмбриогенез, рост личинок, метаморфоз и, конечно, стадии молоди и взрослых особей. Более того, по сравнению с альтернативными моделями беспозвоночных и даже позвоночных животных геном *X. Laevis* имеет более высокую степень сходства с геномом млекопитающих (Carotenuto R. и соавт., 2023).

Одним из наиболее значимых открытий, сделанных благодаря *X. laevis*, было обнаружение процесса гаструляции — стадии развития эмбриона, когда формируются основные органы и системы организма. Это открытие позволило ученым лучше понять, как развиваются различные заболевания, и как можно их предотвратить (Carotenuto R. и соавт., 2023).

В исследованиях по регенерации широко используется возможность восстановления конечностей у позвоночных. У головастиков шпорцевой лягушки способность регенерации присутствует только в раннем возрасте и со временем исчезает (Murugan N. J. и соавт., 2022).

Используя эту возможность, ученые из США создали ксеноботов — живых роботов из стволовых клеток эмбрионов *X. laevis*. Эти биороботы уникальны тем,

что они разработаны компьютерами для выполнения заранее определенных задач. Они имеют форму капли или шара размером менее миллиметра и способны к совместной работе и самовосстановлению. Одной из выдающихся особенностей ксеноботов является их возможность к воспроизводству себе подобных. Помимо своей возможности к размножению, ксеноботы также обладают биоразлагаемостью и умением обрабатывать различные химические вещества. Эти свойства делают их перспективными кандидатами для применения в терапии и экологической инженерии. Например, ксеноботы могут быть использованы для доставки лекарств в труднодоступные области организма или для очистки загрязненной среды (Blackiston D. и соавт., 2021).

В последние годы эта модель постепенно привлекает внимание экотоксикологов, поскольку она может быть хорошим индикатором разнообразия среды обитания, биологического разнообразия и локальных стрессовых факторов. В доклинических исследованиях эта модель используется для определения экологической безопасности новых лекарственных препаратов. Например, определяют последствия попадания нового препарата в биосферу и в некоторых случаях (например цитостатики), если вред значительный, разрабатывают особые меры по утилизации.

Иллюстрацией использования амфибий-зооиндикаторов озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus*) и прудовой лягушки (*P. lessonae*) в такого рода исследованиях стал доклад Валерии Дмитриевны Плотниковой «Оценка иммуногематологических показателей амфибий как маркеров цитотоксического воздействия среды обитания», которая рассказала, как была проведена оценка эколого-физиологических показателей иммуногемопоэза природных популяций амфибий в условиях воздействия комплекса гидрохимических факторов среды. В процессе работы был определен лейкоцитарный состав профиля крови амфибий с расчетом лейкоцитарных индексов, уровень циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови, а также проведен подсчет микроядер.

Аксолотль (*Ambistoma mexicanum*)

Амфибии отряда *Urodele*, такие как аксолотль (*Ambystoma mexicanum*), демонстрируют исключительную регенеративную способность и считаются важными доклиническими модельными организмами в исследованиях неврологии и регенеративной медицины. Ранние исследования показали, что способность к регенерации конечностей этой саламандры заметно снижается при индукции метаморфоза гормонами щитовидной железы. Учеными было обнаружено, что метаморфные животные успешно восстанавливали функционально спинной мозг после экспериментально вызванной травмы (Demircan T. и соавт., 2020).

Дафнии (*Daphnia* spp.)

Ряд протоколов OECD, использующих в качестве тест-системы дафний, позволяет оценивать токсичность широкого спектра фармацевтических препаратов, таких

как антибиотики, противоопухолевые препараты, антидепрессанты, противовоспалительные препараты, бета-блокаторы и средства, регулирующие липидный обмен. В настоящее время в токсикологических исследованиях в основном используются тесты на токсичность дафний, основанные на иммобилизации и летальности, тест на острую иммобилизацию и на репродукцию.

Водные организмы рода *Daphnia* на протяжении сотен лет служили модельной системой и на сегодняшний день являются одними из наиболее хорошо изученных экологических модельных организмов. Дафнии — это планктонные ракообразные с циклическим партеногенетическим жизненным циклом. Они распространены практически по всему миру, обитая в пресных и солоноватых водоемах со стоячей водой от небольших временных прудов до крупных озер. Их преимущественно бесполое размножение позволяет изучать фенотипы, исключая генетические вариации, что дает возможность отделять генетические эффекты от негенетических. Дафнии часто используются в исследованиях, связанных с экотоксикологией, защитой от хищников, взаимодействием хозяина и паразита, фенотипической пластичностью, и все чаще — в эволюционной геномике. Наиболее часто изучаемыми видами являются *D. magna* и *D. pulex*, для которых доступно быстро растущее число генетических и геномных инструментов (Shaw J.R. и соавт., 2008).

Группа индийских ученых разработала простую модель на беспозвоночных животных для быстрого скрининга кардиотоксичности противораковых химиотерапевтических препаратов. *D. magna* (водяная блоха, ракообразное) имеет прозрачное тело и большое миогенное сердце, которое можно легко контролировать под микроскопом. Они описали сравнительную кардиотоксичность нескольких ингибиторов тирозинкиназы, которые впоследствии были одобрены для лечения нескольких видов рака (Mohammed Q.K.Q. и соавт., 2024).

Важно помнить, что дафнии активно используются и как тест-система для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных экстрактов из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления методом прямого счета, основанного на определении смертности дафний (*D. magna*). Критерием острой токсичности служит гибель 50% и более дафний за 48 ч в исследуемой пробе при условии, что в контрольном эксперименте все рачки сохраняют свою жизнеспособность (Методика определения острой токсичности, 2011).

Обыкновенный прудовик (*Lymnaea stagnalis*), новозеландская грязевая улитка (*Potamopyrgus antipodarum*)

Хорошо известно, что брюхоногие моллюски являются удобными моделями для изучения молекулярных и клеточных механизмов нейронной функции и дисфункции. Среди них следует обратить внимание на прудовика (*Lymnaea stagnalis*) — легочного брюхоногого моллюска, широко используемого в качестве модельной системы в фундаментальных и прикладных исследованиях нейробиологии (Mita K. и соавт., 2014). *L. stagnalis* — полезная модель для интегративного молекулярно-поведенческого исследования памяти и обучения (Kemenes G., 2008).

С увеличением продолжительности жизни нормальное старение и возрастное ухудшение памяти затрагивают все большее число людей; однако многие аспекты этих процессов до сих пор не полностью изучены. Модели, основанные на исследовании механизмов нейрональной коммуникации у большого прудовика, оказались чрезвычайно продуктивными для понимания механизмов старения на уровне идентифицированных нейронов и нейронных генераторов, ответственных за определенные типы моторного поведения. Достаточно просто устроенная нервная система, хорошо охарактеризованный жизненный цикл и относительно большая продолжительность жизни (2–5 лет) делают большого прудовика идеальным организмом для изучения возрастных изменений в нервной системе.

Сотрудник Института биологии и развития им. Н.К. Кольцова РАН Антон Игоревич Богомолов выступил с докладом («Клеточные контакты и движение клеточных пластов в целостной тест-системе развивавшегося зародыша большого прудовика») о клеточных контактах и движении клеточных пластов в целостной тест-системе развивающегося зародыша большого прудовика. Антон Игоревич в своем докладе сообщил, в каких тестах может быть использована модель большого прудовика — в нейробиологии, токсикологии, поведенческих тестах, а также в исследованиях процесса старения. Зародыш большого прудовика предлагается в качестве модельной системы для изучения эмбриогенеза, канцерогенеза и тератогенеза. На модели большого прудовика проводятся исследования морфологии клеток во время гаструляционных морфогенезов, разнообразия клеточных контактов, локализации и распределения молекулярно-генетических транскрипционных факторов. В докладе были обозначены перспективы большого прудовика как адекватной модели для дешевого и быстрого скрининга в ходе различных фармакологических исследований — разработаны протоколы содержания и работы с эмбрионами *L. stagnalis*, описан профиль экспрессии генов, определен метод внесения генетического материала в зиготу. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-14-00375.

С докладом «Древнейшие многоклеточные и личинки беспозвоночных как модель для изучения нерецепторной (внутриклеточной) роли серотонина и дофамина» выступила руководитель лаборатории сравнительной физиологии развития Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН Елена Евгеньевна Воронежская. Были представлены перспективы использования моделей древнейших беспозвоночных, еще не имеющих дифференцированных нервных клеток, для исследования механизмов действия нейромедиаторов серотонина и дофамина. Представители губок и личинки морских ежей являются уникальными объектами, так как позволяют исследовать не только классические рецепторные механизмы действия серотонина и дофамина, но и их неклассические, внутриклеточные механизмы, опосредованные посттрансляционной модификацией белков. Известно, что серотонин и дофамин участвуют в регуляции развития, начиная с самых ранних стадий, в формировании ресничных структур как моноцилиарных, так и полицилиарных клеток. Моноцилиарные клетки являются чрезвычайно консервативной структурой, которая сохраняется практически без изменений во многих тканях взрослых беспозвоночных и позвоночных животных, обеспечивая выполнение множества жизненно важных функций.

В докладе используемой тест-системой являлись личинки морских ежей (*Paracentrotus lividus*, *Mesocentrotus nudus*). Распространение популяции идет за счет планктонных личинок, имеющих специализированные цилиарные структуры, с помощью которых они передвигаются в толще воды и собирают пищу. В основании каждой подвижной реснички расположена ненейрональная структура, содержащая дофамин и серотонин. От уровня этих веществ зависит скорость роста и регенерации реснички при повреждении. Именно поэтому данные организмы могут являться целостной тест-системой для исследования роли моноаминов в регуляции цилиокинеза, а также проведения быстрого скрининга веществ с целью определения характера воздействия на рост ресничек (Gage M., 1998).

