

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ  
СИСТЕМ И АГРОТЕХНОЛОГИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ

«ФНЦБСТ РАН»



С. А. Мирошников

*КОМИССИЯ ПО КОНТРОЛЮ ЗА СОДЕРЖАНИЕМ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ*

**РУКОВОДСТВО ПО РАБОТЕ  
С ЛАБОРАТОРНЫМИ ЖИВОТНЫМИ  
ДЛЯ СОТРУДНИКОВ**

Оренбург 2018 г.

## Оглавление

Введение	
1. Боль и дистресс у лабораторных животных	4
2. Классификация манипуляций с животными (тип А, В, С, D)	9
3. Альтернативные методы (Принципы 3R)	11
4. Ограничение подвижности (фиксация)	12
5. Ограничение подвижности (фиксация)	14
6. Идентификация животных	15
7. Введение экспериментальных веществ	17
8. Биологически опасные вещества	22
9. Отбор крови	23
10. Ограничение потребления корма и воды	25
11. Анальгезия/анестезия	26
12. Хирургические вмешательства	29
13. Гуманное завершение эксперимента	34
14. Эвтаназия	36
15. Утилизация отходов (трупы животных, шприцы, иглы)	38
Список литературы	39

## **ВВЕДЕНИЕ**

Данное руководство предназначено для сотрудников лаборатории биологических испытаний и экспертиз (далее Экспериментальная клиника-лаборатория), осуществляющих работу с лабораторными животными, а также сотрудников других подразделений ФГБНУ «ФНЦ БСТ РАН», планирующих проведение экспериментов с участием лабораторных животных.

В настоящем руководстве приведены основные термины, предложен ряд методик, позволяющих избежать использования животных в эксперименте или значительно сократить их количество. Помимо этого, описаны признаки боли и дистресса; даны рекомендации по проведению хирургических операций, способам забора крови и другим часто используемым манипуляциям; представлены критерии для гуманного завершения эксперимента.

Материал, представленный в настоящем руководстве, изложен в соответствии с отечественными нормативами и современными международными биоэтическими нормами по работе с лабораторными животными.

Авторы искренне надеются, что данное руководство поможет всем, кто работает с лабораторными животными, спланировать оптимальный эксперимент, выбрать наименее травматичные для животных, но эффективные манипуляции и квалифицированно выполнить их, тем самым достигнув цели эксперимента наиболее гуманным способом.

### **1. БОЛЬ И ДИСТРЕСС У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**

Неотъемлемой частью гуманного отношения является желание довести до абсолютного минимума боль и дистресс у лабораторных животных. Ниже приведены определение таких терминов как боль и дистресс, описаны основные их признаки, оценены их уровни.

*Боль* - неприятный сенсорный и эмоциональный опыт, связанный с фактическим или потенциальным повреждением, или описываемый с точки зрения такого повреждения. Важная особенность заключается в том, что боль представляет собой ощущение или переживание ноцицептивных стимулов, т.е. стимулов такого уровня, которые могут вызывать травму/повреждение тканей или представлять угрозу их возникновения.

*Дистресс* - неприятное негативное состояние организма животного, при котором адаптационные механизмы не могут вернуть организм к физиологической и/или психологической норме. Состояние дистресса возникает при воздействии серьезного или продолжительного стрессорного фактора или в результате кумулятивного эффекта, развивающегося при воздействии нескольких стрессорных факторов. В настоящем Руководстве термины «тревога», «фрустрация» или «депрессия» включены в рамки определения дистресса, стоит отметить, что термин «дискомфорт», стоит рассматривать как легкая форма дистресса. Вызывающие дистресс стимулы в какой-то степени представляют собой экстремальные значения или уровни различных факторов, составляющих для животных окружающую среду. В их число также входит поведение научных сотрудников и технического персонала, когда они осуществляют уход за животными. Так, были выделены области, в которые могут быть внесены усовершенствования, нацеленные на уменьшение боли, дистресса и тревоги у лабораторных животных. Выявлено, что хороший уход и содержание животных имеют первостепенное значение.

*Страдание* - особое состояние «психики», которое не идентично боли или дистрессу, но может стать их последствием. Физическая боль или дистресс могут приводить к страданиям, если они имеют достаточную интенсивность и продолжительность (или и то, и другое). Чем выше интенсивность, тем меньше времени требуется для того, чтобы боль или дистресс привели к страданиям. Страдания начинаются, когда боль или дистресс становятся невыносимыми для отдельного животного. Физическая боль при этом достигает уровня, выходящего за предел переносимости боли, или дистресс превосходит уровень, с которым животное может справиться. На этой стадии очевидны такие пагубные последствия, как замедление роста, нарушение размножения и неадекватный уход животных за собой.

Представляется очевидным, что меры для предотвращения страдания включают поддержание любой возможной боли или дистресса в пределах уровней, которые животные могут выносить или справляться с ними.

Лабораторные грызуны (мыши, крысы) и лагоморфы (кролики) в природе являются животными-жертвами. Они умеют скрывать поведение, сигнализирующее о боли и заболевании, чтобы уменьшить шансы быть съеденными хищниками.

Различают следующие виды боли:

- *Кратковременная боль* - боль, продолжающаяся недолго, временная (секунды), как правило, низкой интенсивности;

•*Постпроцедурная/постоперативная боль* - боль, длящаяся дольше, чем кратковременная (часы, дни, иногда недели), возникает после тканевого поражения вследствие хирургической операции или другой процедуры;

•*Продолжительная боль* - длящаяся дни и недели, например, при экспериментальном моделировании боли (механизмы боли в этом случае отличаются от механизмов постпроцедурной боли);

•*Хроническая боль* - продолжительная боль (длящаяся дни, недели, месяцы), характерна для дегенеративных заболеваний, без облегчения, сложно определяется клинически.

Основные признаки боли и дистресса у лабораторных животных указаны в Таблице 1.

Таблица 1. Некоторые клинические признаки острой боли и дистресса у животных

Признак	Описание
<i>Некоторые признаки острой боли у животных</i>	
Защитная реакция	Попытки защититься, убежать или укусить
Вокализация	Издание звуковых сигналов (писк, крик, стон) при пальпации или попытках проведения процедур на пораженном участке
Повреждения	Облизывание, кусание, царапание, встряхивание или потирание пораженного участка
Беспокойство	Постоянное движение, смена позы (животное встает/ложится), частая смена веса (животное то худеет, то поправляется)
Неподвижность	Долгие периоды неподвижности
Угнетенность	Отказ двигаться или вставать
Аномальный внешний вид	Поникшая голова, подведенный живот, сгорбленная поза

Продолжение Таблицы 1

<i>Некоторые признаки дистресса у животных</i>	
Аномальное дыхание	Поверхностное, затрудненное, частое дыхание
Нарушение груминга, ухудшенное состояние шерсти	Пилоэрекция, сальность, неопрятность шерсти

Изменения со стороны глаз	Остекленевшие, бегающие, расфокусированные глаза
Изменение положения тела	Сгорбленная поза, животное постоянно прячется в угол клетки, животное лежит на одном боку, животное малоподвижно
Отсутствие реакции, неподвижность	Животное не реагирует на внешние раздражители
Изменения веса тела	Частые изменения веса тела
Аномалии в функционировании пищеварительной и выделительной систем	Отсутствие или изменение частоты выделения мочи и фекалий, изменение объема, цвета, запаха мочи, консистенции фекалий; рвота; изменение потребления корма и воды
Вокализация	Частая и интенсивная вокализация

В таблице 2 приведена оценка уровней дистресса (легкой, средней или тяжелой степени). При оценке уровня дистресса, необходимо помнить, что клинические проявления дистресса могут быть разными у определенных животных, в зависимости от их возможности и способности справляться с ситуацией. Чем лучше такие возможности и способности, тем меньше степень тяжести дистресса.

Оценка уровня дистресса может быть важной на трех этапах экспериментальных процедур: при получении утверждения от этических комитетов; во время эксперимента *per se*; при проведении вскрытия. Реакция на боль зависит от возраста, пола, состояния здоровья и вида животных. Используемые при оценке боли критерии в различных схемах применяются дифференцированно.

