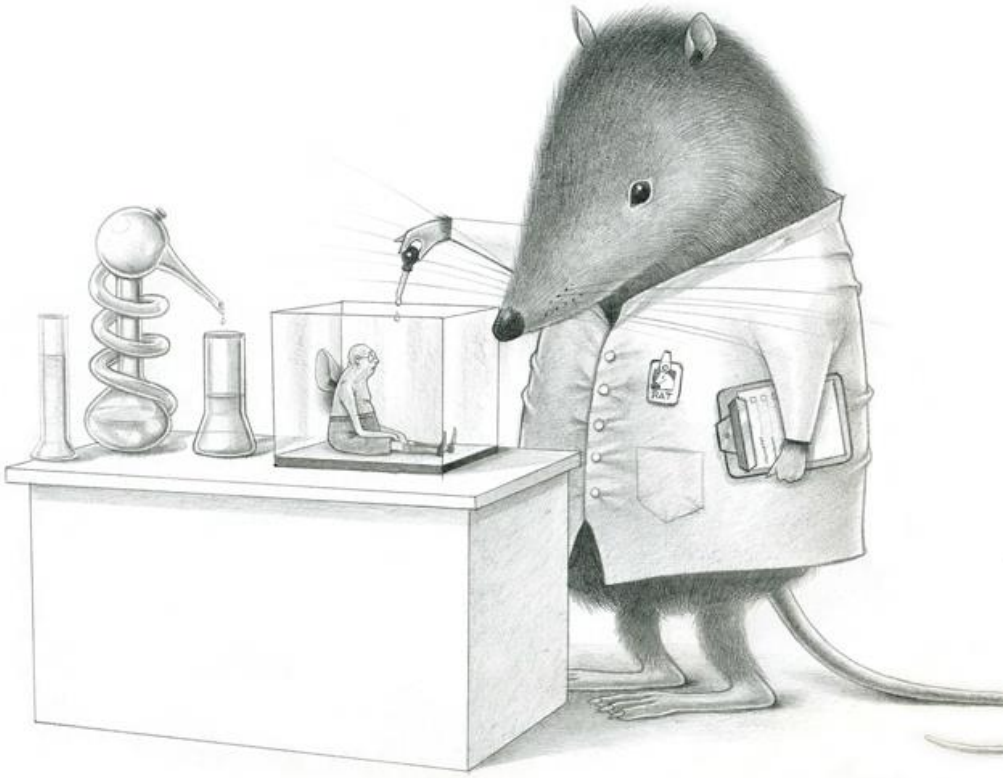
КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
ВЫСШАЯ ШКОЛА МЕДИЦИНЫ
Кафедра морфологии и общей патологии

А.А. Титова, А.И. Билялов, А.П. Киясов, М.А. Титова.

Лабораторные животные для научных исследований

Учебно-методическое пособие



Казань – 2021

УДК 59.084
ББК 28.6с

Печатается по решению Учебно-методической комиссии
Института фундаментальной медицины и биологии
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»
Протокол № 2 от 20.01.2021

Рецензенты:
д.б.н. Ризванов А.А., профессор кафедры генетики,
ИФМиБ ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет»

к.б.н. Гаранина Е.Е., старший научный сотрудник,
НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии,
НКЦ ПРМ ИФМиБ,
ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет»

Титова А.А., Билялов А.И., Киясов А.П., Титова М.А.

Лабораторные животные для научных исследований / А.А. Титова, А.И. Билялов, А.П. Киясов, М.А.Титова – Казань: Казан. ун-т, 2021. – 71 с.

Учебно-методическое пособие подготовлено в соответствии с требованиями учебной программы дисциплины «Методы исследования в биологии и медицине» для медицинских ВУЗов. Учебно-методическое пособие содержит основные сведения о правилах содержания, ухода, а также проведения экспериментов на лабораторных животных.

Учебно-методическое пособие **Лабораторные животные для научных исследований** может быть использовано обучающимися по направлениям: Лечебное дело, Стоматология, Медицинская биохимия, Медицинская биофизика, Медицинская кибернетика и Фармация, а также аспирантами, биологами-бакалаврами и магистрами и всеми, кто использует в своих научных исследованиях крыс и мышей.

© Казанский ун-т, 2021
© А.А. Титова, А.И. Билялов,
А.П. Киясов, М.А. Титова, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

1.ВВЕДЕНИЕ 4
2.ЗАКОНОДАТЕЛЬНЫЕ НОРМЫ ОБРАЩЕНИЯ С ЛАБОРАТОРНЫМИ ЖИВОТНЫМИ 5
2.1 Стандарт GLP 6
2.2 Концепция 3R 7
3.КЛАССИФИКАЦИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ 9
3.1 Классификация лабораторных животных по основным категориям и их использование в биомедицинских исследованиях 9
3.2 Классификация лабораторных животных в зависимости от генетического фона 11
3.3 Мыши 12
3.4 Крысы 18
4. ПОЛУЧЕНИЕ ЖИВОТНЫХ С ДАТИРОВАННЫМ СРОКОМ БЕРЕМЕННОСТИ 20
4.1 Ключевые моменты в развитии крысы 24
4.2 Определение пола и возраста животного 26
5.ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА СОДЕРЖАНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ 27
6.ПЛАНИРОВАНИЕ И ПРОВЕДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА 30
6.1 Выбор животных 30
6.2 Формирование групп животных для исследования 30
6.3 Взвешивание животных 31
7.НАБЛЮДЕНИЕ И УХОД ЗА ЖИВОТНЫМИ ВО ВРЕМЯ ЭКСПЕРИМЕНТА 34
7.1 Боль и виды боли 34
7.2 Признаки острой боли у животных 35
7.3 Клинические признаки дистресса у животных 36
7.4 Фиксация животных 38
8.ВВЕДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ 40
9.ВЗЯТИЕ КРОВИ У ЖИВОТНЫХ 45
10.АНАЛЬГЕЗИЯ/АНАСТЕЗИЯ/НАРКОЗ 47
11.ПРИНЦИПЫ ХИРУРГИИ У ГРЫЗУНОВ 49
12.ЭВТАНАЗИЯ. ДОПУСТИМЫЕ МЕТОДЫ ЭВТАНАЗИИ 53
13.ПРИНЦИПЫ ЗАБОРА МАТЕРИАЛА ДЛЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ 56
Приложение 1. Биологические характеристики мыши, зоотехнические параметры, параметры микроклимата, физиология и биохимия мыши 65
Приложение 2. Биологические характеристики крысы, зоотехнические параметры, параметры микроклимата, физиология и биохимия крысы 67
14.СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 69

1.ВВЕДЕНИЕ

Лабораторные животные – это животные, специально выращиваемые для проведения на них медицинских, ветеринарных и биологических исследований. Они служат для диагностики некоторых инфекционных заболеваний, моделирования экспериментальных острых и хронических инфекционных процессов, установления вирулентности и токсикогенности изучаемых штаммов микробов, определения активности приготовленных вакцин и исследования их на безвредность.

В настоящее время для экспериментальных исследований используют почти всех представителей животного мира: от простейших до высших человекообразных обезьян.

Лабораторные животные подразделяются на основные и дополнительные. К основным относятся: лягушки, крысы, мыши, хомяки, морские свинки, кролики. К дополнительным – птицы, полевки, лошади, обезьяны, собаки, кошки, бараны, ослы. Чаще всего для проведения лабораторных исследований используют крыс, мышей, кроликов, морских свинок, так как обладают чрезвычайно высоким обменом веществ, высокой интенсивностью роста и развития, малым размером тела, большой плодовитостью, непродолжительным сроком беременности, способностью выкармливать свое потомство в короткие сроки. Для исследований создаются специально выведенные в лабораторных условиях линии животных.

В работе с лабораторными животными к ним предъявляются определенные требования, которые будут описаны и раскрыты в данном учебно-методическом пособии.

2.ЗАКОНОДАТЕЛЬНЫЕ НОРМЫ ОБРАЩЕНИЯ С ЛАБОРАТОРНЫМИ ЖИВОТНЫМИ

В 1865 году было создано Российское общество покровительства животным, деятельностью которого, прежде всего, является борьба с жестоким обращением человека с животными.

В настоящее время в Российской Федерации приняты следующие законы:

- Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ "Об обращении лекарственных средств";
- Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н "Об утверждении Правил лабораторной практики";
- Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, 2005 г.;
- Вопросы, касающиеся проведения ветеринарного надзора, регламентируются в ФЗ РФ «О ветеринарии» № 4979-1 от 14.05.1993 г.;
- С марта 2010 г. в силу вступил национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», полностью аутентичный принципам разработанных в США стандартов GLP действующих уже более 20 лет и получивших распространение в международном масштабе.