В качестве другой используемой тест-системы, для которой характерно наличие моноцилиарных клеток, является древний тип многоклеточных животных — губки (*Porifera*). Организация губок своеобразна и не имеет аналогов среди других позвоночных. У них пористая поверхность и паренхиматозное, часто асимметричное тело, пронизанное каналами водоносной системы. Важнейший элемент этой системы — камеры, выстланные жгутиковыми воротничковыми клетками хоаноцитами, также содержащими в основании дофамин и серотонин. Немаловажным преимуществом губок в качестве используемой тест-системы является то, что для них характерно отсутствие рецепторов моноаминов при наличии практически всех остальных элементов пути синтеза моноаминов, это показано при анализе транскриптомов и геномов губок (Gu N. и соав., 2019). При этом губки реагируют на аппликацию внешних моноаминов. Такой уникальный набор свойств позволяет использовать эту модель для исследования нерецепторного действия моноаминов. Поскольку губки — эволюционно древняя группа животных, древнейшие многоклеточные, это позволяет проводить на них поиск эволюционно консервативных механизмов действия нейротрансмиттеров.

Большим плюсом данных моделей является то, что у позвоночных найти клетки, в которых бы не было рецепторов серотонина и дофамина, достаточно сложно, поэтому на других модельных объектах или культурах клеток позвоночных животных разделить рецепторные и внутриклеточные (посттрансляционная модификация белков) эффекты действия моноаминоподобных фармакологических веществ очень проблематично.

Птицы

Агентство по охране окружающей среды США (United States Environmental Protection Agency, USEPA) уже давно требует проведения исследований острой пероральной токсичности веществ, поступающих в пищу для птиц. Дикие птицы, которые живут и питаются в сельскохозяйственных регионах, потенциально подвержены воздействию средств, используемых для защиты сельскохозяйственных культур от различных вредителей и болезней. На птиц могут действовать пестициды либо при поедании самой обработанной культуры, либо беспозвоночных и сорняков (и их семян), которые присутствуют в культуре. Они также могут подвергнуться воздействию менее очевидными путями: поедание рыбы, обитающей в водоемах, подвергшихся

загрязнению средствами защиты растений, попавших туда с окружающих сельскохозяйственных территорий, или же питье воды из луж на посевах, содержащих остатки пестицидов.

Куры применяются для оценки общих токсических свойств лекарственных средств и нейротоксических эффектов. Так, для определения нейротоксичности ингибиторов ацетилхолинэстеразы целесообразно использовать кур, поскольку у них и человека под влиянием этих препаратов происходят схожие гистопатологические изменения и развиваются однотипные нейропатии (Макарова М.Н. и соавт., 2017). Современные методы доклинических исследований также включают в себя использование различных биохимических, молекулярно-генетических и иммунологических методов анализа, что позволяет более точно и детально изучать механизмы развития и прогрессирования различных заболеваний.

Куринные эмбрионы служат моделью для экспериментального изучения физиологии и патологии сердечно-сосудистой системы, а также механизмов миграции и инвазии клеток меланомы.

Еще одно направление использования птиц в доклинических исследованиях — иммунология. Из желтков яиц птиц (курицы, перепелки, утки, гуся, страуса) выделяют иммуноглобулины (IgY-антитела) и применяют их в диагностике, терапии и профилактике заболеваний человека и животных (Каплин В.С., Каплина О.Н., 2023).

Также куриные эмбрионы служат моделью для молекулярного анализа рака, в частности, вирусного онкогенеза, канцерогенеза, ксенотрансплантации опухоли и метастазирования рака. Взрослая курица тоже внесла значительный вклад в развитие науки. Путем инокуляции цыплят бактериями холеры (*Pasteurella multocida*) из разросшейся и, следовательно, ослабленной культуры Луи Пастер (1860-е годы) изобрел первую полученную в лабораторных условиях ослабленную вакцину (Kain K.H. и соавт., 2014).

Медоносные пчелы (*Apis mellifera L.*)

Отдельным направлением использования протоколов OECD является изучение экологической токсичности с использованием в качестве тест-систем медоносных пчел и их личинок. Медоносные пчелы — сложные эусоциальные насекомые, которые вносят решающий вклад в производство сельскохозяйственных продуктов питания для человека. Глобальное сокращение численности опылителей (медоносных пчел, шмелей, одиночных пчел) — актуальная тема для исследований, поскольку эти насекомые играют ключевую роль в растениеводстве и производстве продуктов питания, а также в поддержании биоразнообразия растений. Особое внимание общественности уделяется средствам защиты растений, и регулирующие органы по всему миру ввели новые требования к тестированию для оценки экологического риска этих веществ, поскольку опылители уязвимы к воздействию пестицидов (Manzoor F., Pervez M., 2021).

Медоносные пчелы (*A. mellifera*) могут подвергаться воздействию пестицидов различными путями: при контакте с растительными поверхностями, пероральным путем через загрязненную пищу или воду, а также напрямую во время сельскохо-

зяйственных обработок. Если схема применения пестицидов предполагает потенциальное влияние на медоносных пчел, для их регистрации необходимо провести исследования, посвященные пероральной токсичности (Kessler S. и соавт., 2015). Пчелы могут контактировать со средствами защиты растений после распыления как непосредственно, так и путем потребления загрязненной пыльцы и нектара. В связи с этим лабораторные испытания с участием пчел для оценки острой пероральной и контактной токсичности (методы OECD 213 и 214) являются важными элементами экологической оценки риска. Однако сценарии однократного острого воздействия не полностью отражают реальную ситуацию, поскольку хроническое пероральное потребление пыльцы и нектара с обработанных пестицидами растений может привести к сублетальным эффектам, проявляющимся в нарушении пищевого поведения, развитии, размножении, пространственной ориентации, в снижении иммунитета, сокращении продолжительности жизни и нарушении социальных взаимодействий. Следовательно, тест на хроническое кормление представляет собой дополнительное лабораторное испытание, позволяющее оценить последствия 10-дневного перорального воздействия средств защиты растений на взрослых пчел (Калинникова Т. Б. и соавт., 2024).

Дрозофила (*Drosophila melanogaster*)

Плодовая мушка *D. melanogaster* широко используется в качестве генетической модели организма в биомедицинских исследованиях более 100 лет. Это значительно повлияло на наше понимание широкого спектра биологических процессов, включая генетику, наследование, эмбриональное развитие, обучение и поведение. Существует множество преимуществ, которые делают дрозофилу привлекательным модельным организмом, — простота обслуживания, экономичность, меньше этических ограничений и доступность большого и сложного генетического инструментария. Геном дрозофилы был полностью секвенирован, он включает около 13 600 генов, кодирующих белки, которые распределены по четырем хромосомам. Примерно 75% всех генов, связанных с заболеваниями человека, имеет ортолог у мухи, что делает ее ценным модельным организмом для изучения болезней человека. Короткий жизненный цикл (10 дней при 25 °C) дрозофилы состоит из четырех стадий развития: эмбрион, личинка, куколка и взрослая особь. Помимо короткого времени генерации, большое количество потомства облегчает статистический анализ (Fischer F.P. и соавт., 2023). Мозг взрослой мухи включает около 100 000 нейронов, которые образуют дискретные цепи, ответственные за сложное поведение, такое как ухаживание, сон, циркадные ритмы, обучение и память. Хотя анатомическое строение мозга мухи значительно отличается от такового у человека, многие фундаментальные функции нейронов, например, возбудимость мембран, ионные каналы, управляемые напряжением, и рецепторы нейротрансмиттеров, в высокой степени консервативны между двумя видами (Jennings B.H., 2011).

Одним из наиболее ярких преимуществ модели мухи является доступность большого и сложного набора генетических инструментов. Химические агенты, например, этилметилсульфонат, или рентгеновское излучение, могут быть использованы

для внесения случайных мутаций в геном мухи. Полученные мутагенизированные мухи затем могут быть исследованы на предмет интересующего поведенческого фенотипа. Такие генетические скрининги — подходящий метод для изучения заболеваний, генетические основы которых не были выяснены. И наоборот, конкретный интересующий ген можно оценить на предмет его фенотипических функций с помощью нокдауна, опосредованного РНК-интерференцией (RNAi), или сверхэкспрессии гена. Кроме того, доступны многочисленные генетические инструменты для облегчения точного редактирования генома, включая переносимые P-элементы, гомологичную рекомбинацию и CRISPR/Cas9. Эти методы могут быть легко использованы для изучения причинно-следственной связи редких вариантов заболевания, обнаруженных у пациентов-людей. Общепринятый подход заключается в отключении у дрозофилы ортолога соответствующего человеческого гена и анализе полученного фенотипа. Если наблюдается фенотипическое изменение, впоследствии экспрессируются кДНК дикого типа и вариант человеческой кДНК. Причинная природа варианта может быть подтверждена, если наблюдаемый фенотип улучшен диким типом, но не вариантом кДНК. Все эти аспекты и методы позиционируют дрозофилу как мощный модельный организм, который изучается при широком спектре заболеваний человека, включая болезнь Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона, боковой амиотрофический склероз, опухоли головного мозга и эпилепсию (Fischer F.P. и соавт., 2023).