Таблица 2. Градация выраженности боли и дистресса у животных

Легкая	Средняя	Значительная
Меньшая прибавка веса	Потеря веса до 20%	Потеря веса свыше 25%
Потребление корма и воды за 72 часа составляет 40-75% от нормального уровня	Потребление корма и воды за 72 часа составляет менее 40% от нормального уровня	Потребление корма и воды за 7 дней составляет менее 40% от нормального уровня или анорексия (полное отсутствие аппетита) в течение 72 часов
Частичная пилоэрекция	Шерсть «дыбом» выраженная пилоэрекция	Шерсть «дыбом» - выраженная пилоэрекция и другие признаки дегидратации, такие как деформация кожи

Ответная реакция приглушенная, но имеется. У животного присутствуют нормальные спровоцированные поведенческие реакции	Ответная реакция приглушена, у животного присутствуют приглушенные поведенческие реакции даже, когда они спровоцированные	Отсутствие ответной реакции на внешнюю активность или провокацию
Взаимодействие с другими животными	Незначительное взаимодействие с другими животными	Отсутствие взаимодействия
Временами наблюдающаяся «сгорбленная» поза, особенно после введения дозы препарата	Периодически наблюдающаяся «сгорбленная» поза	Постоянно наблюдающаяся «сгорбленная» поза (животное «застыло»)
Временно наблюдающаяся	Периодически наблюдающаяся вокализация (когда провоцируется)	Состояние дистресса - присутствует не спровоцированная вокализация
Временно наблюдающиеся выделения из глаз и носа	Постоянно наблюдающиеся выделения из глаз и носа	Выделения из глаз и носа - постоянные и обильные
Нормальное дыхание	Периодически наблюдается измененное дыхание	Затрудненное дыхание
Преходящая дрожь	Периодическая дрожь	Постоянная дрожь
Отсутствие судорог	Периодические судороги	Постоянные судороги
Отсутствие распростертого положения	Периодически находится в распростертом положении (менее 1 часа)	Продолжительное время находится в распростертом положении (свыше 1 часа)
Отсутствие членовредительства	Отсутствие членовредительства	Наличие членовредительства

Боль и страдания могут развиваться у животных вследствие различных видов деятельности, осуществляемых в вивариях. Некоторые из этих видов деятельности легко определить, а другие не столь очевидны. Источниками боли и дистресса являются:

- Транспортировка (основные факторы, связанные с перевозками: конструкция клеток и автомобиля, обеспечение кормом и водой, продолжительность транспортировки, уход и обращение с животными, воздействие испарений, различных уровней температуры или шума; перемещение внутри учреждения);

•Физические факторы, связанные с макросредой (значительные колебания окружающей температуры, освещения (особенно у животных, ведущих ночной образ жизни), относительной влажности и шума; параметры содержания (пребывание мышей поблизости от крыс (являющихся природными хищниками), использование неэкранированных (посредством электронных средств) средств визуализации, пылесосов, радио или вода, текущая из крана (это - источники ультразвука));

•Физические факторы, связанные с микросредой (конструкция и строение клеток (возможность для физической активности, прямого контакта с «соседями» по клетке; очистка клеток (операция уборки у некоторых животных, особенно у тех, которые оставляют запаховые метки, может вызывать выраженное беспокойство); пересадка грызунов из сложившихся групп в новые условия; размещение животных (особенно самцы и лактирующие самки; образование групп животных для целей спаривания, могут вызывать борьбу или преследование; содержание животных в клетках по одной особи);

•Факторы, связанные с экспериментальными процедурами (длительная пищевая депривация (более 24-х часов); маркировка (особенно татуировки); введение различных веществ; анестезия и восстановление после анестезии, а также хирургические вмешательства; забор образцов тканей и биологических жидкостей организма веществ; физиологические, фармакологические и токсикологические исследования, умерщвление).

Боль и дистресс, причиняемые указанными выше манипуляциями, могут быть выражены в различной степени. Все манипуляции с лабораторными животными делят на категории (см. Главу 2).

## **2. КЛАССИФИКАЦИЯ МАНИПУЛЯЦИЙ С ЖИВОТНЫМИ (ТИП А, В, С, Б)**

Стоит отметить, что грызуны и лагоморфы часто общаются с животными в соседних клетках, используя различные звуковые (в том числе ультразвуковые) и обонятельные сигналы. К примеру, было продемонстрировано, что крысы и мыши могут передавать сообщения о боли и дистрессе, вызывая тревогу у находящихся по соседству животных того же вида. При этом, разделение животных с тем, чтобы исключить их из пределов видимости друг друга (что, возможно, является незначительным сенсорным механизмом для грызунов), вряд ли обеспечивает «изоляцию» таких видов животных.

Ниже приведена расшифровка типов манипуляций с животными с примерами конкретных процедур. Данная информация необходима для того, чтобы определить уровень боли и дистресса, который предстоит испытать лабораторным животным в результате проводимых процедур.

Тип А - манипуляции, не причиняющие боли либо причиняющие минимальную боль и дискомфорт (содержание животных в неволе; кратковременное ограничение подвижности (фиксация); однократный отбор крови; однократная инъекция нетоксичных материалов; стандартные методы эвтаназии, приводящие к быстрой потере сознания; кратковременное (несколько часов) ограничение в пище и воде; поведенческие эксперименты, ограничивающиеся наблюдением за животными);

Тип В - манипуляции, причиняющие малую боль и дискомфорт на короткий период времени (хирургическое вмешательство со смертельным исходом (хирургические вмешательства и другие работы на анестезированных животных, по окончании которых животное не возвращается в сознание); введение исследуемых веществ различными путями (подкожно, внутривенно, внутримышечно, внутривенно, внутримышечно); канюлизация сосудов и полостей тела, проведенная под анестезией; ограничение в пище или воде на 12 и более часов; поведенческие эксперименты, требующие кратковременного ограничения подвижности; использование болевых стимулов с возможностью избегания (УРПИ, тест горячей пластины или тест отдергивания хвоста и пр.);

Тип С - манипуляции, причиняющие среднюю и тяжелую боль и дискомфорт (долговременное (несколько часов и более) ограничение подвижности животного или лишение его необходимых компонентов среды обитания (например, отсадка малышей от матери); взаимодействие хищник-жертва);

Тип Р - манипуляции, причиняющие среднюю и тяжелую боль и дискомфорт, которые нельзя уменьшить (введение веществ, эффект которых неизвестен; новые экспериментальные процедуры с высокой степенью инвазивности; индукция агрессивного поведения, способного привести к самовредительству и битвам с соседями по клетке; индукция инфекционных заболеваний и введение токсинов, когда критерием окончания опыта является смерть животного (при развитии клинических симптомов животные не могут получить лечения либо подвергнуться эвтаназии).

Стоит отметить, что при проведении и завершении работ, относящихся к типу В, у животных не должны наблюдаться анорексия, дегидратация

(обезвоживание), аномальные выделения, гиперактивность, увеличение периодов неподвижности и сна, увеличение вокализации, самовредительство, агрессивное-оборонительное поведение, социальная изоляция.

К проведению работ типа С допускаются опытные лаборанты, научные сотрудники и ветеринарные врачи, способные распознать признаки боли и облегчить ее.

При проведении работ типа С у животных не должны обнаруживаться признаки хронического дистресса (значительного). Если обнаруживаются клинические аномалии характерные для значительного уровня дистресса, следует предпринять действия для облегчения страдания животных. Если описанные симптомы не удается снять, животных следует немедленно безболезненно усыпить.

Комментарии: В случае необходимости проведения экспериментов типа Р заявитель должен очень четко и подробно объяснить, почему в данном случае невозможно применять альтернативные методы.

### **3. АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕТОДЫ (ПРИНЦИПЫ 3К)**

С конца 60-х годов прошлого века была выдвинута и неуклонно продвигается в практику концепция альтернативного биотестирования на основе принципов 3 R (Russell & Burch):

replacement / replace- замещение

reduction / reduce- сокращение

refinement / refine- улучшение.