Так же следует обратить внимание на Хельсинкскую декларацию2000 г. о гуманном отношении к животным, Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях

2.1 Стандарт *GLP* («*Good Laboratory Practice*» Правильная Лабораторная Практика) — система норм, правил и указаний, направленных на обеспечение согласованности и достоверности результатов лабораторных исследований.

Неукоснительное соблюдение этических норм и правил при проведении любых исследований с использованием животных — это так же требования стандарта *GLP* — правильной лабораторной практики.

Правила *GLP* включают в себя:

- Требования к организации испытаний;
- Требования к личному составу исследователей;
- Требования к помещениям, в которых проводятся испытания и содержатся животные;
- Требования к качеству животных, к условиям их содержания и кормления;
- Требования к лабораторному оборудованию и его калибровке;
- Требования к испытуемому и контрольному веществу;
- Требования к составлению и проведению подробной стандартной методики экспериментальных работ и к порядку проведения испытаний;
- Требования к регистрации данных и оформлению отчета.

2.2Концепция 3*R*

В 1959 году увидела свет книга У. Рассела и Р. Берча «*The Principles of Humane Experimental Technique*».

В этой книге учёные мира опубликовали свой манифест, обосновывая необходимость гуманного использования животных в экспериментах. У. Рассел и Р. Бэрч впервые ввели **правило 3*R***, или **концепцию 3*R*:**

- ***Replacement***: выбор и замена;
- ***Reduction***: уменьшение количества животных в эксперименте;
- ***Refinement***: уменьшение дистресса, боли и страданий.

Концепция 3*R* — основа *GLP*-стандарта в разделе, касающемся тест-систем.

Replacement: выбор и замена в опыте, когда это возможно, животных высокоорганизованных менее развитыми живыми объектами, альтернативными методами, экспериментами на

- культуре клеток и тканей,
- изолированными органами,
- физико-химическими и биохимическими системами,
- экспериментами на микроорганизмах и растительных объектах,
- компьютерными и математическими моделями.

Информация о существующих альтернативных методах регулярно публикуется во многих международных журналах, наиболее популярным из которых признан *ATLA* (*Alternatives To Laboratory Animals*).

Reduction: адекватность и стандартизация – <u>достижение воспроизводимых результатов с использованием минимального количества животных</u>:

- адекватный выбор лабораторных животных;
- использование стандартных по микробиологическим, генетическим и экологическим параметрам животных;

- оптимальное планирование;
- использование статистических методов не только при обработке полученных данных, но и на стадии планирования (крайне важно!);
- полноценный корм, сбалансированный по всем компонентам, обеспечивающий здоровье животного, поддерживающий неспецифическую резистентность его организма на высоком уровне (важнейшее условие!).

Все эти моменты, не учитываемые при проведении эксперимента, искажают и даже извращают его результаты.

Refinement: уменьшение дистресса, боли и страданий

Улучшение условий содержания лабораторных животных и применение обезболивающих средств (не в ущерб цели эксперимента) уменьшают дистресс животных во время эксперимента.

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

3. КЛАССИФИКАЦИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Основным критерием классификации по системе GLP является принцип недопустимости носительства ряда патогенных и условно-патогенных агентов инфекционной и инвазивной природы: вирусов, бактерий, паразитов. В *Таблице 1*. приведена классификация лабораторных животных по основным категориям и использование животных в биомедицинских исследованиях.

Таблица 1.

3.1 Классификация лабораторных животных по основным категориям и их использование в биомедицинских исследованиях

Характеристика	Метод получения	Барьер	Использование
Конвенциональные (CV)	Случайный	Отсутствует	Обучение, острые опыты
Улучшенные конвенциональные (Minimal Deseases)	От животных более высокой категории качества	Неполная барьерная система	Рутинные исследования, кратковременные эксперименты
Гнотобиотные* (категории GFX)	Используются для описания животных и систем, все формы жизни в которых известны.	Изолятор со специальным контролем	Используются в ветеринарии для изучения болезней, сельскохозяйственных животных с невыясненной этиологией, а также для выяснения роли микробов в патогенезе многих болезней получение культур клеток при производстве вакцин, поддержание штаммов бактерий и
Безмикробные (аксенные GF)	Для получения животных используют гистерэктомию. Свободный от любой или известной формы жизни микроорганизмов.	Изолятор	

SPF (СПФ) ** **Максимально свободные от условно-патогенной флоры**	От гнотобиотных или безмикробных животных, ассоциированных с определенными микроорганизмами	Барьерная система высокой степени надежности	вирусов перевиваемых опухолей, испытание новых фармакологических средств и т.д.
SPF (СПФ) ** **Свободные от патогенной флоры**	От животных, содержащихся в изоляторах и ассоциированных с определенными микроорганизмами	Барьерная система	Эксперименты длительностью 6 мес.

*** Гнотобиотные животные – биомодели** (греч. *gnotos* — известный и *bios* — жизнь), стерильные животные, а также животные, микрофлора которых представлена одним или несколькими видами микроорганизмов. На основе использования гнотобиологической техники проводятся работы по предупреждению инфекционных болезней сельскохозяйственных животных: создаются стада животных типа СПФ (без специфических патогенных факторов). *Безмикробные и гнотобиотические модели не являются альтернативой экспериментам с использованием обычных животных, это объекты, пригодные для специфических исследований.*

**** СПФ животные** (*spezifisch pathogenfrei*), которые свободны только от патогенных микроорганизмов. В их организме имеются все необходимые для нормальной жизнедеятельности бактерии и вирусы, которые в совокупности создают группу так называемой резидентной, полезной микрофлоры. В настоящее время получены СПФ-лабораторные животные (крысы, мыши, морские свинки, кролики и др.), а также СПФ - поросята и СПФ - птицы. Хозяйства, включающие СПФ стада, должны работать по типу закрытых предприятий со строгими ветеринарно-санитарными правилами режима хозяйства.

3.2 Классификация лабораторных животных в зависимости от генетического фона:

- Инбредные или линейные животные: получают искусственно путем братско-сестринских скрещиваний на протяжении > 20 поколений. 100% гомозиготность, максимальная гомогенность данных (Рис. 9, 10, 11, 12, 13.).
- Аутбредные или нелинейные. Для разведения требуется большое количество животных, процент инбридинга не более 1%. Характеризуются понятием «сток». Дают максимальное разнообразие (Рис. 14, 16.).
- Генномодифицированные (биомодели): нокауты, трансгены, нокдауны и тд. (Рис. 4, 6, 7, 20.)

3.3 Мыши

Лабораторные мыши (*Mus musculus L.)* происходят от серой домовой мыши, которая принадлежит к отряду грызунов (*Rodentia*), семейству мышевидных (*Muridae*).

Мышиные – одни из самых многочисленных животных среди млекопитающих.

В качестве лабораторных животных мыши наиболее часто используются в лабораторной практике (*Таблица 2*). Лабораторные мыши используются для проведения бактериологических, токсикологических, мутагенных и канцерогенных исследований, в стандартизации гормональных препаратов, вакцин и сывороток, а также в различных генетических и молекулярно-биологических исследованиях.

Мыши обладают чрезвычайно высоким обменом веществ, высокой интенсивностью роста и развития, малым размером тела.

Мыши отличаются большой плодовитостью, непродолжительным сроком беременности, способностью выкармливать свое потомство в короткие сроки.

В настоящее время с помощью методов селекции выведено свыше 200 линий лабораторных мышей, которые используются как биологические модели самых разнообразных заболеваний, широко распространены в учебном процессе и научно-исследовательской работе, например, с повышенной способностью к регенерации (MRL), инсулинрезистентные мыши (NOD), с повышенной способностью к обучению (Doogie). Больше примеров смотри в *Таблице 2.*

Таблица 2.