Хирономиды, комары-звонцы (*Chironomidae*)

Chironomidae — водные насекомые, которые стали моделью в лабораторных испытаниях для оценки токсического воздействия различных загрязняющих веществ. Использование хирономид в качестве тестовых организмов зависит от стандартных протоколов выращивания в лабораторных условиях и расширения знаний об их биологии. *Chironomus* sp. — широко распространенный вид пресноводных двукрылых, личинки которых, обитающие в донных отложениях, обычно используются в долгосрочных лабораторных тестах. Хирономиды считаются экологически значимыми из-за их широкого распространения, численного обилия и важности в качестве добычи для рыб. Тесты на острую токсичность хирономид проводятся агрохимической промышленностью в течение уже ряда лет. Это было обусловлено европейскими требованиями к тестированию, в соответствии с которыми для инсектицидов с определенным механизмом действия может потребоваться повторное тестирование на водных беспозвоночных (Weltje L. и соавт., 2010).

Belgica antarctica (*Diptera: Chironomidae*), короткокрылая мошка, эндемичная для морской Антарктики, была впервые описана в 1900 г. За более чем столетие исследований было собрано огромное количество информации об этом виде, охватывающей его экологию и биологию, жизненный цикл и размножение, политенные хромосомы, физиологию и биохимию. В 2014 г. геном *B. antarctica* был секвенирован, что еще больше стимулировало исследования. Определенные стадии развития можно успешно культивировать в лабораторных условиях. В совокупности это богатство информации позволяет рассматривать этот вид как естественный

модельный организм для изучения адаптации и функционирования в экстремальных условиях (Kozeretska I. и совт., 2022).

Для изучения влияния фармацевтических препаратов используют еще в качестве тест-систем навозных мух [(желтая навозная муха (*Scathophaga stercoraria L.*)], осеннюю комнатную муху [*Musca autumnalis De Geer* (*Muscidae*)], поскольку в рамках изучения экотоксичности они являются подходящими индикаторными видами для оценки воздействия противопаразитарных средств, что охватывают широкий географический диапазон. В рамках доклинических исследований с использованием этой тест-системы проводят изучение эмбриональной токсичности фармацевтических препаратов, поскольку данный вид имеет много поколений в своем развитии, не проходит облигатной диапаузы, легко культивируется и у него короткий цикл развития, позволяющий оценить влияние на развитие и выживаемость в лабораторных условиях (Gill R.J. и соавт., 2014).

Земляной шмель (*Bombus terrestris L.*)

B. terrestris являются столь же эффективными опылителями, как и медоносные пчелы, особенно для растений с трубчатыми цветами, благодаря своей уникальной возможности к вибрационному опылению. Кроме того, шмели способны опылять цветы разнообразных форм, включая те, которые недоступны для медоносных пчел из-за их размера.

В исследовании 2014 г., опубликованном в журнале «Функциональная экология», ученые, использовавшие технологию радиочастотной идентификации (RFID) для мечения пчел, обнаружили, что сублетальное воздействие неоникотиноида (имидаклоприда) и/или пиретроида в течение 4 нед привело к ухудшению способности шмелей добывать пищу. Исследование, опубликованное в 2015 г., показало, что пчелы предпочитают растворы, содержащие неоникотиноиды, даже несмотря на то что из-за потребления этих пестицидов они в целом едят меньше. Эта работа показывает, что обработка цветущих культур такими пестицидами представляет значительную опасность для пчел-опылителей (Kessler S.C. и соавт., 2015).

Дождевые и почвенные черви, коллемболы (*Collembola*)

Протоколы OECD позволяют оценить экологическую токсичность на почвенный биоценоз с использованием такой тест-системы, как дождевые черви, почвенные клещи и коллемболы. Дождевые черви участвуют в разложении почвенной подстилки, улучшают плодородие почвы и ее микроструктуру. Таким образом, дождевые черви используются в качестве стандартного тестируемого вида для исследования воздействия вещества, которое наносится на почву или применяется при загрязнении почвы. На первом этапе проводится тестирование на острую токсичность. Стойкие вещества или вещества, применяемые несколько раз за сезон, вызывают более длительное воздействие на сообщество дождевых червей. В этих случаях требуется проведение исследования сублетального воздействия.

Хищные почвенные клещи считаются важными биологическими индикаторами для оценки потенциального воздействия средств защиты растений. Они широко распространены в различных местах обитаниях, играют заметную роль в сообществе членистоногих и представляют дополнительный трофический уровень по сравнению с наземными видами, для которых уже имеются рекомендации.

Коллемболы многочисленны в агроэкосистемах умеренного климата и являются важным трофическим звеном в почвенных сообществах: они питаются микроорганизмами, тогда как их потребляют большое количество разнообразных хищных членистоногих и некоторые насекомоядные позвоночные. Таким образом, их распространение и численность на пахотных полях влияют на круговорот питательных веществ и продуктивность растений, а также на пространственное размещение и численность хищников. Учитывая их трофическое положение в агроэкосистемах, поддержание сообществ коллембол является серьезной проблемой. Хотя они менее известны, чем дождевые черви, их разнообразие, обилие в почве и простота содержания в лабораторных условиях (короткое время генерации) оправдывают их использование в экотоксикологии (Chen J. и соавт., 2007).

В случае дождевых червей рекомендуемыми тестами являются OECD 207 — тест на острую токсичность дождевых червей и OECD 222 — тест на размножение дождевых червей (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*). В первом случае рекомендуемым видом является *E. fetida*, а тест заключается в том, что червей помещают в искусственную почву с химическим веществом и анализируют результаты через 7 и 14 дней воздействия; во втором случае основная цель — проанализировать репродуктивную способность *E. fetida* или *E. andrei* в течение 4 недель. В итоге можно получить значения NOEC (no observed effect concentration, концентрация, не вызывающая видимого эффекта) и EC50. Кроме того, требуются некоторые исследования наземных микроорганизмов, таких как почвенные микроорганизмы или растения, в зависимости от количества тонн, продаваемых в год. В случае почвенных микроорганизмов используются тесты OECD 216 «Почвенные микроорганизмы: трансформация азота» и OECD 217 «Почвенные микроорганизмы: трансформация углерода». Эти тесты используются для анализа долгосрочного воздействия химических веществ на активность почвенных микроорганизмов по трансформации азота и углерода соответственно.

Еще одно направление для исследования экотоксичности — тестирование веществ, являющихся потенциальными эндокринными дизрапторами (Крышень К.Л. и соавт., 2023). Определение потенциальной эндокринной опасности химических веществ, вызывающих нарушение работы окружающей среды, является нормативным стандартом для многих стран (Hecker M. и соавт., 2011). Однако из-за адаптивной природы эндокринной системы, отсутствия единого метода, способного идентифицировать эндокринные нарушения у взрослых и ювенильных организмов, выполнение нормативных требований, необходимых для идентификации химического вещества как эндокринного разрушителя, является сложной задачей. В настоящее время существует множество валидированных нормативных тестов, которые могут использоваться для получения доказательств того, что химическое вещество влияет на эстрогенные, андрогенные и стероидогенные пути позвоночных. Анализы, использующие в качестве тест-системы рыб и амфибий, обеспечивают комплекс-

ный скрининг различных гормональных функций (включая андрогены, эстрогены и гормоны щитовидной железы). Тестирование эндокринных разрушителей должно включать также тесты на развитие и воспроизводство рыбы, в то время как тест на полный жизненный цикл может быть впоследствии использован для уточнения оценок риска для водных организмов, когда это необходимо. Что касается оценки риска для птиц, то новое руководство OECD по тестированию репродукции японских перепелов обеспечивает ценную основу для разработки теста для выявления эндокринно-опосредованных репродуктивных эффектов. Для водных и наземных беспозвоночных данные существующих тестов развития и репродукции по-прежнему имеют большое значение для оценки экологического риска. Высокий приоритет следует уделять исследованиям сравнительной эндокринной физиологии беспозвоночных для поддержания экстраполяции данных на эту разнообразную фауну.

Большая восковая моль (*Galleria mellonella L.*)

Николай Дмитриевич Шамаев в своем докладе на конференции GLP-PLANET 2024 «Потенциальные различия врожденного иммунного ответа среди популяций *Galleria mellonella*» сообщил, как генетическая изменчивость биогеографически обусловленного внутривидового разнообразия дает важную информацию об имеющихся потенциальных различиях в иммунном ответе у вида, широко используемого в лабораториях и распространенного по всему миру.

Большая восковая моль (*G. mellonella*) — это модельный организм, не относящийся к млекопитающим, который обычно используется в исследованиях вирулентности и патогенности различных инфекционных агентов.

Модельный организм *G. mellonella* может размножаться в лабораторных условиях и, как известно, заселяет ульи, перемещается по различным экосистемам и служит источником патогенов для медоносных пчел. Известно, что микроспоридии видов *Vairimorpha* патогенны для медоносной пчелы *A. mellifera* (Мукминов М.Н. и соавт., 2024). Ранее способность колонизации *V. ceranae* и *V. apis* (Shamaev N. D. и соавт., 2024b; Шамаев Н.Д. и соавт., 2024a) была исследована на *G. mellonella*, а результаты продемонстрировали отсутствие смертности и устойчивость большой восковой моли. Неудивительно, что *G. mellonella* может существовать в среде с патогенами медоносных пчел, однако существуют различные популяции большой восковой моли, которые могут иметь другой врожденный иммунный ответ на патогены медоносных пчел. Была использована одна экспериментальная группа *G. mellonella*, зараженная разным количеством спор вида *Vairimorpha*, извлеченных из естественно инфицированных медоносных пчел. Внешние жизненные показатели были оценены по морфологическим признакам, например, возникновению меланизации разных уровней, а также по активности и поведению. После заражения (согласно рекомендациям OECD 237) по истечении постинфекционного периода был произведен забор гемолимфы, и выполнен электрофорез с анализом белковых фракций. Нагрузка патогеном более 1,7 млн спор микроспоридий выявила высокий уровень смертности личинок насекомого, тогда как снижение активности было замечено при минимальной споровой нагрузке в 400 тыс. спор (Shamaev N. D. и соавт., 2024).