**Замещение** (англ. replacement) - замещение высших животных в биотестировании беспозвоночными животными, клеточными и молекулярно-биологическими тестами (живые системы) или использование неживотных моделей, компьютерного моделирования.

*Живые системы* (in vitro) - методики, в которых используют органы, ткани и клетки (в том числе микроорганизмы и растения). При невозможности использования беспозвоночных организмов, необходимо рассмотреть возможность использования в качестве модели видов, стоящих ниже по филогенетической шкале.

*Неживые системы* - физические и механические системы, а также химические технологии. Механические модели можно использовать для

обучения специфичным техникам (например, кардиолегочная реанимация) вместо живых животных. К химическим технологиям, наиболее часто использующимся в качестве альтернативы живым животным можно привести иммуно ферментный метод (ELISA). Альтернативой токсикологическим исследованиям на животных может стать анализ химической структуры нового вещества и сравнение с уже известными эффектами структурных аналогов.

*Компьютерное моделирование* - наиболее простым примером является обучающие видео.

**Сокращение** (англ. reduction) - уменьшение числа высших животных в экспериментах за счет лучшей статистической обработки материала. Возможные способы сокращения числа животных указаны в Таблице 3.

Таблица 3. Способы уменьшения количества животных, используемых в экспериментах

Способ	Примеры
Рациональный выбор размера экспериментальной группы	Предварительные эксперименты для определения вариабельности. Анализ мощности (Power analysis)
Тщательный экспериментальный дизайн	Выбор подходящих контрольных групп. Стандартизация процедур для снижения вариабельности
Максимальное использование каждого животного	Органы от животного, подвергнутого эвтаназии одним исследователем, используются для экспериментов другого исследователя
Правильный выбор экспериментальной модели	Использование здоровых, генетически однородных животных помогает снизить вариабельность
Минимизация потерь животных	Качественный послеоперативный уход. Избегание ненужного разведения животных. Планирование наперед количества животных, которое потребуется закупить или развести для исследования
Статистический анализ	Подбор статистических программ, позволяющих «выжать» максимальное количество информации из данных, полученных даже на маленьком количестве животных

**Усовершенствование** (англ. refinement)- улучшение условия работы с самими животными (обеспечение качественных условий содержания и забора биоматериала, давать лучший наркоз).

Особое место занимает выбор методик, позволяющих устранить или, как минимум, сократить боль и дистресс у лабораторных животных. Если для достижения цели научного исследования невозможно предотвратить боль и дистресс у лабораторных животных, то следует хорошо знать методы выявления их признаков (смотри Главу 1, Таблицы 1 и 2).

Основные методы облегчения боли и дистресса у лабораторных животных:

- *Фармацевтические препараты для облегчения боли и дистресса.* Применяются в случаях, если это не противоречит сути эксперимента (анестетики, анальгетики, противовоспалительные, антибиотики, седативные препараты);

- *Усовершенствование методологии.* Всегда, когда это не противоречит сути эксперимента, необходимо выбирать экспериментальные процедуры, предполагающие наименьшую инвазивность, болезненность и стресс (отбор крови, инъекции и т.д.), а также способные уменьшить количество болезненных процедур (например, катетеризация сосудов у животных для частых отборов крови);

- *Среда обитания животных.* Такие факторы среды обитания, как шумы, запахи, редкие или внезапные контакты с человеком, скука могут стать источником дополнительного дистресса для животных (см. Главу 1). Поэтому следует организовывать работу с животными и их содержание таким образом, чтобы свести к минимуму проявление неблагоприятных для животных факторов. В частности, следует избегать шумных манипуляций в местах содержания животных. Например, крысы и мыши очень чувствительны к высокочастотным звукам (ультразвуку). Электронное оборудование, которое может испускать такие звуки не следует держать в комнатах для содержания, особенно, когда животные отдыхают. Запахи, феромоны, мочевые метки играют большую роль в социальном поведении животных. Как отсутствие запахов в подстилке, так и присутствие запаха мочи и фекалий может усиливать агрессию. Следует принимать во внимание, что частота смена подстилочного материала должна производиться с той частотой, чтобы с одной стороны удалять избыточные запахи отходов жизнедеятельности животных, а с другой стороны сохранить специфические запахи (метки), оставляемые животными (например, переносить в чистый подстилочный материал немного использованной подстилки).

Среда обитания животных должна быть организована таким образом, чтобы позволить животным по максимуму реализовывать свой естественный

поведенческий репертуар. Грызунам нужна подстилка, позволяющая рыть норы; материал для того, чтобы грызть (ткань, дерево, бумага); для мышей полезно разместить домики-укрытия. Для содержания крыс нужно использовать высокие решетки, чтобы они могли проявлять свое изучающее и доминантное поведение.

Не стоит недооценивать и значение социальной среды на благополучие животных. Когда это возможно животных предпочтительно содержать устойчивыми, гармоничными группами. Если животных часто перемещать из одной клетки в другую, это может приводить к разрушению устойчивых социальных групп и проявлению агрессии. Стоит также принимать во внимание, что самцы мышей некоторых линий очень агрессивны при групповом содержании, драки могут привести даже к смертельному исходу. Таких животных следует содержать индивидуально.

*•Применение критериев для гуманного завершения эксперимента*

Заключительный этап эксперимента - выведение животного из опыта (эвтаназия) и забор биоматериала (см. Главу 12).

#### **4. ОГРАНИЧЕНИЕ ПОДВИЖНОСТИ (ФИКСАЦИЯ)**

Ограничение подвижности животного, или фиксация, может оказать больше стрессового воздействия на животное, нежели экспериментальная процедура сама по себе, особенно для животных, которые к этому не приучены.

Фиксация может быть мануальной или механической. Мануальная фиксация - ограничение подвижности животного руками, без применения каких-либо ограничивающих подвижность приспособлений: жакетов, цилиндров, станков. Такой способ фиксации может оказаться преимущественным, особенно для кроликов, так как ласковый контакт с руками может успокаивающе действовать на животное.

При ограничении подвижности животных необходимо придерживаться следующих рекомендаций:

- Выбирайте метод фиксации, доставляющий меньше дискомфорта животному;

- Если Вы фиксируете животное руками, держите его крепко, но нежно. Никогда не применяйте чрезмерную силу;

- Не держите животное в фиксаторе дольше, чем это необходимо для проведения экспериментальной манипуляции;

- Никогда не оставляйте животное в фиксаторе без присмотра;
- Предварительно приучите животного к фиксатору. Например, прежде чем начинать схему иммунизации кролика дайте ему несколько раз спокойно посидеть в фиксаторе, сначала открытом, потом закрытом. Неприученные к фиксации кролики могут начать сильно биться и могут повредить позвоночник, что приведет к частичному параличу;
- Убедитесь, что размер фиксатора подходит животному. Пластиковые цилиндры, применяемые для фиксации мышей и крыс, как правило, имеют разный диаметр - чем крупнее особь, тем большего диаметра нужен фиксатор. Кроме того, фиксаторы для грызунов и кроликов можно подогнать по длине.

## 5. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЖИВОТНЫХ

К основным методам идентификации лабораторных грызунов и кроликов относят: карточку (этикетку) на клетке; прокол (надрез) ушной раковины; ярлыки (бирки) на ушной раковине; татуаж; маркеры; микрочипирование; ампутация фаланг пальцев.

*Обязательная идентификация.* На каждой клетке с животными должна присутствовать бумажная этикетка. При поступлении в виварий из питомников животных сотрудники вивария заполняют этикетку на животных (рисунок 1). После завершения карантина и формирования групп сотрудники вивария заполняют этикетку в соответствии с рисунком 2.

Вид, линия/сток животных _____
Количество, пол животных _____
Возраст (вес) животных _____
Дата поступления (отсадки) _____
Ф.И.О. Ответственного _____
Тел _____
№ заявки _____

Клетка № _____
Вид _____
Кол-во животных _____
Пол _____
Дата рождения _____
Средняя масса _____
Группа № _____
Назначение _____
Примечания _____

Рисунок 1 - Этикетка «прибытия»

Рисунок 2 - Этикетка «эксперимент»

**ВАЖНО:** никогда не выбрасывайте эти этикетки! Их размещение на клетках регламентировано законодательно (СанПин № 1045-73 от 06.04.1973 г.). Допускается размещение дополнительной этикетки на клетке в отдельном держателе для ведения записей по эксперименту.