Самые известные линии лабораторных мышей

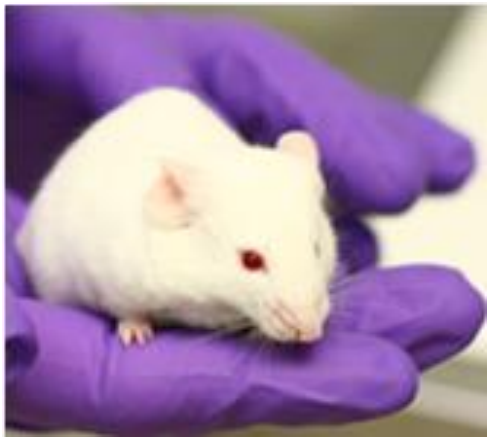


Рис. 1. Лабораторные мыши исходного «дикого типа» *BALB/c, C57BL/6*

Рис. 2. Лабораторные мыши с дефицитом лептина: *Ob/ob*

Рис. 3. Лабораторные мыши иммунодефицитные: *nu, scid*

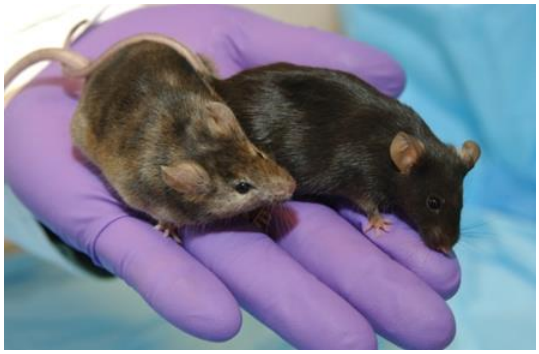


Рис. 4. Лабораторные мыши генномодифицированные с геном, определяющим рост шерсти (слева)
Рядом нормальная лабораторная мышь

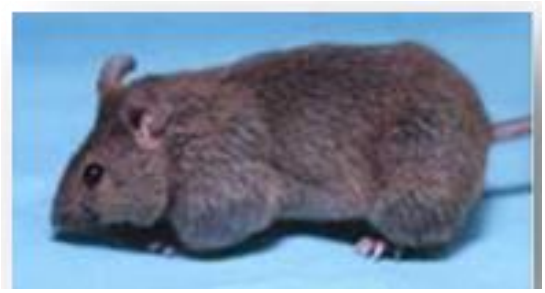


Рис. 5. **Лабораторные мыши с увеличенной мышечной массой**: *myostatin-knockout*

Рис. 6. Лабораторные мыши трансгенные со специальными свойствами: *GFP*

Рис. 7. Лабораторные мыши *NOD/SCID*

Лабораторные мыши с экспрессией зелёного флуоресцентного белка *NOD/SCID* (Рис. 7.)

Рис. 8. Лабораторная мышь аутобредная, *SHK и ICR(CD-1)*

Лабораторные мыши аутобредные *SHK и ICR(CD-1)* (Рис. 8.) - генетически контролируемая закрытая колония нелинейных мышей, гетерозиготных по неопределенному числу генов. Окраска шерсти – белая. Используются для оценки безопасности лекарственных препаратов, биологически активных добавок, косметических средств.

Рис. 9. **Лабораторная мышь, инбредная линия**, *CBA/CaLac*

Универсальная линия лабораторных мышей, инбредная линия, *CBA/CaLac* (Рис. 9.), масть – агути, генотип - +, *H-2k.*

Используются в радиологии, медико-биологических исследованиях, для изучения спонтанных опухолей печени, могут быть рекомендованы как долгожители. Хорошая модель для изучения зависимости течения

беременности от возраста.

Рис. 10. Лабораторная мышь, инбредная линия, *CBA/J*

Лабораторные мыши, инбредная линия, *CBA/J*, (Рис. 10.) масть – агути, генотип +, *rd, H-2k.* Используются в онкологии, радиологии, генетике, физиологии, в исследованиях иммунологической толерантности. Опухоли молочных желез у 75% самок.

Рис. 11. Лабораторная мышь, инбредная линия, *DBA/2J*

Лабораторные мыши, инбредная линия, *DBA/2J,* (Рис. 11.), масть – осветленная коричневая, генотип – *a, b, d, H-2d,*
используются широко, особенно в онкологических исследованиях, опухоли молочных желез и лейкоз у 30% особей.

Рис. 12. **Лабораторная мышь, инбредная линия**, *BALB/CJLac*

Лабораторные мыши *BALB/CJLac*, инбредная линия, (Рис. 12.), масть – белая, альбиносы, генотип – *b, c, H-2d, и*спользуются во всех областях медико-биологических исследований.

Могут служить моделью для изучения потенциальных фибринолитических компонентов, лизисов и процессов формирования тромбозов. Рекомендуются при изучении нарушений репродуктивной функции, обусловленной

микоплазмами. У 60% самок тромбоз левого предсердия, радиочувствительны.

Рис. 13. Лабораторная мышь, инбредная линия, *C57Bl/6J*

Лабораторные мыши *C57Bl/6J, (Рис.13.)* инбредная линия, масть – черная, генотип – *a, H-2b.* Используются во всех медицинских и биологических исследованиях.

Служит для изучения скелетных аномалий, дефектов развития головы и глаз. Является стандартной линией для поддержания мутаций (физиологических, поведенческих и окраски шерсти).

Эталон для сравнения с особенностями других инбредных линий в исследованиях культур тканей, загрязнения атмосферы, гематологии, химиотерапии рака, радиации, питания.

Рис. 14. Лабораторная мышь аутобредная линия, *SHK и ICR(CD-1)*

Лабораторные мыши аутобредные *SHK и ICR(CD-1)* (Рис. 14.) - генетически контролируемая закрытая колония нелинейных мышей. Гетерозиготны по неопределенному числу генов. Окраска шерсти – белая. Используются для оценки безопасности лекарственных препаратов, биологически активных добавок, косметических средств.

Рис. 15. Лабораторная мышь межлинейный гибрид: *F1 CBA/Lac x C57/BL/6*

Межлинейные гибриды F1(Рис. 15.) генетически и фенотипически однородны, обладают большей устойчивостью к изменениям внешней среды. Наследуют генетические особенности родительских линий, но не сохраняют всех их характеристик.

Ответ организма на воздействие однотипный и стабильный, воспроизводимость результатов высокая. Широко используются в биологических, медицинских исследованиях, особенно в экспериментах по онкологии, радиации.

3.4 Крысы

Крысы относятся к роду *Rattus*, семейство мышевидных *Muridae*. Лабораторная крыса выведена из серой крысы (*Rattus norvegicus*). Крысы – социальные животные, они избегают открытые пространства и используют мочевые метки для маркировки территории.

Обоняние и слух у них развиты сильно, при этом крысы особо чувствительны к ультразвуку. Дневное зрение слабое, но у некоторых пигментированных линий при неярком свете зрение достаточно острое.

Крысы отличаются более крупными размерами, чем мыши, что требует известной осторожности при работе с ними.

Крысы обладают практически теми же свойствами, что и мыши, которые делают их столь необходимыми для научных исследований

Область использования: токсикологические исследования, изучение вопросов питания, стандартизация гормональных препаратов, различные исследования, а также изучение опухолей и инфекционных заболеваний.

Таблица 3.

Известные линии крыс

Рис. 16. Лабораторная аутбредная крыса дикого типа, *Wister*

Лабораторные аутбредные крысы дикого типа, *Wister* (Рис. 16.) имеют белую шерсть (альбиносы). Генотип - генетически контролируемая закрытая колония нелинейных крыс. Используются в онкологических

исследованиях, тератологии, для изучения проблем питания и старения

Рис. 17. Лабораторная крыса иммунодефицитная: *Rowett, Fuzzy, Shorn*

Рис. 18. Лабораторная крыса: *Sprague-Dawley*

Рис. 19. Лабораторная крыса с ожирением: *Zucker*

Рис. 20. Лабораторная крыса трансгенная со специальными свойствами: *Wistar GFP*

- Лабораторные крысы инсулинрезистентные: *BB/Wor*
- Лабораторные крысы онкогенные: *Lewis*
- Лабораторные крысы нокаутные: моделируют болезни Паркинсона, Альцгеймера, артериальную гипертензию, атеросклероз и тд.

.

4. ПОЛУЧЕНИЕ ЖИВОТНЫХ С ДАТИРОВАННЫМ СРОКОМ БЕРЕМЕННОСТИ

Лабораторные грызуны относятся к полиэстральным животным. Средняя продолжительность эстрального цикла (период времени между двумя последующими овуляциями) у мышей и крыс равна 4-5 суток. В течение этого астрального цикла у них происходят заметные и предсказуемые гистологические изменения влагалищных мазков, причем только в день эструса в мазках содержится большое количество ороговевших клеток (Рис. 22.). Этот факт впервые был обнаружен у морских свинок в 1917 году. Английский исследователь Хипп на основании морфо-функциональных изменений, происходящих в половом аппарате самки, выделил следующие стадии полового цикла.

Эстральный цикл состоит из пяти последовательных стадий:

- проэструс (предтечка),
- эструс (течка),
- метэструс I (послетечка I),
- метэструс II (послетечка II),
- диэструс (стадия покоя).

Спаривание происходит на стадии течки (эструса).