Заключение

Практическое применение результатов экспериментов на рыбах, насекомых и пчелах в доклинической практике заключается в разработке стратегий охраны окружающей среды, улучшении безопасности пищевых продуктов, прогнозировании токсичности фармацевтических субстанций и развитии новых лекарственных препаратов, с целью уменьшения количества используемых позвоночных. Полученные данные могут быть использованы для принятия решений в области охраны окружающей среды, здравоохранения и сельского хозяйства с учетом потенциальных рисков для животных и людей. Развитие науки открывает новые перспективы, предлагая альтернативные модели, основанные на использовании рыб и насекомых. Такие модели при правильном применении могут значительно снизить количество животных, необходимых для исследования, и при этом обеспечить получение релевантных результатов. Преимущества использования рыб и насекомых заключается прежде всего в их низкой стоимости, легком разведении и содержании. Все это делает исследования более доступными при ограниченном бюджете. Также это позволяет одновременно проводить эксперименты на большом количестве особей, что обеспечивает получение более статистически значимых результатов. Это особенно актуально для скрининга большого количества фармацевтических субстанций. Рыбы, особенно зебрафиш, легко поддаются генетическим модификациям, это позволяет создавать модели заболеваний человека и рассматривать влияние лекарственных препаратов уже на конкретные генетические пути.

Доклинические исследования с участием рыб и насекомых представляют собой перспективное направление, способное значительно улучшить эффективность и этичность процесса разработки новых лекарственных средств. Однако важно помнить о необходимости правильного выбора модели, процедуры валидации и анализа результатов исследования. Только комплексный подход, учитывающий все эти факторы, позволит максимально качественно использовать потенциал этих альтернативных моделей.

Беспозвоночные животные, такие как моллюски, морские ежи, губки, представляют собой уникальные модели, позволяющие исследовать регуляторные механизмы биологически активных веществ на целостной системе, в которой сохранены все клеточные коммуникации и взаимодействия. Сравнительный анализ позволяет проводить поиск эволюционно консервативных механизмов действия нейроактивных веществ, а легкость содержания и получения большого количества однородного материала — проводить быстрый и дешевый скрининг разрабатываемых фармакологических препаратов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калуев А.В. Трансляционная нейробиология Зебраданио (Zebrafish): малые молекулы, нейромедиаторы, цитокины и мозговые гены / А. В. Калуев // Сборник тезисов XXIV съезда физиологического общества им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 11–15 сентября 2023 года. Санкт-Петербург: ООО «Издательство ВВМ». 2023. С. 189–190.

2. Калуев А.В., Котова М.М., Икрин А.Н., Колесникова Т.О. Применение зебраданио (zebrafish) в доклинических исследованиях лекарственных средств: проблемы и перспективы // Безопасность и риск фармакотерапии. 2023. № 11. Т. 3. С. 303–321.
3. Lachowicz J., Niedziałek K., Rostkowska E. et al. Zebrafish as an Animal Model for Testing Agents with Antidepressant Potential // Life. 2021. Vol. 11. P. 792. DOI: 10.3390/life11080792.
4. Kalueff A.V., Stewart A.M., Gerlai R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders // Trends Pharmacol. Sci. 2014. Vol. 35. N. 2. P. 63–75. DOI: 10.1016/J.TIPS.2013.12.002.
5. Shima A., Mitani H. Medaka as a research organism: past, present and future // Mech. Dev. 2004. Vol. 121. N. 7–8. P. 599–604. DOI: 10.1016/j.mod.2004.03.011.
6. Nor Azra M., Noor M.I.M., Tan M.P. et al. Zebrafish and Medaka as model organisms for climate change research: Global literature scientometric analysis // Frontiers in Earth Science. 2022. N. 10. P. 988710. DOI: 10.3389/feart.2022.988710.
7. Iwai T., Inoue S., Kotani T. et al. Production of transgenic medaka fish carrying fluorescent nuclei and chromosomes // Zoological science. 2009. Vol. 26. N. 1. P. 9–16. DOI: 10.2108/zsj.26.9.
8. Carotenuto R., Pallotta M.M., Tussellino M. et al. Xenopus laevis (Daudin, 1802) as a model organism for bioscience: A historic review and perspective // Biology. 2023. Vol. 12. N. 6. P. 890. DOI: 10.3390/biology12060890.
9. Murugan N.J., Vigran H.J., Miller K.A. et al. Acute multidrug delivery via a wearable bioreactor facilitates long-term limb regeneration and functional recovery in adult *Xenopus laevis* // Science advances. 2022. Vol. 8. N. 4. P. 488–492. DOI: 10.1126/sciadv.abj2164.
10. Blackiston D., Lederer E., Kriegman S. et al. A cellular platform for the development of synthetic living machines // Science advances. 2021. Vol. 52. N. 6. P. 890–902. DOI: 10.1126/scirobotics.abf1571.
11. Demircan T., Hacıbektaşoğlu H., Sibai M. et al. Preclinical molecular signatures of spinal cord functional restoration: Optimizing the metamorphic axolotl (*Ambystoma mexicanum*) model in regenerative medicine // OMICS: A Journal of Integrative Biology. 2020. Vol. 24. N. 6. P. 370–378. DOI: 10.1089/omi.2020.0024.
12. Shaw J.R., Shaw J.R., Pfrender M.E. et al. Daphnia as an emerging model for toxicological genomics // Advances in Experimental Biology. 2008. Vol. 2. P. 165–328. DOI: 10.1016/S1872-2423(08)00005-7.
13. Mohammed Q.K.Q., Kancha R.K. Evaluation of Cardiotoxicity of Cancer Chemotherapeutics Using Daphnia magna as a Preclinical Model // Current Protocols. 2024. Vol. 4. N. 10. P. e70035. DOI: 10.1002/cpz1.70035.
14. Методика определения острой токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по смертности дафний. ПНД ФТ 14.1:2:4.12-06. URL: https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293772/4293772638.pdf (дата обращения: 10.2024).
15. Mita K., Yamagishi M., Fujito Y. et al. An increase in insulin is important for the acquisition conditioned taste aversion in Lymnaea // Neurobiology of learning and memory. 2014. Vol. 116. P. 132–138. DOI: 10.1016/j.nlm.2014.10.006.

16. Gage M. Mammalian sperm motility // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 1998. Vol. 265. N. 1391. P. 97–103. DOI: 10.1098/rspb.1998.0269.
17. Gu N., Zhao W.L., Wang G.S. et al. Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility // Reproductive Biology and Endocrinology. 2019. Vol. 17. N. 1. P. 66. DOI: 10.1186/s12958-019-0510-y.
18. Макарова М.Н., Макаров В.Г., Шекунова Е.В. Методические подходы к оценке нейротоксичности фармакологических веществ // Ведомости НЦЭСМП. 2017. № 2. С. 111–116.
19. Макарова М.Н., Макаров В.Г., Шекунова Е.В. Выбор вида животных для оценки нейротоксичности фармакологических веществ // Международный вестник ветеринарии. 2017. № 2. С. 106–113.
20. Kain K.H., Miller J.W., Jones-Paris C.R. et al. The chick embryo as an expanding experimental model for cancer and cardiovascular research // Developmental Dynamics. 2014. Vol. 243. N. 2. P. 216–228. DOI: 10.1002/dvdy.24093.
21. Каплин В.С., Каплина О.Н. Применение желточных антител птиц в медико-биологических исследованиях // Лабораторные животные для научных исследований. 2023. № 3. С. 54–66.
22. Manzoor F., Pervez M. Pesticide impact on honey bees declines and emerging food security crisis // Global Decline of Insects. 2021. URL: https://www.intechopen.com/chapters/77657 (дата обращения: 10.2024).
23. Kessler S., Tiedeken E.J., Simcock K.L. et al. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides // Nature. 2015. Vol. 521. N. 7550. P. 74–76. DOI: 10.1038/nature14414.
24. Kemenes G. Molecular mechanisms of associative learning: lymnaea. 2008. DOI: 10.1016/B978-012370509-9.00011-5.
25. Калинникова Т.Б., Гатиятуллина А.Ф., Егорова А.В. Токсическое действие пестицидов на пчел обзор // Российский журнал прикладной экологии. 2021. Т. 3. № 27. С. 50–57.
26. Fischer F.P., Karge R.A., Weber Y.G. et al. Drosophila melanogaster as a versatile model organism to study genetic epilepsies: an overview // Frontiers in Molecular Neuroscience. 2023. Vol. 16. P. 1–17. DOI: 10.3389/fnmol.2023.1116000.
27. Jennings B.H. Drosophila — a versatile model in biology & medicine // Materials today. 2011. Vol. 14. N. 5. P. 190–195. DOI: 10.1016/S1369-7021(11)70113-4.
28. Weltje L., Rufli H., Heimbach F. et al. The chironomid acute toxicity test: development of a new test system // Integr. Environ. Assess Manag. 2010. Vol. 6. N. 2. P. 301–307. DOI: 10.1897/IEAM_2009-069.1.
29. Kozeretska I., Serga S., Kovalenko P. et al. *Belgica antarctica* (*Diptera: Chironomidae*): A natural model organism for extreme environments // Insect. Sci. 2022. Vol. 29. N. 1. P. 2–20. DOI: 10.1111/1744-7917.12925.
30. Gill Richard J., Nigel E., Raine. Gill. Chronic impairment of bumblebee natural foraging behaviour induced by sublethal pesticide exposure // Functional Ecology. 2014. Vol. 28. P. 1459–1471. DOI: 10.1111/1365-2435.12292.
31. Kessler S., Tiedeken E.J., Simcock K.L. et al. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides // Nature. Vol. 521. N. 7550. P. 74–76. DOI: 10.1038/nature14414.
32. Chen Jianxiu, Ma Zhichun et al. Roles of springtails in soil ecosystem // Biodiversity Science. 2007. Vol. 15. N. 2. DOI: 10.1360/biodiv.060288.