Стоит отметить, что для кроликов этикетка является методом индивидуальной идентификации и поэтому в ней дополнительно фиксируется порядковый номер кролика, который дается ему при поступлении в виварий.

Краткое описание методов индивидуальной идентификации лабораторных животных, используемых в Экспериментальной клинике-лаборатории:

■Прокол (надрез) ушной раковины - применяют для идентификации мышей, крыс, морских свинок, хомяков. С помощью острых ножниц или специального перфоратора в ушной раковине животного делается надрез или прокол. Схема размещения на ухе проколов (надрезов) стандартизована, чтобы все сотрудники могли «читать» метку.

■Маркировка шерсти (кожи) чернилами - подходит для всех видов животных, но наиболее удобно ее применять для альбиносов. Метод заключается в том, что на определенном участке шерсти (кожи) животного ставится метка чернилами (например, маркером). Этот метод удобен тем, что в тех случаях, когда нужно быстро «прочитать» метку (например, при введении препарата или отборе крови по строгому времени), животное легко идентифицировать в группе до фиксации. Недостатком метода является недолговечность чернильной метки (исчезает за 24-48 часов).

**ВАЖНО:** используемые для маркировки чернила не должны быть токсичными для животных и персонала. В частности запрещено метить животных пикриновой кислотой и гистологическими красками.

## **6. ВВЕДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ**

При введении животным экспериментальных веществ сотрудникам необходимо помнить о том, что достижение наилучшего исполнения процедуры, искоренение возможных ошибок исполнения техники введения, способствует минимизации излишних страданий или даже смерти животных. Режим и путь введения различных веществ определяется задачами эксперимента, видом животных, возможными эффектами конкретного способа введения на животное и требуемой частотой введения. Эти факторы также влияют на выбор техники выполнения процедуры и места инъекции.

Необходимо помнить о том, что некоторые пути введения веществ очень стрессуют животных, поэтому нужно, по возможности, отдавать предпочтение наименее инвазивным и простым для исполнения техникам.

В Таблице 4 указаны наиболее часто встречающиеся пути введения веществ и даны некоторые комментарии.

Таблица 4 Основные пути введения экспериментальных веществ

Путь введения	Пояснение
Внутрикожно	Требуется большой опыт, чтобы не ввести вещество подкожно.
Подкожно	При многократных подкожных введениях необходимо менять места инъекций. Нужно быть внимательным при выборе и использовании адьювантов.
Внутримышечно	Введение веществ, обладающих раздражающими свойствами, может вызвать возникновение серьезных проблем: <ul style="list-style-type: none"> <li>- существует возможность повреждения нервов;</li> <li>- повреждение фасциальных оболочек и сосудов (необходимо избегать введения в эти области);</li> </ul> Эффекты от введения больших объемов и тканевые поражения не видны.
Внутрибрюшинно	Введение веществ, обладающих раздражающими свойствами, может вызвать возникновение серьезных проблем. Так, можно «промазать» - повредить либо ввести вещество в один из органов брюшной полости, поражения не будут видны (сложно узнать, что это произошло).
Внутривенно	Грызунов необходимо подготавливать к этой процедуре - опустить хвост в теплую воду).
Перорально: С кормом/водой В таблетках Зондом	Сложно рассчитать поглощенную каждым животным дозу. Необходимо хорошо знать пищевое поведение данного вида животных.  Удобно для применения у собак и приматов.

Фиксация животного требуется для всех способов введения веществ, кроме перорального введения с кормом/водой.

Далее приведена информация, на которую необходимо обратить внимание, тщательное планирование представленных моментов позволит улучшить качество жизни животных в эксперименте:

### *1. Свойства экспериментальных веществ*

- физикохимические свойства веществ и/или растворителей могут оказывать неблагоприятное воздействие на экспериментальных животных (состав, растворимость, вязкость, рН, биологическая совместимость, чистота, стабильность, микробиологическая чистота). Следует хорошо изучить эти

свойства, а также возможные побочные эффекты, например наличие раздражающих свойств;

- раздражающее действие/рН - вещество может вызывать раздражение и/или изъязвление кожи и слизистых оболочек, разрушать ткани локально (например, эндотелий сосудов). Можно этого не заметить, при выборе пути введения, скрывающего такой эффект, однако это может существенно ухудшить состояние жизни и здоровья животного. Раздражение может быть частой проблемой при введении веществ внутривенно, на роговицу глаза, ингаляционно.

#### ВАЖНО:

- Необходимо всегда предварительно проводить анализ данных об известных свойствах вещества и его эффектах;

- рН растворов для введения должен быть максимально приближен к нейтральному (7,0), рекомендуемый диапазон рН 4,5-8,0. Толерантность к рН уменьшается в следующей последовательности для различных путей введения веществ: перорально>внутривенно>внутримышечно>подкожно;

- Необходимо иметь в виду, что раздражающие свойства веществ зависят не только от рН, но и от концентрации;

- При работе с неизученным веществом, для которого подозреваются наличие раздражающих свойств, можно сначала проверить его действие на только что убитом/павшем животном (например, острое раздражающее действие на кожу или эндотелий). Затем можно проверить эффект на анестезированном живом животном.

- растворимость - плохо растворимое вещество может образовывать в растворе большие частицы, либо выпадать в осадок. Введение такого раствора внутримышечно может быть очень болезненным и к тому же наличие частиц может препятствовать абсорбции. В идеале нужно использовать стабильные биодоступные растворы. Перед дозированием необходимо определить, водорастворимое или жирорастворимое вещество, его стабильность (выпадает в осадок);

- биодоступность - вещества, не обладающие биодоступностью, могут разрушать ткани, в соответствии с этим необходимо предварительно т УПГО проверять наличие, например, гемолитических или цитопатических эффектов;

- вязкость - вещества, обладающие высокой вязкостью сложно вводить, требуется больший размер иглы. В соответствии с этим, необходимо адекватно выбирать пути введения и стараться не использовать вязкие вещества;

- стерильность - контаминированные вещества могут стать причиной инфицирования и раздражения места инъекции. Следствием может стать

членовредительство и даже смерть экспериментального животного. В соответствии с этим, все вещества, вводимые животным парентерально должны быть стерильными (проавтоклавированными или профильтрованными), необходимо соблюдать правила асептики при введении экспериментальных веществ;

- температура - введение холодных растворов, например, сразу после холодильника, может вызвать дискомфорт и шок. Поэтому необходимо подогревать экспериментальные вещества до комнатной температуры, лучше до температуры тела животных, непосредственно перед введением.

## 2. Инъекции

- использование кожных антисептиков - густой волосистой кожей может препятствовать поступлению антисептика до кожи. Чрезмерное применение кожного антисептика (как правило, имеющего в основе спирт) может привести к охлаждению тела, вследствие испарения спирта, особенно у мелких грызунов. При обработке места инъекции необходимо раздвинуть шерсть, либо сбрить небольшой участок на коже животного, чтобы эффективно обработать его антисептиком;

- иглы - введение больших по диаметру игл может быть болезненным и причинять ненужную боль и травмирование тканей.

### ВАЖНО:

- Для каждого пути введения следует выбрать подходящий размер иглы (см. Таблица 5);

- Меняйте иглы перед введением разным животным, чтобы избежать переноса инфекции;

- Если требуется многократное внутривенное введение препарата, предусмотрите возможность катетеризации вен у животных.