Каждой стадии эстрального цикла соответствует определенный клеточный состав влагалищного мазка (Рис. 21- 24).

Проэструс (предтечка, стадия возбуждения) — начало быстрого роста фолликулов. Мазок, взятый на стадии проэструс почти исключительно состоит из эпителиальных клеток, лежащих поодиночке или группами. Одиночные клетки – овальной формы, расположенные в группах, большой частью угольчатые. Все эпителиальные клетки содержат ядра (Рис. 21.).

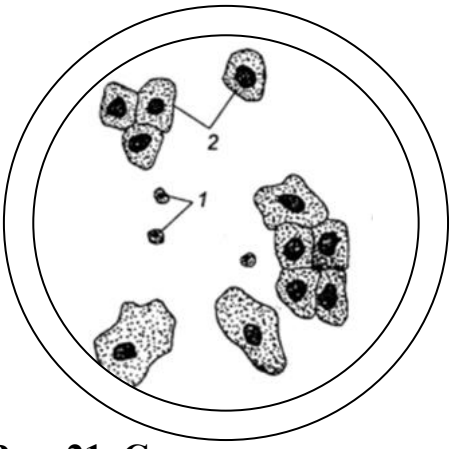


Рис. 21. Стадия проэструс

1 — лейкоциты, 2 — эпителиальные клетки

Эструс (течка) — стадия полового возбуждения — занимает господствующее положение. Отмечаются расслабление канала шейки матки и вытекание из него слизи (отсюда название течка). Завершается рост фолликула и происходит овуляция — его разрыв и выход яйцеклетки. Животное стремится к спариванию и допускает садку.

Во время стадии эструс – эпителиальные клетки исчезают, в поле зрения находятся только безъядерные ороговевшие чешуйки, лежащие небольшими группами. Чешуйки имеют угольчатую форму (Рис. 22.).

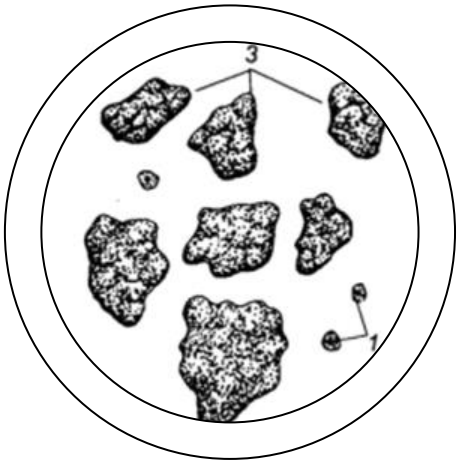


Рис. 22. Стадия эструс

1 — лейкоциты, 3 — спущенные безъядерные чешуйки.

Метэструс (послетечка, стадия торможения) — эпителиальные клетки вскрывшегося фолликула превращаются в лютеиновые, формируется желтое тело. На стадии *метэструс I* чешуйки образуют беловатые скопления, хорошо заметные на стекле при нанесении мазка (Рис. 23.). На стадии *метэструс II* – среди массы ороговевших чешуек появляются лейкоциты и единичные эпителиальные клетки, т. е. могут иметься все три типа клеток.

В конце стадии преобладают лейкоциты и появляется слизь, чешуйки постепенно исчезают.

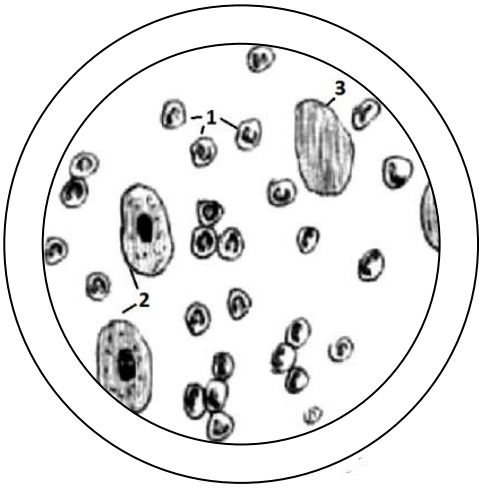


Рис. 23. Стадия метэструс II

1 — лейкоциты, 2 — эпителиальные клетки, 3 — спущенные безъядерные чешуйки

Диэструс, стадия уравновешивания — период между следующими один за другим циклами. В этот период отмечается доминирование желтого тела.

На стадии диэструс в поле зрения множество лейкоцитов, единичные эпителиальные клетки, значительное количество слизи.

Иногда за стадией диэструс следует стадия анэструс — длительный период полового покоя, в течение которого функция яичников ослаблена. Развитие фолликулов не происходит.

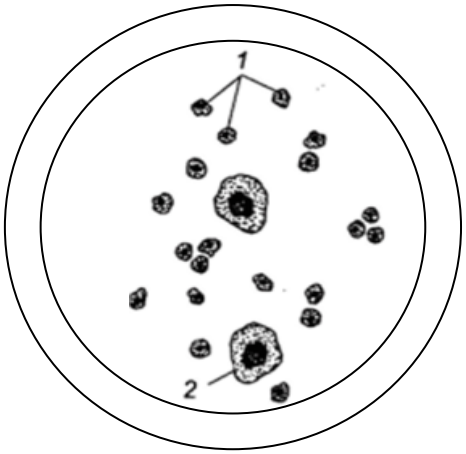


Рис. 24. Стадия диэструс

1 — лейкоциты, 2 — эпителиальные клетки,

Протокол получение мышей с датированным сроком беременности:

- половозрелых самок в возрасте 1,5 – 2 месяцев подсадите к самцам из расчета 1:3 (на 1 самца 3 самки);
- подсаживать лучше утром, около 8 часов утра;
- длительность совместного пребывания самцов с самками не должна превышать 1 часа;
- спаривание у мышей констатируют по наличию во влагалище слизистого сгустка (вагинальной пробки), которая хорошо заметна при внешнем осмотре;
- вагинальная пробка сохраняется в течение 16-24 часов.

Протокол получение крыс с датированным сроком беременности. Метод вагинальных мазков.

Вечером:

- возьмите мазок тонкой стерильной палочкой;

- разотрите мазок по предметному стеклу;
- дайте мазку высохнуть в течение 3-4 минут;
- зафиксируйте мазок в 96% метиловом спирте;
- окрасьте мазок метиленовым синим в течение 15-20 минут;
- отбирите самок на стадии *проэструса* – раннего *эструса*.
- подсадите самок к самцам (1:3).

Утром следующего дня:

- произведите повторный анализ вагинальных мазков на наличие сперматозоидов;
- **день обнаружения сперматозоидов считать первым днём беременности**.

4.1 Ключевые моменты в развитии крысы.

Стадии развития крысы со дня рождения до 6 недели представлены в рисунках (Рис. 25. и Рис. 26.)

Определение пола у животных, в *Таблице 4*.