33. Крышень К.Л., Фаустова Н.М., Макарова М.Н. и др. Эндокринные нарушения при применении лекарственных средств: подходы к доклинической оценке безопасности // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2023. № 1. С. 27–41.
34. Hecker M., Hollert H. Endocrine disruptor screening: regulatory perspectives and needs // Environmental Sciences Europe. 2011. Vol. 23. P. 1–14. DOI: 10.1186/2190-4715-23-15.
35. Мукминов М.Н. Микроспоридии, ассоциированные с инфекциями медоносных пчел / М.Н. Мукминов, Э.А. Шуралев и др. // Пчеловодство и апитерапия: актуальные вопросы, достижения и инновации: Материалы Международной научно-практической конференции, Рыбное, 15–16 декабря 2023 года. Рыбное: Федеральный научный центр пчеловодства, 2024. С. 113–118.
36. Shamaev N.D., Batanova T., Iwatake Yu. et al. Diversity of genes encoding immune-related GTPase B2 protein, an inherited element responsible for resistance against virulent Toxoplasma gondii strains, among wild Mus musculus in local area of Japan // Journal of Veterinary Medical Science. 2024. Vol. 86. N. 10. P. 1056–1062. DOI: 10.1292/jvms.24-0059.

Доклинические исследования *in vitro*

https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-9-7-s9

Я. В. Агацарская [1], Ю. А. Власова [2], А. П. Гуреев [3], П. И. Макаревич [4], Е. В. Свирщевская [5]

[1] *АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,*

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

[3] *ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»,*

[4] *МГУ имени М. В. Ломоносова,*

[5] *ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова» РАН*

Тесты с использованием клеточных линий — мощный инструмент в биомедицинских разработках, позволяющий проводить исследования in vitro, избегая этических и практических сложностей, связанных с экспериментами на животных или людях. На сегодняшний день в разработке и создании новых лекарственных препаратов наблюдается смещение вектора в сторону высокотехнологичных лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов, таких как генная и клеточная терапия, а также персонализированная медицина. Безусловно, создание и тестирование этих препаратов невозможно представить без использования культур клеток не только животных, но и человека.

1. Скрининг молекул-кандидатов — это, пожалуй, наиболее распространенное применение клеточных линий. Фармацевтические компании используют огромные библиотеки химических соединений, которые тестируются на клеточных линиях для выявления потенциальных лекарственных кандидатов. Например, для поиска ингибиторов фермента клетки, экспрессирующие этот фермент, инкубируют с различными молекулами. Активность фермента измеряется, а молекулы, подавляющие его активность, отбираются для дальнейшего изучения. Этот процесс позволяет быстро и эффективно отсеять неперспективные соединения, значительно сокращая время и затраты на разработку новых лекарств.
2. Первичная фармакодинамика: после выявления потенциального лекарственного кандидата клеточные линии используются для изучения его фармакодинамики. Это включает в себя анализ влияния молекулы на клеточные процессы, такие как рост, пролиферация, апоптоз, дифференцировка и экспрессия генов. Например, если молекула-кандидат предназначена для лечения рака, исследователи могут изучать ее влияние на рост опухолевых клеток *in vitro*, определяя, снижает ли она пролиферацию, индуцирует ли апоптоз (запрограммированную клеточную смерть) и изменяет ли экспрессию генов, связанных с ростом опухоли.

Для этого используются различные методы: пролиферативные тесты (MTT-тест), проточная цитометрия, иммуноблоттинг (вестерн-блоттинг), ПЦР в реальном времени (qPCR) и др.

3. Проницаемость в рамках фармакокинетики (ADME): ADME — аббревиатура, обозначающая абсорбцию, распределение, метаболизм и экскрецию лекарственного вещества. ADME-тесты используются для оценки способности молекулы проникать через биологические мембраны (абсорбция), распределяться в различных тканях (распределение), метаболизироваться ферментами (метаболизм) и выводиться из организма (экскреция). Для оценки проницаемости часто применяются модели клеточных монослоев, например, кишечного барьера (Caco-2-клетки) или гематоэнцефалического барьера (модели на основе эндотелиальных клеток). Эти модели позволяют оценить биодоступность лекарственного вещества, то есть определить, какое количество вещества может пройти через барьер клеток.
4. Цитотоксичность: определение цитотоксичности является ключевым этапом в разработке любого лекарственного препарата. Для противоопухолевых молекул-кандидатов отбор осуществляется на основе высокой токсичности, для чего определяется 50% ингибирующая пролиферация, клеток токсичность (IC50) препарата. Для различных регенеративных препаратов высокая токсичность нежелательна, и требуется определение соотношения эффективной и токсичной доз. Разные методы, такие как MTT-тест (оценка метаболической активности клеток), тест на высвобождение лактатдегидрогеназы (LDH) (определение степени повреждения клеточной мембраны) и проточная цитометрия (идентификация апоптоза и некроза), применяются для выявления уровня цитотоксичности и определения терапевтического индекса — соотношения между терапевтической и токсической дозами.
5. Модельные тесты: клеточные линии служат удобными моделями для изучения различных биологических процессов и заболеваний. Например, клеточные линии, полученные из опухолевых тканей, используются для изучения механизмов канцерогенеза и тестирования противораковых препаратов. Клетки, генетически модифицированные для моделирования генетических заболеваний, позволяют изучить патогенез этих заболеваний и разработать новые методы лечения. Использование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) открывает новые возможности для моделирования заболеваний *in vitro*, что дает возможность генерировать специфические клеточные типы, характерные для определенного заболевания [1]. В заключение следует отметить, что клеточные линии являются незаменимым инструментом в биомедицинских исследованиях, что позволяет проводить быстрые, экономически эффективные и этически приемлемые исследования в различных областях от разработки новых лекарств до изучения основных биологических процессов. Однако необходимо помнить, что клеточные линии являются упрощенными моделями биологических систем, причем результаты *in vitro* не всегда полностью коррелируют с результатами *in vivo*. Поэтому результаты исследований на клеточных линиях всегда должны подтверждаться дополнительными исследованиями на животных моделях или клиническими испытаниями.

Перспективы и новые подходы

Выступления на конференции GLP-PLANET V продемонстрировали актуальность и сложность применения клеточных линий в доклинических исследованиях. Основными проблемами использования клеточных линий являются перекрестная контаминация и заражение клеток микоплазменной инфекцией.

Перекрестная контаминация (кросс-контаминация) может возникать при одновременном пассировании нескольких клеточных линий в ламинарах. Случайное использование наконечников, ранее применявшихся для других культур, при переносе клеток, культивирование разных линий на планшетах за счет попадания капель с клетками из соседних культур; перепутанные крышки от флаконов и прочее может привести к занесению клеток другой линии в пересеваемую линию, такие случаи описаны [4]. Полезно иметь сток охарактеризованных замороженных клеток. После разморозки клеток следует с данной культурой работать индивидуально (не вносить в ламинар другие линии) и на 2–3-м пассаже вновь заморозить новый сток. При микроскопии кросс-контаминация может быть видна: клетки с разным набором молекул адгезии собираются в отдельные кластеры. При подозрении на кросс-контаминацию культуру следует выбрасывать и размораживать новый сток.

Микоплазмы попадают в культуру клеток из различных источников: сыворотка, инкубаторы, лабораторная одежда, человеческая речь вблизи ламинарного потока воздуха, при чихании, кашле и т.д. При работе с клеточными линиями необходимо надевать чистый лабораторный халат и маску; избегать разговоров во время работы в ламинаре; чаще менять перчатки во время работы. Средства для удаления микоплазмы являются производными антибиотиков семейства хинолонов и относятся к антибиотикам широкого спектра действия. Лечение может занять от нескольких недель до месяцев в зависимости от тяжести инфекции. Для удаления микоплазмы используют плазмоцин, ВМ Циклин, фторхинолон, ципрофлоксацин, ципробай, загам, байтрил, тетрациклин и др. Подробнее можно найти в обзоре Mycoplasma Contamination: Where Does It Come From and How to Prevent It.

Елена Викторовна Свирщевская, старший научный сотрудник, кандидат биологических наук ФГБУН «Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, в своем докладе «Биологические и иммунологические методы для доклинических исследований», подчеркнув уже отработанные методы в клеточной технологии, такие как МТТ-тест, ПЦР, проточная цитометрия и другие, акцентировала внимание на необходимости постоянной адаптации и оптимизации существующих протоколов. Постоянное появление новых клеточных линий, обогащенных генетическими модификациями, требует разработки новых маркеров и методов мониторинга их функционального состояния. Это не просто замена одного протокола на другой; это задача, требующая глубокого понимания клеточной биологии и тонкого баланса между стабильностью и адаптивностью исследовательских моделей.