Таблица №5 Рекомендуемые размеры игл для введения веществ разными путями

Вид животного	Способ введения				
	в/к	п/к	в/м	в/в	в/б
Мышь	270G	250G	270G	26-280G	25-270G
Крыса	270G	250G	250G	25-270G	23-250G
Морская свинка	250G	23-250G	250G	25-270G	23-250G
Хомяк	250G	250G	250G	25-270G	23-250G

Кролик	250G	21-250G	250G	23-250G	21-230G
--------	------	---------	------	---------	---------

Примечание: в/к- внутрикожно; п/к- подкожно; в/м-внутримышечно; в/в-внутривенно; в/б-внутрибрюшинно

- техника инъекции - важно отметить, что при неправильном введении последствия могут быть очень серьезными: например, внутримышечная доза, введенная внутривенно, может стать смертельной. Необходимо знать анатомию животного, например, строение суставов для внутрисуставных введений, длину пищевода для перорального введения зондом, места прохождения нервов при внутримышечных инъекциях.

### ВАЖНО:

- Вводить иглу нужно уверенно, давить на поршень нужно нежно и мягко;
- После введения внутривенно необходимо зажать сосуд стерильным ватным тампоном и дождаться, пока кровь не свернется. В противном случае животное может зализывать место инъекции.

- объемы введения - введение больших объемов экспериментальных веществ может быть не физиологичным. В Таблице 6 указаны максимальные допустимые объемы для введения экспериментальных веществ разными путями. Стоит отметить, что чем меньше объем, тем лучше.

Таблица №6 Максимально допустимые объемы ведения экспериментальных веществ лабораторным животным наиболее часто используемых видов

Способ введения	в/к	п/к	в/м	в/в	в/б
Размерность	(мл/точка)	(мл/кг)	(мл/кг/точка)	(мл/кг)	(мл/кг)
Количество	0,05-0,1	2-5	5	50,0	10

Примечания: в/б - внутрибрюшинно; в/в - внутривенно (введение вещества происходит относительно быстро, до 1 минуты (не инфузия)); в/м-внутримышечно; п/к- подкожно. Объем зависит от плотности кожи животного (и, соответственно, от размера подкожного пространства). При введении больших объемов используют несколько точек (до четырех). Рекомендации по введению п/к не распространяются на введение адьюванта Фрейнда. Для полного адьюванта Фрейнда максимальный объем введения составляет 0,1 мл/точка; в/к- внутрикожно.

## 7. БИОЛОГИЧЕСКИ ОПАСНЫЕ ВЕЩЕСТВА

К биологически опасным веществам относят инфекционные агенты, мутагены, канцерогены, рекомбинантную ДНК, клеточные линии и биологические материалы, полученные от человека.

При заполнении протокола-заявки в Биоэтическую Комиссию по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных на исследование, предполагающее работу с биологически опасными веществами, необходимо заполнять Приложение 2 (Радиоактивные и биологически опасные вещества).

## 8. ОТБОР КРОВИ

Отбор крови для клинических исследований у грызунов можно производить прижизненно и посмертно:

- *Прижизненное взятие крови.* Необходимо тщательно оценивать объемы крови, в связи с тем, что восстановление объема крови у животных происходит в течение 24 часов. Стоит отметить, что восстановление полного кровяного состава происходит через 2 недели по формуле 1 мл/кг/день. Как правило, объем циркулирующей крови составляет 55-70 мл/кг веса тела (Таблица 7).

Таблица 7 Объем циркулирующей крови у лабораторных животных

Вид животного	Объем крови на кг веса тела, мл/кг
Кролик	44-70
Морская свинка	67-92
Мышь	78-80
Крыса	50-70
Хомяк	78

### ВАЖНО:

- Если большой объем крови отбирать слишком быстро без замещения, животное может испытать гиповолемический шок;
- Если кровь отбирать слишком часто у животного может развиться анемия;
- Каждые 3-4 недели можно отбирать до 10% объема циркулирующей крови;

•Каждые 24 часа можно отбирать до 1% объема циркулирующей крови;

•Для быстрого определения объема крови, который допустимо отбирать каждые 24 часа, используют формулу:

$$0,01 * \text{объем циркулирующей крови (мл/день)}$$

$$(\text{в среднем} = 0,6 \text{мл/кг/день})$$

*Пример:* Кролик весит 3,0 кг, объем циркулирующей крови 44-70 мл/кг (среднее 57).

Вопрос 1: Какой объем крови можно отбирать каждые 24 часа?

Ответ 1:  $0,01 * 57 = 0,57$  мл/кг в день.

Вопрос 2: Какой объем крови можно брать один раз в 3-4 недели.

Ответ 2:  $0,1 * 57 = 5,7$  мл/кг раз в 3-4 недели.

•У ожиревших и старых животных объем циркулирующей крови может быть меньше на 15%;

•При проведении кровезамещения можно увеличить объем максимального взятия крови вдвое.

Для кровезамещения следует сразу после отбора крови ввести внутривенно теплый физиологический раствор в том объеме, в котором была взята кровь.

Необходимо выбирать наиболее подходящий для каждого вида животных способ отбора крови (Таблица 8). Таблица 8 Места прижизненного взятия крови

Вид животного	Ушная вена	Ампутация кончика хвоста*	Венозный синус глаза*	Копчиковая вена	Яремная вена	Кардиальная пункция*
Мышь	+	+++	+	++		
Крыса		+		+++		+
Кролик	+++					
Морская свинка	+				+	+++
Хомяк			+		+	++

Примечание: \*- анестезия/анальгезия обязательна

При взятии крови из орбитального синуса глаза допустимо не применять анестезию в случае проведения манипуляции высококвалифицированным специалистом.

- *Посмертное взятие крови.* Непосредственно после эвтаназии животного с помощью гильотины или специально предназначенных для этого ножниц (смотри раздел «Эвтаназия»). Такой метод допускается только для мышей, крыс и маленьких кроликов. Также возможно взятие крови с помощью шприца из правого предсердия у приглушенных крыс и мышей

## **9. ОГРАНИЧЕНИЕ ПОТРЕБЛЕНИЯ КОРМА И ВОДЫ**

Ограничение потребления корма (пищевая депривация) обычно связано с необходимостью голодной диеты перед проведением метаболических экспериментов, проведением хирургических операций, особенно полостных, накануне некропсии.

Для грызунов допустимо лишение корма на 12 часов. Ограничение корма более 12 часов, а также лишение доступа к воде нежелательно, требует веского обоснования и в любом случае не должно превышать 24 часа.

## **10. АНАЛЬГЕЗИЯ/АНЕСТЕЗИЯ**

Анестезия (от греч. *anaesthesia* — нечувствительность), потеря чувствительности вследствие прекращения функции чувствительных клеток головного мозга или нарушения передачи импульсов в различных звеньях периферической нервной системы.

Анальгезия (от греч. *Analgesia* — бесчувственность, невосприимчивость), полная потеря болевой чувствительности; один из видов частичной (диссоциированной) анестезии.

На восприимчивость боли может влиять широкий круг факторов окружающей среды (некоторые из которых связаны с содержанием животных или лабораторными процедурами). Данный факт крайне важен при оценке влияния, которое процедуры оказывают на боль и дистресс. Было продемонстрировано, что самые разнообразные факторы вызывают четко проявляющуюся анальгезию у различных видов грызунов. К ним относятся акупунктура, тревога, стимуляция головного мозга, щипки тела, центробежное вращение, классическое кондиционирование, совокупление (для самцов), беременность/роды (для самок), электрошок стоп, физическая нагрузка, электросудорожный шок, лишение пищи, принудительное плавание,

воздействие тепла, стимуляция гипертоническим солевым раствором, инсулин, облучение, опиаты, присутствие хищника, удержание, социальный конфликт, социальная изоляция, стрессовые запахи, защемление хвоста, удар по хвосту, специфические запахи для мечения территории, кожное раздражение нервов и вагинальная стимуляция. В некоторых формах анальгезии участвуют эндогенные опиоиды, а другие формы не зависят от опиоидов. Некоторые формы регулируются нейронными факторами, другие - гормонами.

Во всех случаях, когда это не противоречит целям эксперимента при проведении болезненных процедур необходимо применять обезболивание. В тех случаях, когда на момент планирования эксперимента есть сведения о том, что манипуляции причинят животным боль и дистресс, необходимо предусмотреть применение анестетиков и се дативных препаратов.

В послеоперативном периоде необходимо использовать анальгезирующие средства. Если таких данных нет, то имеет смысл провести предварительный эксперимент на малом количестве животных и тщательно обследовать их на предмет обнаружения признаков боли и дистресса.