Рис. 25. Ключевые моменты в развитии крысы от рождения до 7 дня

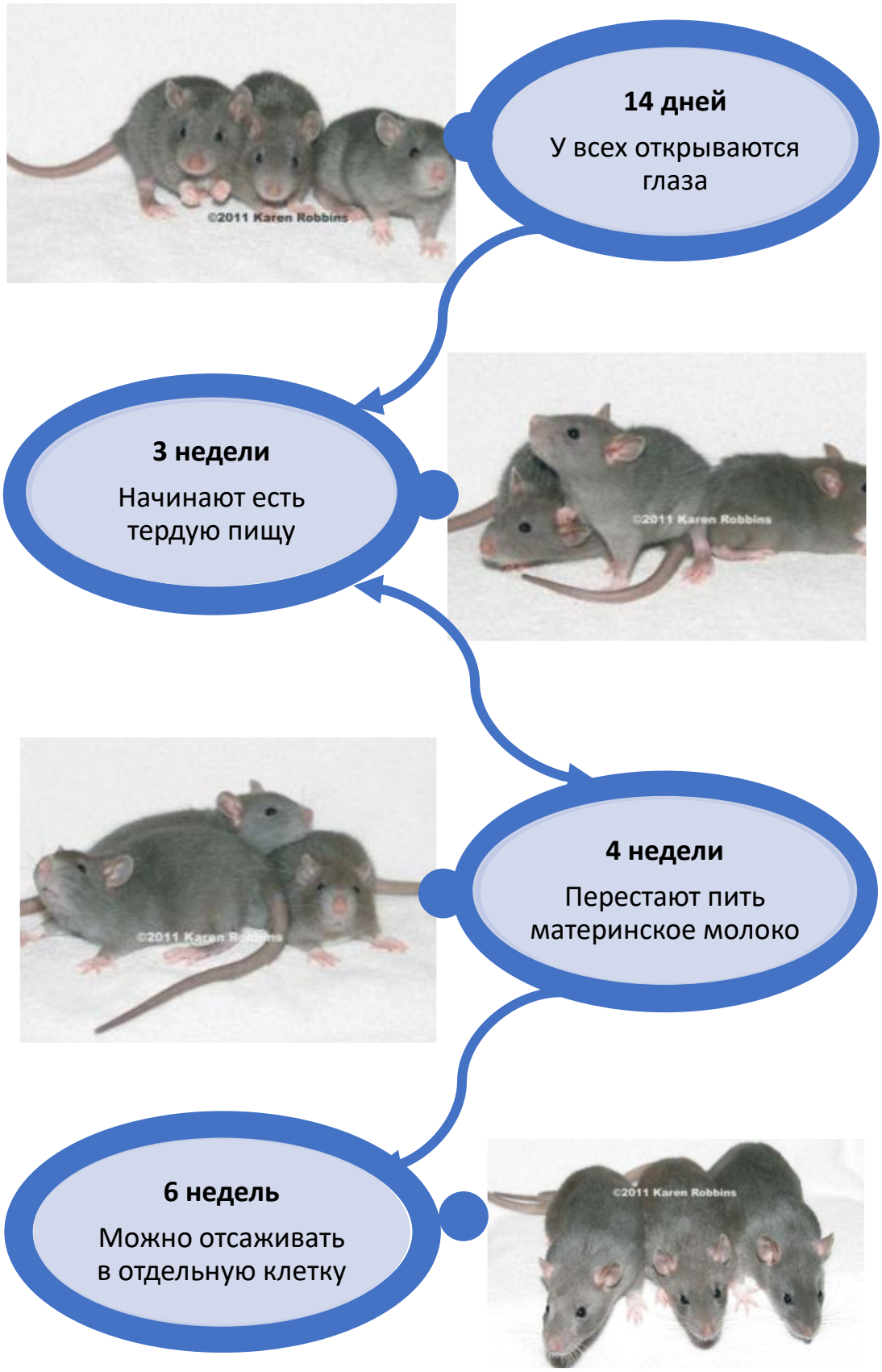
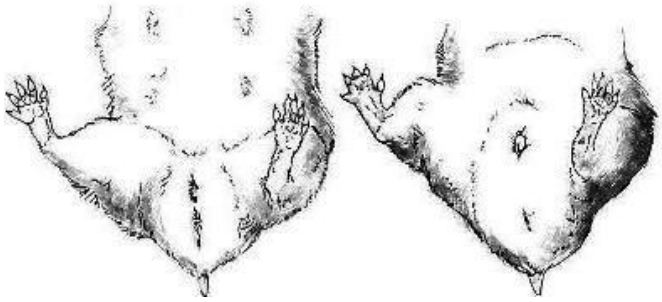
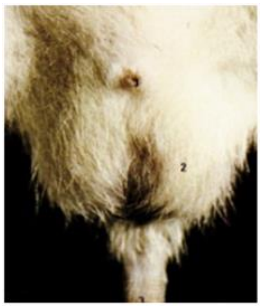


Рис. 26. Ключевые моменты в развитии крыс с 14 дня до 6 недель

Таблица 4

4.2 Определение пола животного

Обратите внимание на:	**у самцов**	**у самок**
расстояние между половыми органами и анальным отверстием 	больше, чем у самок 	меньше, чем у самцов
наличие сосков на животе	нет	есть
два темных пятнышка, на месте которых потом появятся тестикулы	есть	нет

5. ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА СОДЕРЖАНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Проблемы в содержании чаще всего возникают из-за неудовлетворительных гигиенических условий в клетке и несбалансированной диеты. Несбалансированное кормление приводит к ожирению.

Если клетку не чистить регулярно, повышается уровень аммиака, что приводит к заболеванию дыхательных путей. Влажное от мочи место отдыха зверьков может стать причиной возникновения брюшного дерматита, пододерматита и поражения хвоста.

Лабораторным животным в виварии должны быть обеспечены:

- полноценное кормление, свежая вода;
- достаточного размера клетка и чистая подстилка;

Необходимо ежедневно следить за:

- поддержанием нормального состояния здоровья;
- удовлетворением физиологических и поведенческих потребностей;

Важно!!! быстро устранять факторы, которые могут повлечь за собой стресс и страдания животных.

Требование к клетке:

- на одну крысу 150 см^2;
- на одну мышь 40 см^2;

Но!!! В одну клетку (даже очень большую) не больше 10 крыс или 15 мышей!!!

Требования к корму:

- кормить лабораторных животных необходимо полнорационным гранулированным комбикормом с содержанием около 16% белка (до 20%, если животное используется в разведении) и 5% жира;
- комбикорм следует хранить в сухих, чистых, хорошо проветриваемых, складских помещениях, не имеющих посторонних запахов;

- во время еженедельной чистки клеток и аксессуаров остатки корма вынести и утилизировать;
- из клетки в клетку корм не переносить;
- корм, упавший на пол, в кормушки не возвращать, выносить из комнаты и утилизировать;
- в сутки каждая крыса потребляет 5-6 г на 100 г веса;
- в сутки каждая мышь потребляет 12-18 г на 100 г веса;
- животные погибают без пищи через 3-4 дня.

Требования к воде:

- необходим свободный и постоянный доступ к воде;
- вода для питья должна быть чистой и свежей.
- среднесуточное потребление воды:
  - 15 мл на 100 г массы тела для взрослых мышей;
  - 10 мл на 100 г веса для крыс.

Требования к подстилке:

Выбор подстилки:

рекомендуется использовать опилки, стружки или мелкую щепу (длина 5–20 мм, толщина 1–2 мм) из экологически чистой древесины лиственных пород.

Худший вариант – опилки, они хуже всего впитывают жидкость, пахнут, сильно разлетаются, пылят, требуют частой замены;

- древесный прессованный наполнитель (пеллеты) – лучше опилок. Но может оказаться травматичным для лап и вызывать пододерматит;

Лучший вариант – кукурузный наполнитель: состоит из дробленых кукурузных стержней, хорошо впитывает жидкость, безопасен для животных. его удобно просеивать от помета.

Смена подстилки:

- один раз в 5-7 дней или по мере необходимости;
- при смене подстилки клетка обязательно моется и просушивается;

- чистая подстилка рассыпается в клетки из расчета 0,5 л на 500 см².
- аксессуары клетки (решетка, разделитель для корма, карточкодержатели), стеллажи и пол также моются **еженедельно**.

6. ПЛАНИРОВАНИЕ И ПРОВЕДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА

6.1 Выбор животных

Для каждого вида животных характерны определенная температура тела, частота дыхания, определенная масса тела, количество приплода, продолжительность жизни и т.п. (табл.1 из приложения). При подборе животных для опыта всегда необходимо учитывать их физиологическое состояние. Изменение физиологической нормы свидетельствует о заболевании и непригодности животного для исследований.

6.2 Формирование групп животных для исследования

Идентификация животных:

К основным методам идентификации лабораторных грызунов относят:

- карточку (этикетку) на клетке,
- прокол (надрез) ушной раковины, ярлыки (бирки) на ушной раковине, татуаж, маркеры, микрочипирование.

Применяемые в нашей лаборатории методы индивидуальной идентификации:

- надрез ушной раковины с помощью острых ножниц: применяют для животных участвующих в длительных экспериментах (Рис. 27.);
- маркировка шерсти (кожи) чернилами (зеленкой). Подходит только для животных альбиносов. Метку нужно обновлять каждые 24-28 часов.

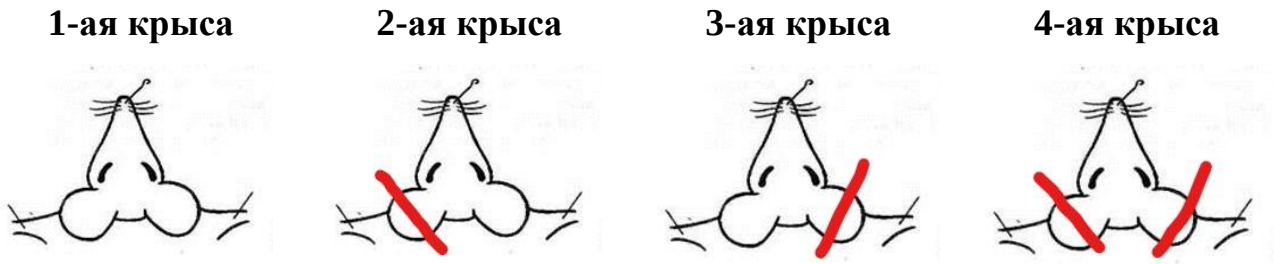


Рис. 27. Схема нанесения меток

6.3 Взвешивание лабораторных животных

– процедура определения массы тела животного при помощи весов, необходимая для оценки состояния животного до, во время и после эксперимента.