Еще одной серьезной проблемой является доступность и стоимость клеточных культур. Получение высококачественных клеточных линий, особенно первичных клеток из человеческих тканей, является длительным и трудоемким процессом, требующим специального оборудования и высококвалифицированного персонала.

Кроме того, некоторые типы клеток, например стволовые, трудно культивировать и поддерживать в стабильном состоянии. Для решения этой проблемы активно разрабатываются методы получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (induced pluripotent stem cells, iPSC) из легкодоступных источников, таких как фибробласты кожи. Это позволяет обойти многие этические и практические ограничения, связанные с использованием эмбриональных стволовых клеток [2]. Наконец, важным аспектом является обеспечение биологической безопасности. Работа с клеточными культурами, особенно с человеческими клетками, требует соблюдения строгих правил безопасности, чтобы предотвратить контаминацию и избежать риска заражения. Необходимо использовать специализированные помещения с ламинарными боксами и автоклавами, а также соблюдать строгие протоколы предотвращения контаминации и утилизации отходов.

Юлия Александровна Власова, старший научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, в своем докладе «Изменения митохондриального метаболизма и дыхания в моделях мышечных клеток линии C2C12 нокаутных по гену *FLNC*» представила данные о влиянии нокаута гена *FLNC* на митохондриальный метаболизм в клеточной линии C2C12. Она детально описала методику измерения потребления кислорода и продуцирования аденозинтрифосфата (АТФ) в контрольной и экспериментальной группах, подкрепив свои выводы данными по разным показателям митохондриального дыхания, нормализованным по базальному дыханию и анализу уровня экспрессии генов белков, ассоциированных с митохондриями. Примечательно, что данные Ю.А. Власовой продемонстрировали не только снижение митохондриального дыхания, но и изменение экспрессии определенных белков внутримитохондриальной цепи переноса электронов, что указывает на возможность целенаправленного воздействия на специфические этапы энергетического обмена в мышцах при целевых мутациях.

Артем Петрович Гуреев, доцент Воронежского государственного университета, предложил альтернативный подход к оценке повреждения митохондриальной дезоксирибонуклеиновой кислоты (мтДНК) в своем докладе «Использование метода ПЦР длинных фрагментов для оценки количества повреждений мтДНК при различных патологиях». Использование метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) длинных фрагментов позволило обнаружить не только количество повреждений, но и их локализацию в геноме мтДНК. Это значительно улучшает возможности применения, основанные на специфичности метода по сравнению с традиционными подходами, базирующимися на анализе более длинных фрагментов ДНК. Артем Петрович продемонстрировал на примере нескольких патологических состояний, включая нейродегенеративные заболевания, как изменения в количестве и характере повреждений мтДНК могут служить биомаркерами для ранней диагностики и оценки эффективности лечения.

Доклад Павла Игоревича Макаревича, заведующего лабораторией МГУ им. М.В. Ломоносова, «Мезенхимные стромальные клетки как инструмент для поиска фармакологических мишеней в регенеративной медицине» открыл перспективу в регенеративной медицине, сосредоточившись на уникальных свойствах растворимых факторов, содержащихся в менструальной крови. Была продемонстрирована их способность подавлять трансформацию мезенхимных стромальных клеток (МСК) в миофиброб-

ласты — клетки, играющие ключевую роль в развитии фиброза. Это открытие имеет перспективы прикладного значения, учитывая, что фиброз — распространенное осложнение при различных заболеваниях — от сердечно-сосудистых патологий до хронических заболеваний печени и легких. Образование избыточного количества фиброзной ткани приводит к нарушению структуры и функции органов, значительно ухудшая качество жизни пациентов и снижая эффективность традиционных методов лечения. Ключевой момент доклада — универсальность действия растворимых факторов. Независимо от происхождения МСК (будь то костный мозг, жировая ткань или другие источники), эти факторы эффективно предотвращали их превращение в миофибробласты. Это говорит о существовании фундаментального механизма регуляции фиброгенеза, не зависящего от специфических свойств клеток-предшественников. Это открытие существенно расширяет потенциальные возможности применения данной технологии, делая ее перспективной для лечения широкого спектра фиброзных заболеваний. Дальнейшие исследования должны быть направлены на идентификацию и характеристику отдельных биоактивных молекул, входящих в состав растворимых факторов менструальной крови. Высокопроизводительный скрининг и масс-спектрометрия могут помочь выявить специфические белки, пептиды, цитокины или другие соединения, ответственные за ингибирование дифференцировки МСК в миофибробласты. Понимание молекулярных механизмов действия этих факторов является критическим шагом для разработки целенаправленных терапевтических стратегий. Разработка лекарственных препаратов на основе растворимых факторов менструальной крови обещает революционизировать лечение фиброзных заболеваний. В отличие от существующих методов, которые часто лишь замедляют прогрессирование фиброза, новый препарат может иметь целенаправленное действие, предотвращая образование фиброзной ткани на ранних стадиях заболевания. Это может привести к значительному улучшению прогноза для пациентов, страдающих от различных фиброзных патологий, повысив качество их жизни и продлив срок жизни.

Проблемы и пути их решения

Обширное использование клеточных линий без должного понимания вопросов стандартизации приводит к целому ряду проблем, решение которых является критически важным для прогресса в фармацевтической индустрии. Учитывая отсутствие на территории РФ рекомендаций по проведению клеточных анализов и стандартизированных подходов к тестированию, возникает множество проблем как на этапе доклинических исследований, так и на этапе изготовления клеточных продуктов. Данной тематике был посвящен доклад Яны Владимировны Агацарской, руководителя отдела молекулярной фармакологии АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», на тему «Основные проблемы клеточных проектов. Современные реалии и пути решения».

Как было сказано лектором, одной из главных проблем является обеспечение качества и воспроизводимости результатов. Культуры клеток — это живые системы, чрезвычайно чувствительные к различным факторам, включая состав питательной среды, температуру, уровень влажности, наличие контаминантов (бактерий, грибов, микоплазм) и даже механические воздействия. Любое изменение этих параметров

может существенно повлиять на поведение клеток, их метаболизм и, следовательно, на результаты экспериментов.

Эти проблемы затрагивают все аспекты процесса от получения и культивирования клеток до интерпретации полученных результатов. На этапе получения клеточных линий возникает проблема вариабельности. Различные партии клеток, даже полученных из одного источника, могут демонстрировать значительные различия в ростовых характеристиках, экспрессии генов и ответе на лекарственные препараты [2]. Это связано со множеством факторов, включая условия культивирования, пассирование клеток, генетическую нестабильность и накопление мутаций в процессе длительного культивирования. Отсутствие стандартизированных протоколов по криоконсервации и размораживанию клеток также вносит свой вклад в эту вариабельность. Результаты экспериментов, проведенных на разных партиях клеток, могут быть несопоставимы, что затрудняет воспроизводимость исследований и делает невозможным достоверное сравнение полученных данных [3].

Отсутствие стандартизации аутентификации клеточных линий является серьезной проблемой. Подмена клеточных линий, перекрестное загрязнение и использование неаутентичных клеток — распространенные явления, которые приводят к ошибочным результатам и потере времени и ресурсов [4]. Без надежных методов идентификации клеточных линий, основанных на молекулярно-генетическом анализе (например, STR-профилирование), существует высокий риск получения ложных результатов, которые могут исказить картину действия лекарственного препарата и привести к неверным выводам о его эффективности и безопасности. На этапе проведения экспериментов отсутствие стандартизированных протоколов культивирования, обработки и анализа клеток приводит к дополнительным трудностям.

Различные лаборатории могут использовать различные среды культивирования, методы пассирования, инкубаторы и аппаратуру, что опять влияет на воспроизводимость результатов [5, 6]. Отсутствие четких рекомендаций по объему клеточной популяции, времени экспозиции с лекарственными препаратами, методам оценки жизнеспособности клеток и другим параметрам делает сравнение данных между лабораториями крайне затруднительным. Кроме того, интерпретация результатов, полученных в клеточных исследованиях, также осложняется отсутствием стандартизированных критериев оценки.

Отсутствие единых методических рекомендаций по обработке и анализу данных приводит к субъективным интерпретациям и, как следствие, к различным выводам на основе одних и тех же данных. Это особенно актуально при оценке эффективности и токсичности лекарственных препаратов, где точность и объективность результатов имеют решающее значение. В итоге отсутствие стандартизации в клеточных исследованиях на территории РФ существенно тормозит развитие фармацевтической индустрии, приводит к несопоставимости результатов исследований, повышает затраты на проведение экспериментов и увеличивает риск получения ложных результатов.

Заключение

В заключение можно сказать, что решение проблем, связанных с использованием клеточных культур в разработке лекарственных препаратов, является сложной,

но крайне важной задачей. Развитие новых технологий, стандартизация процедур и междисциплинарный подход являются ключевыми факторами, обеспечивающими успешный прогресс в этой области и дальнейшее развитие высокотехнологичных лекарственных средств будущего.

Для решения этих проблем необходимо разработать и внедрить национальные стандарты и рекомендации по проведению клеточных анализов, включающие стандартизацию получения, культивирования, аутентификации, обработки и анализа клеточных линий, а также интерпретацию полученных результатов. Это потребует совместных усилий научного сообщества, регулирующих органов и фармацевтических компаний. Только комплексный подход к решению этой проблемы позволит обеспечить высокое качество и достоверность результатов клеточных исследований и ускорит разработку новых лекарственных препаратов.