Поскольку у Экспериментальной клиники-лаборатории нет разрешения на использование наркотических средств для анестезии или анальгезии (например, кетамина, морфина и т.д.), в таблицах 9 и 10 приведены примеры препаратов, которые можно свободно приобрести в аптеках (ветеринарных и/или медицинских).

Таблица 9 Рекомендуемые дозы комбинации препаратов Золетил-ксилазин для анестезии лабораторных животных

Вид животных	Дозы и способ введения	Длительность анестезии	Примечание
Крысы	20-40 мг/кг+5-10 мг/кг в/м, в/б	20-30 мин	Для продолжения анестезии добавить 1/3 первоначальной дозы
Мыши	20-40 мг/кг+5-10 мг/кг в/м, в/б	20-30 мин	Для более точного дозирования при введении мелким мышам может потребоваться предварительное разведение раствора в 5 раз (1 часть смеси золетил+ксилазин+ 4 части воды для инъекций)
Кролик	15 мг/кг + 5 мг/кг в/м	70 мин	-

Хомяки	20-40 мг/кг + 5-10 мг/кг в/б	20-30 мин	-
--------	------------------------------	-----------	---

Примечание: в/м- внутримышечно, в/б- внутрибрюшинно

Таблица 10 Рекомендуемые анальгетические средства для лабораторных животных

Агент	Вид животных	Дозы и способ введения	Частота введения или длительность анестезии
Аспирин	Грызуны	100-400 мг/кг п/о	1 р/сутки
	Кролики	100 мг/кг п/о	4 часа
Мелоксикам	Крысы	1 мг/кг п/о, п/к	1 р/сутки
	Кролики	0,2 мг/кг п/к	1 р/сутки
Кетопрофен	Грызуны	5 мг/кг п/о, п/к	1 р/сутки
Ксилазин	Грызуны	5-12 мг/кг п/к	2 часа

Примечание: п/о- перорально, п/к-подкожно

Для предупреждения инфицирования послеоперационной раны и развития воспалительного процесса в послеоперационном периоде рекомендуется применение антибиотиков и других противомикробных препаратов, рекомендуемые препараты указаны в Таблице 11.

Таблица 11 Рекомендуемые противомикробные препараты

Агент	Животные	Доза	Способ введения	Частота введения
Ампициллин	Мыши	40 мг/кг/день 5-15мг/100 г веса	п/о в питьевой воде, п/к	1 раз/день 2 раза/день
	Крысы	5-15мг/100 г веса 50мг на взрослую крысу 40 мг/кг/день	п/к в/б п/о в питьевой воде	2 раза/день 1 раз/день в течение 10 дней 1 раз/день

Энрофлоксацин	Мыши	85 мг/кг 85 мг/кг/день	п/к п/о в питьевой воде	2 раза/день в течение 14 дней в течение 14 дней
	Крысы	2,5-10 мг/кг 85 мг/кг/день	в/м, п/к, п/о п/о в питьевой воде	2 раза/день 1 раз/день
Тетрациклин	Мыши	100 мг/кг 40 мг/кг/день	п/к п/о в питьевой	1 раз/день в течение 5-7 дней
	Крысы	100 мг/кг 40 мг/кг/день	п/к п/о в питьевой	1 раз/день в течение 5-7 дней

Примечание: п/о- перорально, п/к-подкожно, в/б-внутрибрюшинно, в/м-внутримышечно

## 11. ХИРУРГИЧЕСКИЕ ВМЕШАТЕЛЬСТВА

*Операция с выживанием* (операция с сохранением жизни, англ. survival

surgery) - хирургическая процедура, после которой подразумевается выход животного из наркоза.

*Операция без выживания* (операция без сохранения жизни, англ. nonsurvival

surgery) - хирургическая процедура, после которой или во время которой планируется эвтаназия животного до его вывода из наркоза.

*Большая операция* - хирургическая процедура с проникновением в полости тела или со значительным нарушением физиологических функций, вызванным ортопедическими манипуляциями и манипуляциями по удалению или замене больших количеств тканей, например, лапаротомия, краниотомия, торакотомия, ампутация конечностей, замена суставов.

*Малая операция* - хирургическая процедура без проникновения в полости организма и вызывающая минимальные изменения физиологического состояния, например, ушивание ран, катетеризация периферических сосудов.

*Анестезия* - потеря чувствительности всего тела или части тела.

*Анальгезия* - временная потеря чувства боли.

*Правила асептики* - комплекс мероприятий, предотвращающих заражение тканей микроорганизмами.

*Стерилизация* - процесс уничтожения всех форм микроорганизмов. Критерий стерилизации - отсутствие роста микроорганизмов на питательной среде.

*Дезинфекция* - процесс уничтожения вегетативных форм микроорганизмов, но не споровых форм, которые способны к прорастанию на питательной среде.

Основные принципы хирургии:

1. При проведении хирургических операций исследователь должен руководствоваться принципами гуманного обращения с животными и соблюдать основные правила проведения хирургических операций;

2. Все хирургические вмешательства должны проводиться квалифицированными сотрудниками;

3. Большие и малые операции с выживанием животного должны проводиться с соблюдением правил асептики. Операции без выживания животного могут проводиться без жесткого соблюдения правил асептики, но чистыми инструментами и на чистых рабочих поверхностях;

4. Для проведения хирургических операций на грызунах не требуется специализированного операционного помещения, однако все хирургические вмешательства должны проводиться вне помещения для содержания животных;

5. Хирургические операции должны сопровождаться соответствующими ветеринарно-медицинскими процедурами предоперационной подготовки животного и послеоперационного ухода;

6. При операции должны соблюдаться основные правила хирургической техники: осторожное обращение с тканями, минимальное их повреждение и рассечение, соответствующее использование инструментов, предотвращение кровопотери, использование соответствующих шовных материалов и правильное наложение швов.

При проведении хирургических вмешательств должна быть предусмотрена следующая схема работы:

1. Подготовка инструментов и материалов:

Для проведения операций с выживанием животного все нестерильные материалы, которые будут соприкасаться с операционным полем (включая шовный материал, бинты, салфетки, вату, имплантируемые материалы),

должны быть простерилизованы. Оборудование и материалы, применяемые в операции, но прямо не контактирующие с операционным полем (хирургический столик, стереотаксис и др.) необходимо обработать дезинфектантом.

Набор инструментов перед проведением операции также необходимо простерилизовать.

Стерилизовать инструмент можно кипячением и автоклавированием, дезинфицировать - погружением в раствор дезинфектанта (например, в 0,5% раствор хлоргексидина биглюканата на 70% этиловом спирте) с последующим ополаскиванием стерильной (кипяченной) водой. Не следует использовать для стерилизации и дезинфекции растворы этанола, т.к. он неактивен в отношении споровых форм бактерий и многих вирусов, плохо проникает через клеточные барьеры, требует продолжительного времени воздействия.

#### ВАЖНО:

- При проведении подряд серии операций заранее готовят (стерилизуют) как минимум два набора инструментов, которые поочередно дезинфицируют методом погружения в раствор дезинфектанта на время проведения очередной операции.

- Перед дезинфекцией инструмент очищают от крови и других органических загрязнений с помощью тканевых салфеток.

#### 2. Предоперационная подготовка:

Для проведения операций выбирают здоровых животных без каких-либо клинических признаков заболевания. Только что прибывшие животные должны пройти период акклиматизации до проведения операции.

Перед проведением полостных операций животных лишают корма на период: как минимум 4 часа - для мыши, 6 часов - для крысы, но не более 24 часов. Доступ к воде перед операцией не ограничивается.

Для проведения малых операций лишать корма необязательно, однако, этот прием может улучшить всасывание анестетика при его внутрибрюшинном введении.

Непосредственно перед проведением операции животное анестезируют. После введения анестетика необходимо проверить глубину анестезии: при глубокой анестезии скелетные мышцы должны быть расслаблены, должны

отсутствовать рефлексы (не должно быть реакции на пощипывание кончика хвоста, пальцев, прикасание к носу и роговице глаза).