Взвешивание животных проводят:

- 1 раз в неделю при рутинных манипуляциях,
- 2 и более раз при проведении экспериментов, согласно протоколу исследования.

Для взвешивания лабораторных животных используют настольные электронные весы средней точности (Рис. 28.).

Взвешивание мелких грызунов выполняют на весах с наибольшим пределом взвешивания 200-500 г, с наименьшим пределом взвешивания 1 г и ценой деления 0,02-0,1 г.

Протокол взвешивания животных:

- разместите весы на ровной, прочной и устойчивой поверхности на расстоянии 15-20 см от края стола;
- отрегулируйте горизонтальное положение весов по уровню с помощью винтовых ножек (весы установлены горизонтально, если пузырёк воздуха находится в центре контрольной окружности уровня);
- включите весы;
- выберете нужные вам измерения (мг, г или кг);

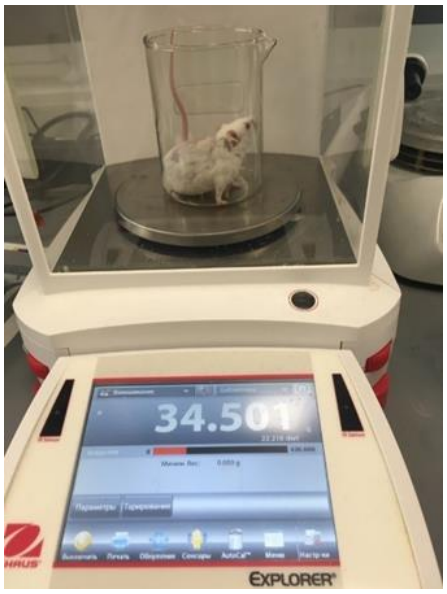


Рис. 28. Весы лабораторные, электронные

- установите на платформе весов ёмкость с высокими бортиками (с учётом размера взвешиваемого животного);
- обнулите весы;
- установите на весах режим динамического взвешивания;
- поместите животное в ёмкость с высокими бортиками, стоящую на платформе весов;
- нажмите на весах кнопку «старт»;
- дождитесь, пока цифра на табло зафиксируется;
- запишите вес животного в протокол исследования.

После взвешивания:

- при необходимости проведите маркировку животного, используя применяемые в нашей лаборатории методы индивидуальной идентификации (Рис. 27.);
- после взвешивания всех животных выключите весы;
- ёмкость для взвешивания вымойте и высушите;
- рабочую поверхность весов протрите и обработайте 70% раствором этилового спирта;
- запишите в журнал дату использования весов, количество взвешенных животных, фамилию экспериментатора.

7. НАБЛЮДЕНИЕ И УХОД ЗА ЖИВОТНЫМИ ВО ВРЕМЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

К страданию животного может привезти неприятное сенсорное и эмоциональное ощущение, связанное с повреждением ткани. Назовём это ощущение болью.

7.1 Боль и виды боли:

Боль (по определению Международной Ассоциации Изучения Боли) — это неприятный чувствительный и эмоциональный опыт, ассоциированный с имеющейся или потенциальной травмой ткани.

Многие исследователи считают, что термин **боль** – это для человека, для животных - **ноцицепция**.

Все люди и практически все животные обладают особыми рецепторами с очень высоким порогом, которые возбуждаются только стимулами, повреждающими или грозящими повредить окружающую ткань. Рецепторы, реагирующие на такие «вредные» стимулы, названы **ноцицепторами**, а активируемые ими нейронные структуры ноцицептивной системой.

Сама по себе боль, по упрощённой физиологической классификации, бывает разная:

— **ноцицептивная** (нормальная боль, как ни странно, это боль, которая возникает, если нормальному животному нанесли травму, например боль от разреза мягких тканей при хирургических операциях),

— **нейропатическая** (боль, которая возникает при повреждении нервной ткани),

— **воспалительная** (возникает при любом типе воспаления).

- **кратковременная**: продолжается недолго, временная (секунды) и, как правило, низкой интенсивности;
- **постпроцедурная / постоперативная**: длиться дольше, чем кратковременная (часы, дни, иногда недели) и возникает после тканевого поражения вследствие хирургических операций или другой процедуры;
- **продолжительная:** длится дни и недели, встречается при экспериментальном моделировании боли (механизмы боли в этом случае отличаются от механизмов постпроцедурной боли);

хроническая: длится долго (дни, недели, месяцы), характерна для дегенеративных заболеваний, без облегчения, сложно определяется клинически.

Так можно ли применять понятие **боль** к животным?

!!Если боль у животных не может быть оценена теми же методами, что и у человека,

то решение о самочувствии животных принимаются исследователями исходя из предположения об их отсутствии!!!

7.2 Признаки острой боли у животных (признаки страдания животного):

- попытки защитится, убежать или укусить;
- вокализация (писк, крик, стон) при пальпации или попытках проведения процедур на пораженном участке;
- облизывание, кусание, царапание, встряхивание или потирание пораженного участка;
- беспокойство, постоянное движение, смена позы (животное встает/ложится);
- отказ двигаться или вставать.

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.

7.3 Клинические признаки дистресса у животных:

- поверхностное, затрудненное, частое дыхание (аномальное дыхание);
- нарушение груминга, ухудшение состояния шерсти – сальность, неопрятность шерсти;
- остекленевшие или бегающие, расфокусированные глаза;
- сгорбленная поза, животное постоянно прячется в угол клетки или лежит на одном боку, малоподвижно;
- отсутствие реакции на внешние раздражители;
- частая смена веса (животное то худеет, то поправляется);
- отсутствие или изменение частоты выделения мочи и фекалий, изменение объема, цвета, запаха мочи, консистенции фекалий, рвота;
- частая и интенсивная вокализация.

Необходимо предпринимать следующие меры:

- использование в эксперименте наиболее подходящих и гуманных методов;
- составление четкого плана эксперимента для устранения нежелательных последствий от манипуляций, снижающего боль и дистресс;
- использование незамедлительных мер для предотвращения боли и дистресса;
- использование анестезии, анальгезии и транквилизаторов, подходящих для выбранного вида животных и целей эксперимента;

- проведение эксперимента в минимальные сроки;
- использование компетентного персонала для ухода за животными;
- использование подходящих методов эвтаназии.

Животное необходимо досрочного вывести из эксперимента, если:

- потери веса от первоначального превышает 20%;
- произошла потеря в весе более чем 10% за 24 часа;
- рост опухоли более чем на 10% превышает вес животного;
- развился абсцесс;
- температуры тела резко упала;
- животное само себя покалечило;
- животное не способно самостоятельно есть и пить;
- находится в состоянии дистресса.

7.4 Фиксация лабораторных животных

Фиксация - ограничение движения животного - бывает двух видов (рис. 29.):

- **мануальная** - ограничение подвижности животного руками, ее предпочтительно использовать для не длительной фиксации;
- **механическая** - используют специальные фиксаторы: жакеты, цилиндры, станки; или окутывают тело салфеткой; применяется для длительной фиксации.

Мануальная фиксация

Механическая фиксация (цилиндр)

Рис. 29. Примеры мануальной и механической фиксации

При ограничении подвижности животных придерживайтесь следующих рекомендаций:

- выбирайте метод фиксации, доставляющий наименьший дискомфорт животному;
- убедитесь, что размер фиксатора подходит животному;
- никогда не применяйте чрезмерную силу;
- предварительно приучите животное к фиксатору, например, дайте животному несколько раз спокойно посидеть в фиксаторе, сначала открытом, потом закрытом;
- неприученные к фиксации животные могут начать сильно биться и могут повредить позвоночник, что приведет к частичному параличу;
- не держите животное в фиксаторе дольше, чем это необходимо для проведения экспериментальной манипуляции;

- никогда не оставляйте животное в фиксаторе без присмотра!

Проведение мануальной фиксации (рис. 30.):

- успокойте животное поглаживанием;
- поставьте животное на решетку;
- приподнимите животное за хвост левой рукой;
- правой рукой возьмите животное за холку, фиксируя этим голову и передние конечности (Рис. 30 а);
- продолжайте держать голову и хвост и поднимите животное (Рис. 30 б);
- перехватите хвост мизинцем правой руки и придайте животному нужное положение (Рис. 30 в)

а) фиксация головы **б)** фиксация головы и хвоста **в)** полностью зафиксированное животное

Рис. 30. Последовательность мануальной фиксации

8. ВВЕДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

В зависимости от цели эксперимента, путь введения веществ может быть разным (Рис. 31.).