На сессии было предложено создать перечень, в котором участникам клеточного сообщества будет предложена информация о площадках, способных оказать помощь в проведении сертифицированных исследований, а также в вопросах идентификации и стандартизации клеточных линий. Это очень актуальный в современных условиях проект, начало которому предложено положить в рамках коллективной монографии «Консультант GLP-PLANET. Мнение фармацевтической отрасли».

Перечень организаций, способных оказать помощь в проведении сертифицированных исследований, вопросах идентификации и стандартизации клеточных линий.

ООО «Морфолаб»

Направление деятельности. Цитологические и гистологические исследования (в том числе гисто-FISH). Морфологические исследования.

Контакты: г. Санкт-Петербург, проспект Полюстровский, д. 59 литера Ц, офис 4.
Email: morfology.lab@gmail.com
Тел.: +7 (812) 984-51-14

Центр трансгенеза и редактирования генома Института трансляционной биомедицины СПбГУ

Направление деятельности. Генотипирование клеточных линий (подбор праймеров и условий для ПЦР, секвенирование, анализ результатов).

Контакты: г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9.
Email: 1102.elena@gmail.com
Тел.: +7 (999) 232-92-58

Центр клеточных технологий общества с ограниченной ответственностью «Покровский банк стволовых клеток» (ООО «Покровский БСК»)

Направление деятельности. Выделение из тканей, культивирование, паспортизация клеточных культур человека. Работа с клетками и тканями животных по согласованию. Биобанкирование тканей, биологических жидкостей, культур клеток человека. STR-профилирование клеток человека, молекулярно-генетические ис-

следования (выделение нуклеиновых кислот, синтез кДНК, ПЦР, ПЦР Real-Time, секвенирование по Сэнгеру, капиллярный электрофорез). Диагностика орфанных заболеваний (создание тест-системы, диагностика), цитогенетические исследования (кариотипирование клеток крови, культур клеток, абортивного материала). Флюоресцентная гибридизация *in situ* на хромосомах, клетках, срезах тканей, исследования методом проточной цитометрии (иммунофенотипирование, определение иммунного статуса, метод активации базофилов и др.), иммуноферментный анализ, клинический анализ крови, биохимический анализ биологических жидкостей. Определение длины теломер.

Контакты: г. Санкт-Петербург, 199106, Большой проспект Васильевского острова, д. 85, к. 2.

Email: http://www.pokrovcell.ru

Тел.: + 7 (812) 336-50-02; +7 (964) 334-47-79

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новосадова Е.В. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: от получения до применения в биохимических и биомедицинских исследованиях // Успехи биологической химии. 2014. Т. 54. С. 3–38.
2. Safikhani Z., Smirnov P., Freeman M. et al. Revisiting inconsistency in large pharmacogenomic studies // F1000Res. 2016. N. 16(5). P. 2333.
3. Weiskirchen S., Schröder S.K., Buhl E.M. et al. A Beginner's Guide to Cell Culture: Practical Advice for Preventing Needless Problems // Cells. 2023. N. 12(5). P. 682. DOI: 10.3390/cells12050682.
4. Allen M., Bjerke M., Edlund H. et al. Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news // Sci. Transl. Med. 2016. N. 8(354). P. 354re3. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf6853.
5. Coté R.J. Aseptic technique for cell culture // Curr. Protoc. Cell Biol. 2001. Ch. 1(1.3.). DOI: 10.1002/0471143030.cb0103s00.
6. Schmid I., Lambert C., Ambrozak D. et al. International Society for Analytical Cytology biosafety standard for sorting of unfixed cells // Cytometry A. 2007. N. 71(6). P. 414–437. DOI: 10.1002/cyto.a.20390.

Тезисы конференции GLP-PLANET V

Исследования *in vitro* и *in vivo*: общие мишени

https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-9-7-t1

М.Е. Карпенко, С.С. Зыкова

ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России

Актуальность темы обусловлена важностью использования методов *in vivo* и *in vitro* в равной степени.

Цель работы

Сравнение исследований *in vivo* и *in vitro* на примере антиоксидантной активности.

В результате метаболических превращений веществ в организме человека образуются токсичные свободные радикалы. Они образуются в реакциях перекисного окисления липидов (ПОЛ), при метаболизме различных препаратов, внешних факторов. Образовавшись в организме, вступают во взаимодействие со структурами клетки, приводя к поражению мембран и других компартментов клеток [1].

Методы

Фотоэлектроколориметрия, модель жирового гепатоза, тетрахлорметан.

Наиболее распространенным методом определения антиоксидантной активности соединений выступает фотоэлектроколориметрический метод связывания хромоген-радикала. В качестве такового выступает дифенилпикрилгидразил (ДФПГ) — парамагнетик, который в растворах с pH 7,4 распадается на радикалы, цвет и интенсивность окраски которых меняется в присутствии других радикалов. Количественной оценкой антиоксидантной активности соединений в методе выступает убыль радикалов (*Q*, %) или ингибирующая концентрация (IC_{50}). Эталон сравнения в методе — тролокс. Данный метод *in vitro* обладает доступностью, при этом имеет и недостатки (упрощения при моделировании окислительного повреждения, а при изучении липофильных веществ, происходит разрушение гомогенности системы и нарушение подчинения закону Бугера — Ламберта — Бера). Известно, что весомый вклад в антиоксидантную защиту вносят ферменты супероксиддисмута-

за (СОД) и каталаза. С целью изучения цитопротекторного действия соединения 8,8-диметил-5-*n*-толил-8,9-дигидро-2*H*-пиридо[4,3,2-*de*]циннолин-3(7*H*)-она, которое продемонстрировало в тесте связывания ДФПГ средние результаты, была смоделирована модель жирового гепатоза, индуцируемая тетрахлорметаном на группах лабораторных животных по методу аналогичных пар. В качестве эталона сравнения был выбран антиоксидант этилметилгидроксипиридина сукцинат (мексидол), у которого мишень — СОД, а не гепатопротектор.

Результаты показали, что наиболее информативными является изучение активности *in vivo* и *in vitro*, которые объединяет мишени.

Благополучие животных

Изучение биологической активности проводилось с разрешения Этического комитета ПГФА (Протокол № 3, заявка № 03–2021-н-ж от 10.11.2021 г.). Исследование соединения *in vivo* проведено на достаточном количестве животных с соблюдением всех мер по биологической безопасности и ветеринарному контролю.

Выводы

На примере антиоксидантной активности при помощи исследований *in vivo* и *in vitro* мы установили, что общими мишенями должны быть ферменты-антиоксиданты, которые позволяют оценить воздействие исследуемого вещества.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карпенко М.Е. Синтез и антигипоксическая активность N1-[3-(имидазол-1-ил) пропил)]-N3-арилмочевин и -тиомочевин / М.Е. Карпенко, С.С. Зыкова, А.В. Эюбова и др. // Кромеровские чтения 2024 (Вестник Пермской государственной фармацевтической академии): Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Пермь, 24 апреля 2024 года. Пермь: Пермская государственная фармацевтическая академия, 2024. С. 86–88.

Исследование фармакологического действия соединений ряда производных 4-R-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот

https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-9-7-t2

Ю. В. Пономарева, А. И. Краснова, Т. А. Юшкова, Н. А. Пулина, В. Д. Полежаева, А. В. Старкова, Ф. В. Собин
ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России

Актуальность

Сахарный диабет, в большинстве случаев, сопровождается высокой степенью сердечно-сосудистых рисков и может оказывать существенное влияние на формирование депрессивных состояний. Поиск соединений с сочетанным гипогликемическим и антикоагулянтным действием с положительными эффектами на поведенческие реакции представляется интересным.

Цель работы

Изучить гипогликемическую и антикоагулянтную активность, а также влияние на поведенческие реакции животных соединений ряда производных 4-R-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот.

Методы

Скрининг гипогликемической активности осуществлен на белых нелинейных крысах обоего пола в условиях аллоксанового диабета, моделированного внутрибрюшинным введением аллоксана тригидрата в дозе 160 мг/кг. Исследуемые производные, а также субстанцию препарата сравнения метформина гидрохлорида вводили перорально в дозе 50 мг/кг с пищевой депривацией животных за 16 часов до проведения эксперимента. Контрольная группа получала эквиобъемное количество физиологического раствора. Концентрацию глюкозы в крови животных устанавли-

вают с помощью глюкометра OneTouch select Plus®. Антикоагулянтную активность соединений определяли с помощью коагулометра «Минилаб 701 с использованием цитратной (3,8%) крови кроликов «шиншилла» в соотношении 9:1. В кювету помещали 100 мкл крови и добавляли 100 мкл 0,2% раствора исследуемого соединения; в контрольных исследованиях вместо вещества добавляли 100 мкл изотонического раствора хлорида натрия. Пробы инкубировали в течение 60 с, затем добавляли 100 мкл 1% раствора хлорида кальция и измеряли время свертывания крови механическим способом. Влияние на поведенческие реакции животных изучали с помощью стандартных психофармакологических тестов: «открытое поле», «черно-белая камера» [1]. Данные эксперимента обработаны статистически.

Благополучие животных

Изучение биологической активности соединений проводилось с разрешения Этического комитета ПГФА (Протокол № 3 от 15.01.2024 г.). Содержание животных и все исследования проводились согласно правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ с учетом рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных.