При необходимости животное фиксируют на хирургическом столике, привязав петлевидными узлами за лапы. Для предотвращения высыхания роговицы рекомендуется закапать в глаза глазной гель (офтагель или др.).

В местах планируемых разрезов удаляют шерсть выщипыванием (при этом слегка натягивают кожу, не щипая ее) или сбриванием с помощью клипера. Удаленную шерсть тщательно собирают с животного и с рабочих поверхностей в закрывающуюся емкость для отходов.

Обработка операционного поля (кожи) выполняется на месте проведения операции перед выполнением разреза. Обработку выполняют тампонами, смоченными дезрастворами, при этом обработку ведут от центра к периферии. После обработки операционное поле изолируют стерильными салфетками. Для этого используют несколько маленьких или одну большую салфетку с разрезом. Из-за малого размера грызунов салфетка может укрыть все животное и затруднять визуальное наблюдение его состояния, но при этом должен сохраняться свободный доступ воздуха к дыхательным путям.

Если операция будет длиться более 30 мин, рекомендуется обеспечить подогрев животного, т.к. анестезия вызывает гипотермию. Для подогрева можно использовать электрическую или водную грелки, которые кладут под операционный столик. Нельзя класть животное непосредственно на средства подогрева. Для подогрева можно использовать специальный подогреваемый металлический столик.

### 3. Рекомендации по проведению операций:

- Операцию начинают, убедившись, что степень анестезии соответствует предполагаемому оперативному вмешательству;

- При проведении операции необходимо постоянно контролировать состояние животного: наличие и частоту дыхательных движений, признаки гипотермии;

- Разрез для операционного доступа должен быть минимальным, но достаточным для достижения цели операции;

- Необходимо избегать пересыхания тканей операционного поля - периодически орошать их стерильным изотоническим раствором (физиологическим, фосфатно-буферным). Возможно применение для орошения 0,5% раствора новокаина, который не только предохраняет ткани от пересыхания, но и обеспечивает местную анестезию.

#### 4. Принципы наложения швов:

- Используют шовный материал и хирургические иглы соответствующего размера. Рекомендуется по возможности применять атравматические иглы, которые значительно меньше повреждают ткани.

- При наложении швов используют стерильный шовный материал. При использовании нестерильного шовного материала его стерилизуют автоклавированием, кипячением или замачиванием в дезрастворе в условиях лаборатории перед проведением операции. При использовании коммерческого стерильного материала обращают внимание на состояние упаковки, при необходимости стерилизуют в условиях лаборатории.

- Выбор шовного материала (абсорбируемый/неабсорбируемый, монофиламентный/полифиламентный) зависит от целей операции, места наложения шва, срока, в течение которого прооперированное животное будет жить. При полостных операциях, предполагающих жизнь животного в течение длительного времени после операции, на разрез мышечной ткани полости предпочтительно накладывать шов из абсорбируемого материала.

- Использование шовного материала с антимикробной пропиткой позволяет снизить риск инфицирования операционной раны, однако влияние этих веществ на результаты исследования следует учитывать при планировании эксперимента. Следует избегать использования шелковых нитей для наложения швов на кожу, т.к. эти нити плетеные, что облегчает проникновение бактерий и инфицирование раны.

- Разрез мышечной ткани зашивается непрерывным швом, разрез кожи - чаще прерывистым, однако допустимо накладывать также непрерывный шов, особенно на местах, доступных зубам грызуна.

- При проведении полостных операций (лапаротомия и торакотомия) накладывают 2х этажный шов: на глуболежащие ткани и, отдельно - на кожу.

- Для зашивания кожи используют режущие иглы (трехгранные в сечении), для мышечной ткани - иглы, округлые в сечении.

- После наложения швов рану целесообразно обработать антисептиком: спиртовым раствором бриллиантовой зелени, тетрациклином или алюминий - содержащим спреем, либо другими средствами. Применять йодную настойку не рекомендуется, т.к. это вызывает раздражение и ожог тканей.

*Шовный материал:*

- ПОЛИКОН - полиамидная антимикробная хирургическая нить, обеспечивает биологическую герметичность хирургического шва и полностью резорбируется, гарантируется биологическая чистота хирургической нити в открытой упаковке;

- КАПРОАГ - полиамидная псевдомонофиламентная абсорбируемая нить с хлоргексидином биглюконатом;

- PROLENE - полипропиленовая монофиламентная неабсорбируемая инертная нить;

- ETHILON - полиамидная монофиламентная абсорбируемая нить;

- VICRYL - абсорбируется в течение 60-90 дней;

- НЕЙЛОН - неабсорбируемая монофиламентная инертная нить;

- ШЕЛК - неабсорбируемая нить, удобна и доступна для применения. Не рекомендуется для кожных швов.

#### 5. Послеоперационный уход:

Ответственность за послеоперативный уход лежит на руководителе исследования. После проведения хирургического вмешательства животное должно быть помещено в теплое чистое место до полного выхода из наркоза. Во избежание дегидратации, особенно при кровопотерях, после окончания операции рекомендуется ввести внутривенно или подкожно 1-2мл/100г веса тела теплого (35-37°C) стерильного изотонического раствора (физ. раствор, раствор Рингера или Рингера-Локка).

Дальнейший послеоперативный уход включает введение анальгетиков, противомикробных препаратов, ежедневный мониторинг состояния животных на предмет обнаружения признаков боли и дистресса, особое внимание уделяют состоянию швов.

## **12. ГУМАННОЕ ЗАВЕРШЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА**

Принципы гуманности должны лежать в основе любых экспериментов с использованием животных. В тех случаях, когда экспериментальное воздействие причиняет животному боль и дистресс, которые нельзя устранить или уменьшить (например, опухолевый рост, заражение инфекциями, токсикологические исследования и т.д.), необходимо определить критерии для гуманного окончания эксперимента, когда все данные уже собраны и нет необходимости продолжать страдания животного.

При обнаружении таких критериев животных следует либо обезболить и провести необходимое лечение (если эксперимент предполагает оставление животного в живых), либо подвергнуть эвтаназии (если эксперимент

предполагает смерть животного). Примеры критериев приведены в Таблице 12.

Есть виды исследований, в которых традиционно дожидаются смерти животного: исследование биологии опухолей и эффективности противоопухолевой терапии, исследования инфекционных заболеваний и их терапии, токсикологические исследования новых веществ. Однако современные международные стандарты рекомендуют даже для таких исследований использовать эвтаназию по достижению животным агонизирующего состояния, а не дожидаться, пока животное умрет самостоятельно.

Запрещены следующие способы умерщвления:

- С помощью миорелаксантов, ибо животное перестает дышать, но ощущает боль и гибнет при сохранении сознания;
- С помощью электрического тока, так как для остановки сердца и отключения ЦНС требуется некоторое время, в продолжение которого животное испытывает резкую боль, голосовые и моторные реакции отсутствуют из-за развивающегося паралича мышц; причем мелкие животные страдают больше, ибо они более резистентны к току;
- С помощью различного рода ядов;
- С помощью болезненных инъекций - внутривенных, в область сердца, плевры;
- С помощью воздушной эмболии.

Таблица 12 Примеры критериев для гуманного завершения эксперимента (указаны часто встречающиеся критерии, но не все)

Критерий	Описание	Применение
Размер опухоли и эффекты опухоли на организм	Опухоль достигает 10% нормального веса тела; некротические изменения в опухоли; инфицирование опухоли, изъязвление ее; неспособность животного передвигаться, пить/есть	Подкожные и внутрибрюшинные опухоли, гибридомы (асциты)
Продолжительные периоды отказа от приема пищи/кахекия	Быстрая потеря веса (>20% от нормального веса тела) и/или кондиции	Метастазы, хронические инфекционные заболевания
Неспособность передвигаться	Продолжительная неподвижность	Много примеров

Признаки серьезного повреждения органов и систем	Респираторная система: частое или затрудненное дыхание, кашель, хрипы. Сердечнососудистая система: шок, кровотечения, анафилаксия. Пищеварительная система: непрекращающаяся диарея и рвота. Периферическая нервная система: параличи. Центральная нервная система: кружение, слепота, слабоумие,	Токсикологические исследования; системные заболевания
Прогрессирующая гипотермия	Снижение температуры тела на 4-6°C	Инфекционные заболевания; исследования эффективности вакцин

### 13. ЭВТАНАЗИЯ

*Эвтаназия* - гуманное умерщвление животного, причиняющее минимальное количество боли, страха и дистресса (быстрое и безболезненное умерщвление).