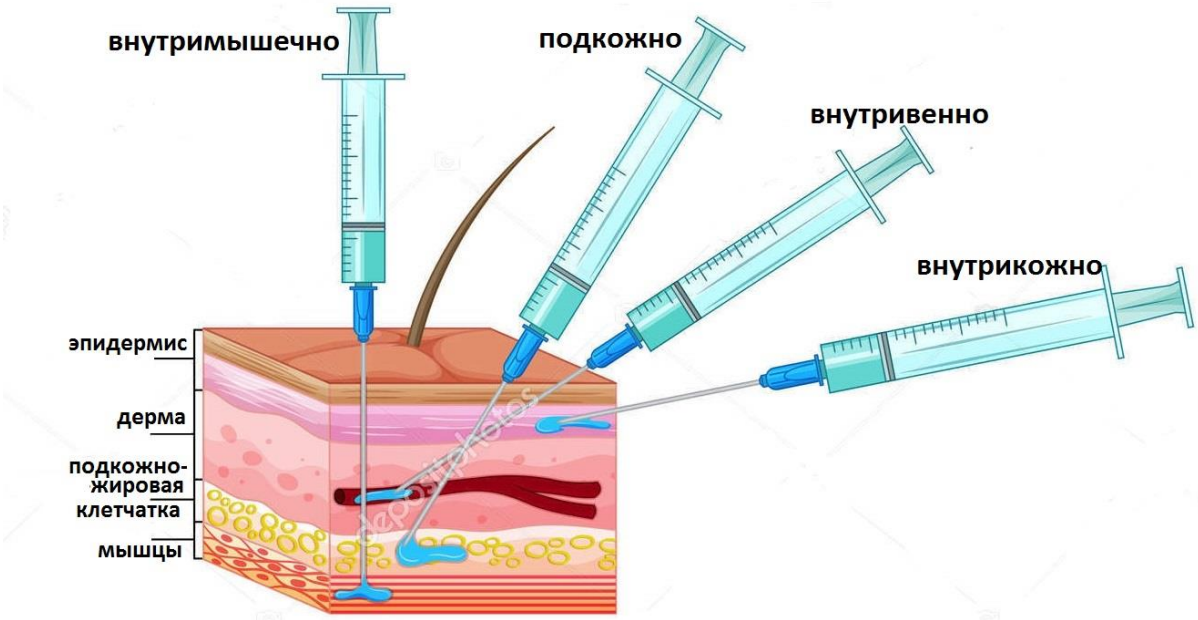


Рис. 31. Пути введения экспериментальных веществ

Инвазивный способ введения веществ:

- **внутрикожный** - требуется большой опыт, чтобы не ввести вещество подкожно;
- **подкожный** - при многократных подкожных введениях меняйте места инъекции;
- **внутривенный** - слишком быстрое введение вещества может стать причиной смерти;
- **внутримышечный** - ведение веществ, обладающих раздражающими свойствами, может вызывать серьезные проблемы, так как существует **возможность повреждения**:
  - нервов, фасциальных оболочек и

сосудов;

- тканей (могут быть скрыты) от введения больших объемов;

- **внутрибрюшинный** - введение веществ, обладающих раздражающими свойствами, может вызвать серьезные проблемы, достаточно просто повредить или ввести вещество в один из органов брюшной полости.

Не инвазивный способ введения веществ (пероральный):

- **с кормом/водой** - сложно рассчитать дозу;
- **в таблетках** - удобно только для приматов и собак;
- **зондом** - неправильное введение зонда может привести к осложнениям и смерти животного.

Факторы, которые важно учитывать при введение веществ:

- **Раздражающее действие/*pH***. Вещество может вызывать раздражение и/или изъязвление кожи и слизистых оболочек, или разрушать ткани локально. *pH* для введения должен быть максимально приближен к нейтральному (7,0). *Waynforth and Flecknell* (1992) рекомендуют диапазон *pH* 4,5-8,0. Толерантность к *pH* уменьшается для различных путей введения веществ в следующей последовательности:

  перорально > внутривенно > внутримышечно > подкожно

- **Растворимость**. Плохо растворимое вещество может образовывать в растворе большие частицы, выпадать в осадок.
- **Биодоступность**. Вещества не обладающие биодоступностью могут разрушать ткани. Требуется предварительная проверка *in vitro* на гемолитические или цитопатические эффекты.

- **Вязкость**. Для веществ, обладающих высокой вязкостью требуется больший размер иглы.
- **Стерильность.** Контаминированные вещества могут стать причиной инфицирования и раздражения места инъекции. Все вводимые животным вещества должны быть стерильными.
- **Температура.** Введение холодных растворов сразу после холодильника может вызвать дискомфорт и шок.
- **Качество иглы**. Следите, чтобы игла была острой. Меняйте иглы перед введением разным животным, чтобы избежать переноса инфекции.

Таблица 5.

Рекомендуемые размеры игл для введения:

Вид	внутрикожно	подкожно	внутримышечно	внутривенно	внутрибрюшинно
Мышь	27G	25G	27G	26-28G	25-27G
Крыса	27G	25G	25G	25-27G	23-25G

Техника инъекции:

- изучите анатомию животного: места прохождения нервов, сосудов при внутримышечных инъекциях;
- вводите иглу уверенно, но нежно и мягко давите на поршень;
- после внутривенного введения прижмите сосуд ваткой и дождитесь, пока кровь остановится.

!!!Введение больших объемов может быть не физиологичным!!!

Таблица 6.

Максимально допустимые объемы введения экспериментальных веществ лабораторным животным

способы введения веществ	**максимально допустимые объёмы введения веществ**
перорально	10 мл/кг

внутрикожно	0,05-0,1 мл/кг/точка
подкожно	2-5 мл/кг
внутримышечно	0,05 мл/кг/точка
внутривенно	5 мл/кг
внутрибрюшинно	10 мл/кг

Основные техники введения препаратов

Техника внутрикожного введения препарата (рис. 32):

Помощник берет животное в руку таким образом, чтобы была натянута кожа в области введения иглы.

Экспериментатор тоненькой иглой (*Таблица 5.*) вводит в кожу жидкость (Рис. 32) в допустимом объёме (*Таблица 6.*).

Правильно сделанная внутрикожная инъекция оставит на коже животного видимую папулу (рис. 33).

Рис. 32.
Введение препарата внутрикожно

Рис. 33.
Папула после ведения препарата

Техника подкожного введения препарата (Рис. 34.):

- место укола освободите от шерсти и продезинфицируйте;
- левой рукой соберите кожу в месте инъекции в складку;
- иглу введите в основание кожной складки под углом, введите жидкость в допустимом объёме (*Таблица 6.*).

Рис. 34.
Введение препарата подкожно

Техника внутримышечного введения препарата (Рис. 35.), чаще всего в мышцы бедра. Лучше вводить не более 0,5 мл жидкости, но не более допустимого (объём жидкости смотри в *Таблице 6.*).

Рис. 35.
Введение препарата внутримышечно

Техника внутривенного введения препарата (рис. 37), чаще всего инъецируют в вену хвоста:

- нагрейте хвост водой (54—55 °С), чтобы расширились сосуды (Рис. 36.) и продезинфицируйте хвост спиртом;
- пережмите одну из боковых вен у основания хвоста;

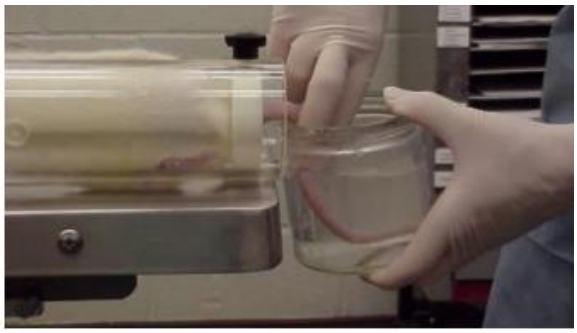


Рис. 36.
Нагрев хвоста перед внутривенным введением препарата

- введите иглу в хвостовую вену по возможности каудальнее;
- надавите на поршень и введите допустимый объём жидкости (*Таблица 6*.) в кровоток.