Результаты

Обнаружено, что гетериламиды и бутеноаты 4-R-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот оказывают сахароснижающее действие. Наибольший вклад вносит фрагмент 2(3)-пиридина. Комплексные соединения на основе гетериламидов, содержащие эссенциальные металлы и ванадий, показывают более выраженный фармакологический эффект, иногда сочетанный с устранением депрессивно-подобного поведения у крыс с экспериментальным диабетом. Бутеноаты 4-R-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот показали дополнительное выраженное антикоагулянтное действие.

Выводы

Полученные данные свидетельствуют о перспективности поиска потенциальных БАВ в ряду производных 4-R-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. А.Н. Миронов, Н.Д. Бунятян, Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Москва: Гриф и К, 2012.

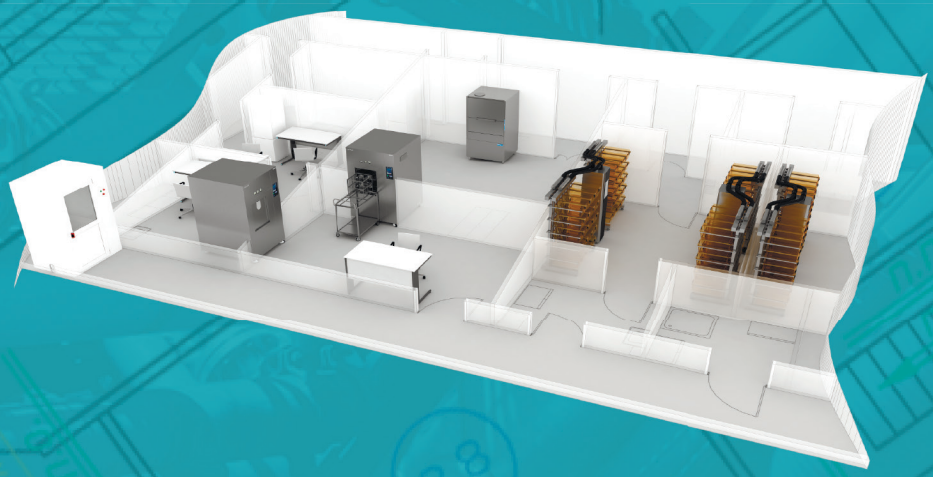
AWTech
Advanced Worldwide Technologies

INPREN
INNOVATIVE DESIGN & ENGINEERING INSTITUTE Co

Группа Компаний АВТех

Мы проектируем, строим, модернизируем и оснащаем виварии, лаборатории и другие объекты в соответствии с российскими и международными нормативными документами.

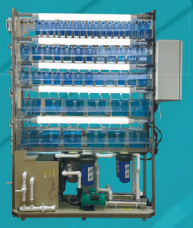
Виварий под ключ - от разработки концепции до оснащения оборудованием и обучения персонала



Лабораторное оборудование собственного производства

Системы индивидуально вентилируемых клеток
Оборудование для эвтаназии лабораторных животных
Ламинарные станции для работы с животными
Клетки для лабораторных животных
Системы для содержания лабораторных рыб Danio rerio
Ламинарные укрытия
Элементы чистых помещений
Модульные конструкции (лаборатория трансформер)
Индивидуальное проектирование и производство оборудования под задачи заказчика

Скачать каталог



Группа компаний AWTech
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

BioLine
группа компаний

Группа компаний «БиоЛайн» сотрудничает с ведущими инновационными мировыми компаниями, предлагая различные технологии и оборудование для исследований *in vivo* и *in vitro* при разработке лекарственных препаратов

- Молекулярная биология и протеомика
- Клеточная биология
- Гистология
- Исследования на лабораторных животных
- Общелабораторное оборудование

реклама

ООО «БиоЛайн»
Россия, 197022,
Санкт-Петербург,
ул. Профессора Попова,
дом 23, литера Е
тел.: +7 (812) 320 49 49
e-mail: main@bioline.ru
bioline.ru

Москва, тел.: +7 (800) 555 49 40
Новосибирск, тел.: +7 (383) 227 09 63
Ростов-на-Дону, тел.: +7 (928) 192 90 40
Н. Новгород, тел.: +7 (831) 278 61 47
Екатеринбург, тел.: +7 (922) 119 70 44
Уфа, тел.: +7 (937) 855 78 52
Казань, тел.: +7 (937) 593 39 44
Самара, тел.: +7 (927) 688 28 49
Хабаровск, тел.: +7 (924) 203 10 5

FarmBioLine

www.farmbioline.ru

Компания «Фармбиолайн» занимает ключевую позицию на российском рынке, предоставляя современное оборудование и комплексные решения для виварий более 20 лет.

Основные направления деятельности компании:

Услуги по разработке планировочных решений и технологии:

Питомников лабораторных животных, виварий с биомоделями различного статуса здоровья и работы с ПБА (1–4) групп.

Поставка оборудования

для содержания лабораторных животных, моечно-дезинфекционных отделений, проведения физиологических и поведенческих исследований, а также различных манипуляций.

Установка оборудования и ввод в эксплуатацию

Сертифицированные специалисты компании выполнят монтаж и ввод в эксплуатацию оборудования, проведут обучающие тренинги персонала Заказчика, обеспечат сервисное и гарантийное обслуживание.

Наши контакты

8 (812) 500-71-72

194100, г. Санкт-Петербург, пр-кт Большой Сампсониевский, дом 82, литера А

info@farmbioline.ru

PeptidPRO®

Новые препараты для лечения заболеваний, имеющих высокую социальную значимость

Единственный* лекарственный ангиопротектор

Первый** препарат для патогенетического курсового лечения ГМП

ГМП – гиперактивный мочевой пузырь

Первый органоспецифический лекарственный препарат для лечения мужского бесплодия[1]

*единственный препарат в основной терапевтической группе «Ангиопротекторы» (C05) по АТХ классификации ЛС

**первый препарат для патогенетического лечения ГМП в анатомо-терапевтической группе G04BD «Средства для лечения учащенного мочеиспускания и недержания мочи»

[1] Резолюция экспертного совета «Актуальные вопросы мужской репродукции при пересмотре клинических рекомендаций. Место и перспективы патогенетической лекарственной терапии». Урология. 2024;2:128–131.

РЕКЛАМА. ИНФОРМАЦИЯ ПРЕДНАЗНАЧЕНА ДЛЯ СПЕЦИАЛИСТОВ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

ООО «ПептидПро», 115054, г. Москва, Космодамианская наб., д. 52, стр. 1В, Тел.: +7(495) 230–09–09, www.peptidpro.com

Rus-LASA

РУССКАЯ АССОЦИАЦИЯ СПЕЦИАЛИСТОВ

ПО ЛАБОРАТОРНЫМ ЖИВОТНЫМ

Общественная организация, объединяющая всех, чья работа так или иначе связана с использованием животных в научных целях.

Мы проводим конференции, организуем тренинги, издаём тематическую литературу.

Присоединяйтесь!

Комплексные решения для содержания и разведения лабораторных животных

АНАЛИТИКА И ПРИБОРЫ

- **КЛЕТКИ ДЛЯ КОНВЕНЦИОНАЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ**
- **СИСТЕМЫ ИНДИВИДУАЛЬНО-ВЕНТИЛИРУЕМЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ГРЫЗУНОВ**
- **МИКРОИЗОЛЯТОРЫ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ**
- **АКСЕССУАРЫ ДЛЯ КЛЕТОК (ПОИЛКИ, ДОМИКИ, ПОДСТИЛОЧНЫЙ МАТЕРИАЛ)**

ООО «Аналитика и приборы» предлагает широкий спектр оборудования для содержания и разведения лабораторных животных:

- Оборудование для лабораторных животных: мыши, крысы, морские свинки, хомяки, кролики, обезьяны и т.д.
- Широкий спектр моделей систем содержания животных для лаборатории любой площади.
- Собственное производство в Санкт-Петербурге, возможность изготовления оборудования в нестандартной комплектации по запросу заказчика.
- Подбор оборудования с учетом специфики экспериментальной лаборатории.
- Гарантия и сервисное обслуживание.

ООО «Аналитика и приборы»

Санкт-Петербург, ул. Зольная, 15
тел. +7 (812) 326-10-56
e-mail: vivarium@nnz.ru

Москва, ул. Складочная, 1, стр. 15
тел.: +7(495) 782-80-11
e-mail: vivarium@nnz.ru

www.vivarium-nnz.ru

Оборудование для работы с лабораторными животными

ВетКормТорг

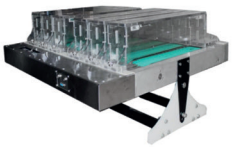
Поставки кормов и оборудования

+7 (499) 705-85-65 gz@vetkt.ru

КОМПЛЕКСНОЕ ОСНАЩЕНИЕ ГОСУДАРСТВЕННЫХ УЧРЕЖДЕНИЙ ВЕТЕРИНАРНЫМ И ЛАБОРАТОРНЫМ ОБОРУДОВАНИЕМ, МЕБЕЛЬЮ, СРЕДСТВАМИ ДЛЯ ОТЛОВА ЖИВОТНЫХ И РАСХОДНЫМИ МАТЕРИАЛАМИ

стеллажи и модули клеток

рестейнеры и фиксаторы



беговые дорожки, гильотины

столы

решения для чистых помещений

подстилы и корма

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)

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

* рейтинг РБК, 2020

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

Консультант GLP-PLANET 2024
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 978-5-6048955-9-7