*Сознание* - состояние нормального животного, в котором оно может воспринимать стимулы из внешней среды и отвечать на них нормальным поведением бодрствующего индивидуума.

*Бессознательное состояние* - состояние, при котором отсутствует реакция на внешние стимулы, например, кома или общая анестезия.

Кролики должны подвергаться эвтаназии исключительно в состоянии наркоза (передозировка наркоза: разовая доза  $\times 3$ ). Для мелких животных оптимальным также является передозировка наркоза; допустима быстрая декапитация.

Из ингаляционных анестетиков желательны фторотан, хлороформ. При этом крышку сосуда, куда поместили животное, нужно периодически открывать, чтобы крыса или мышь погибали от наркотического действия препарата, а не от удушья (поэтому эфир не рекомендуется). Как показали исследования В.В. Руденка, использование эфира при выведении животных из опыта абсолютно нецелесообразно и потому, что приводит к искажению результатов эксперимента, по крайней мере, на нервной ткани. Недопустимо применение силовых приемов, если животное испугано и сопротивляется.

Причины, по которым проводят эвтаназию в лабораториях и питомниках обычно следующие:

- В конце эксперимента или когда проявляются побочные эффекты;
- Для отбора крови и других тканей для решения различных научных задач;
- Когда животное нужно избавить от боли, дистресса и страдания;
- Когда состояние здоровья и благополучия животных вызывает беспокойство;
- Когда они больше не годятся для разведения;
- Нежелательный сток или сток с нежелательными свойствами.

Чтобы метод умерщвления был признан гуманным, он должен соответствовать следующим требованиям:

- быть безболезненным;
- вызывать быструю потерю сознания и смерть;
- требовать минимального обездвиживания животного (фиксации);
- не вызывать волнения у животного;
- соответствовать возрасту, виду, состоянию здоровья животного;
- минимализировать испуг (страх) и физиологический стресс;
- быть надежным, необратимым, легким в исполнении (желательно в малых дозах), безопасным и по возможности эстетически приемлемым для персонала, проводящего процедуру.

Примеры способов эвтаназии для различных видов грызунов и кроликов приведены в Таблице 13.

Таблица 13 Методы, приемлемые для эвтаназии грызунов и кроликов

Метод	Грызуны	Кролики
Цервикальная дислокация	(для грызунов весом < 150 г)	(только для кроликов весом < 1 кг)
CO <sub>2</sub>	+	+
Декапитация	+	только для кроликов весом < 1 кг)

Оборудование для эвтаназии (например, CO<sub>2</sub>-камера, гильотина) должны быть сконструированы таким образом, чтобы вызывать быструю потерю сознания и смерть. Их следует держать в чистоте, потому что остатки крови, мочи и фекалий могут вызывать беспокойство у животных.

Необходимо обратить внимание на то, что усыпление диэтиловым эфиром и хлороформом не являются подходящими методами эвтаназии. Эфир оказывает раздражающее воздействие на слизистые оболочки. Он значительно повышает глюкозу крови животного, и вреден для персонала. Хлороформ угнетает центральную нервную систему и вызывает сердечную и дыхательную недостаточность. Он гепатотоксичен, нефротоксичен и канцерогенен для других животных и персонала.

Необходимо знать признаки, подтверждающие наступление смерти животного:

- прекращение сердцебиения и дыхания;
- отсутствие рефлексов;
- снижение температуры тела ниже 25 °С (у мелких грызунов).

Если есть сомнения в том, что смерть наступила, необходимо немедленно использовать другой метод эвтаназии!

#### **14. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ (ТРУПЫ ЖИВОТНЫХ, ШПРИЦЫ, ИГЛЫ)**

Все отходы Экспериментальной клиники-лаборатории (трупы лабораторных животных и патматериалы, использованные шприцы и иглы, использованный подстилочный материал) относятся к биологически опасным отходам класса Б.

Правила их сбора и утилизации регламентированы Санитарными правилами и нормами СанПиН 2.1.7.728-99 "Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений" утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 22 января 1999 г. N2.

Необходимо следовать следующим правилам:

1. Использованные иглы сбрасывать в желтые контейнеры (подписаны: **ДЛЯ ШПРИЦЕВ**) с дезинфицирующим раствором (они стоят на столе в секционной);
2. Шприцы (без игл!) и ампулы выбрасывать только в предназначенные для этого желтые контейнеры с дезинфицирующим раствором (подписаны: **ДЛЯ ШПРИЦЕВ**);

3. Трупы лабораторных животных и патматериалы сбрасывать в желтые пакеты, предназначенные для биологически опасных отходов класса Б, с указанием кода подразделения, наименования лаборатории, даты и ответственного лица и кладем в предназначенную для этого морозильную камеру, либо передайте их персоналу, ответственному за вывоз биологических отходов;

4. Запрещается оставлять трупы животных на полу, столах и в любых непредназначенных для этого местах.

#### Список литературы:

- Baumans V. Assessment of discomfort in rats, induced by orbital puncture/ Baumans V., Herck H. van, Boer S.F. de, Gugten J. van der, Beynen A.C. // Zeitschrift fur Versuchstierkunde. - 1990 - JST° 33. - P. 10-15.
- Baumans V. Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphus: Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Pain and distress by the FELASA Board of Management November 1992/ V. Baumans, P. F. Brain, H. Brugere, P. Clausing, T. Jeneskog and G. Perretta // Lab Animal. - 1994.
- Baumans V. Testing housing systems for mice- the value of a preference test./ Baumans V. Stafleu F.R., Bouw J. // Zeitschrift fur Versuchstierkunde. -1987. -No29. -P. 9-14;
- ETSN 123 (ЕВРОПЕЙСКАЯ КОНВЕНЦИЯ о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. – Страсбург.- 1986.
- Forsythe D.B. Evaluation of Telazol-xylazine as an anesthetic combination for use in Syrian hamsters/ Forsythe D.B., Payton A.J., Dixon D., Myers P.H., Clark J.A., Snipe J.R.//Laboratory Animals Science. - 1992. - No42(5). - P. 497-502;
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. - National Research Council, National Academy Press. - 2011;
- Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook, 2<sup>nd</sup> edition. -ARENA. - 2002;
- International Association for the Study of Pain (IASP). - 2010;
- Morton D.B. Adverse effects in animal and their relevance to refining scientific procedures/ Morton D.B. //Alternatives to laboratory animals. - 1990.- fl°18.-C. 29-39.
- Palmer D. Polyclonal antibody production and adjuvants - a dilemma/ Palmer D., Masters A, Deol H.// ANZCCART News. - 1997. - JSTelO. - P. 2-5;

- Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals. - Washington (DC): National Academies Press (US). - 2008;
- Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. - Washington (DC): National Academies Press (US). - 2009;
- Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1.// Laboratory Animals. - 1996. - N230. - P. 293-316;
- Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2.// Laboratory Animals. - 1997. - JST°31. - P. 1-32;
- Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement.// Laboratory Animals. - 2001. - JST°35(1). - P. 1-41;
- Removal of blood from laboratory mammals and birds. First report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW joint working group on refinement.// Laboratory Animals. - 1993. - JST° 27. - P. 1-22;
- Silverman J. Evaluation of a combination of tiletamine and zolazepam as an anesthetic for laboratory rodents./ Silverman J, Huhndorf M, Balk M, Slater *G.I I* Laboratory Animals Science. - 1983. - JST° 33(5). - P. 457-60;
- Suckow M.A. The laboratory rabbit. - CRC Press. - 2010;
- Waynforth H.B. Experimental surgical techniques in the rat, 2<sup>nd</sup> edition./ Waynforth H.B., Flecknell P.A. - London: Academic Press. - 1992.