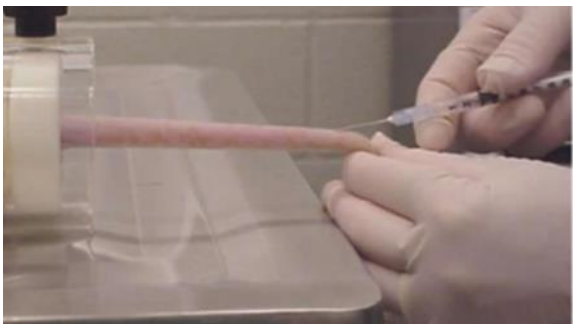


Рис. 37.
Внутривенное введение препарата

Техника внутрибрюшинного введения препарата (Рис. 38.):

- стенку живота (в нижней трети) соберите большим и указательным пальцами в складку;
- у основания складки сделайте прокол брюшной стенки;
- направьте иглу по ходу складки;

Рис. 38.
Внутрибрюшное введение препарата.

инъекцию можно проводить, держа иглу перпендикулярно брюшной стенке, но в таких случаях конец иглы должен быть сточен, чтобы не повредить внутренние органы. Допустимый объём жидкости смотри в *Таблице 6.).*

9. ВЗЯТИЕ КРОВИ У ЖИВОТНЫХ

Необходимо помнить, что объем циркулирующей крови у животных невелик и составляет:

- у крысы 50-70 мл/кг веса тела;
- у мыши 78-80 мл/кг веса тела;
- у ожиревших и старых животных объем циркулирующей крови может быть меньше на 15%;
-

Таблица 7.

Места прижизненного взятия крови

Вид животного	Ушная вена	Ампутация кончика хвоста*	Венозный синус глаза*	Копчиковая вена	Кардиальная пункция*
Мышь	+	+++	+	++	
Крыса		+		+++	+

*Анастезия/анальгезия обязательна

Примечание: отбор крови можно произвести посмертно, непосредственно после эвтаназии животного с помощью гильотины или специально предназначенных для этого ножниц (смотри раздел «Эвтаназия»).

Путем декапитации у мыши получают примерно 0,5—0,6 мл крови.

Для быстрого определения объема циркулирующей крови, который допустимо отбирать каждые 24 часа используют формулу: 0,01 * объем циркулирующей крови (мл/день) (~ 0,6мл/кг/день).

Восстановление полного кровяного состава происходит через две недели по формуле 1мл/кг/день, поэтому **при взятии крови у животного необходимо соблюдать определенные правила:**

- каждые 24 часа можно отбирать до 1% циркулирующей крови;
- каждые 3-4 недели можно отбирать до 10% объема циркулирующей крови;

- если большой объем крови отбирать слишком быстро без замещения, животное может испытать гиповолемический шок;
- если кровь отбирать слишком часто, у животного может развиться анемия.

Для получения большего объема крови:

- предварительно согрейте хвост разными способами:

приложите его к источнику тепла (Рис. 39.) или используйте воду, как при подготовке к внутривенному введению (Рис. 36.);

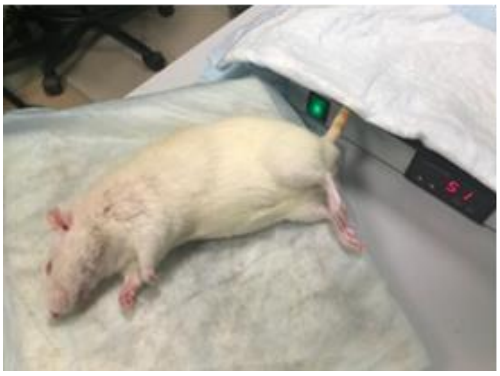


Рис. 39. Нагревание хвоста

- протрите спиртом хвост;
- аккуратно надрежьте кончик хвоста острыми ножницами (Рис. 40),
- если забор крови производите повторно, можно аккуратно удалить корку с ранки;

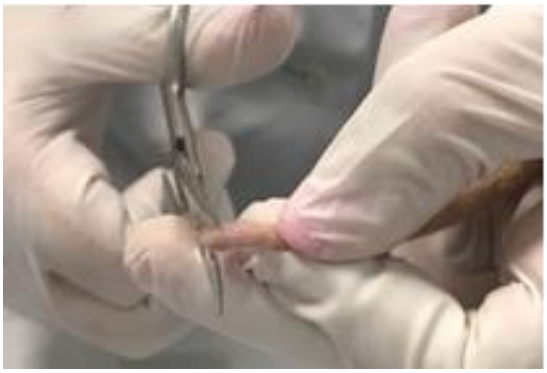


Рис. 40. Подготовка к забору крови, обрезание хвоста

- соберите кровь в пробирку (Рис. 41) по возможности быстро, но без механического воздействия,

так как качество образцов снижается при увеличении времени кровотечения или попытках «выдоить» из хвоста больше крови, получаемые пробы могут загрязняться тканевыми элементами.

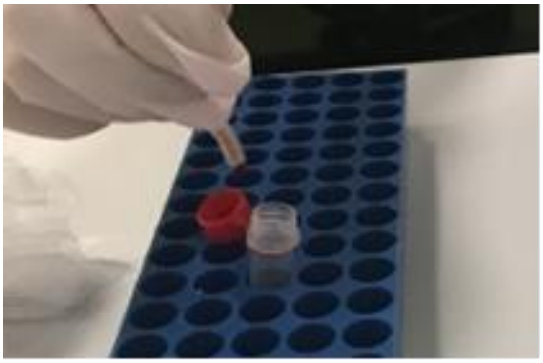


Рис. 41. Сбор крови в пробирку

10. АНАЛЬГЕЗИЯ/АНАСТЕЗИЯ/НАРКОЗ

Анестезия (от греч. *anaisthesia*, 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.

Наркоз – искусственно вызванное обратимое состояние торможения центральной нервной системы, при котором возникает:

- потеря сознания;
- миорелаксация;
- снижение или отключение некоторых рефлексов;
- анальгезия.

Стадии наркоза:

I — стадия анальгезии;

II — стадия возбуждения;

III — стадия хирургического наркоза:

1-й уровень (III) — поверхностный наркоз

2-й уровень (III) — лёгкий наркоз

3-й уровень (III) — глубокий наркоз

4-й уровень (III) — сверхглубокий наркоз

IV — пробуждение.

Пути наркоза:

- ингаляционный (сложно дозировать);
- инъекционный (легко дозировать, например золетил-100, хлоралгидрат);

- комбинированный (часто используется в ветеринарии, обычно комбинируется с миорелаксантами, что позволяет быстрее наркотизировать животное и меньшее количество вещества использовать).

Пример наркоза животных с использованием Золетила-100 в условиях нашей лаборатории:

- доза составляет 40мг/кг массы тела: средний вес мыши - 30грамм, препарата Золетил-100 требуется 1,2 мгк (12 мкл);
- в инсулиновый шприц набрать 24 мкл Золетила-100 + 4 мкл Медитина + 375 мкл воды для инъекций;
- одномоментно животным внутримышечно ввести 12 ед. раствора;
- один шприц использовать только для одного животного;
- животные заснут в среднем через 4-5 минут;
- при пробуждении ввести дополнительно 2,5 ед. раствора.

Признаки глубокого наркоза:

- полное обездвиживание;
- замедление дыхания;
- уменьшение частоты сердечных сокращений;
- снижение чувствительности к болевым раздражителям.

Фаза выхода из наркоза характеризуется:

- небольшими подергиваниями конечностей;
- реакцией глаз на внешние раздражители (палец, воздух);
- повышеный тонус мышц.

11. ПРИНЦИПЫ ХИРУРГИИ У ГРЫЗУНОВ

Основные термины хирургических вмешательств:

- **операция с выживанием** – хирургическая процедура, после которой подразумевается выход животного из наркоза;
- **операция без выживания** – хирургическая процедура, после которой или во время которой планируется эвтаназия животного до его вывода из наркоза;
- **большая операция** – процедура с проникновением в полости тела или со значительными нарушениями 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.

При операции должны соблюдаться основные правила хирургической техники:

- осторожное обращение с тканями;
- минимальное их повреждение и рассечение;
- использование необходимых инструментов;
- предотвращение кровопотери;
- использование соответствующих шовных материалов и правильное наложение швов.

Подготовка к любому виду операций включает в себя несколько этапов.

1 этап подготовки к операциям – инструменты и материалы:

- все инструменты и материалы, контактирующие с операционным полем, особенно для проведения операций с выживанием животного, обязательно простерилизуйте (проавтоклавируйте),;
- оборудование и материалы применяемые, но не контактирующие с операционным полем (хирургический столик, лампа) обработайте дезинфектантом;
- набор инструментов перед проведением операции обязательно простерилизуйте в автоклаве;
- при проведении серии операций заранее заготовьте (простерилизуйте) как минимум два набора инструментов;
- если нет возможности для каждого животного использовать индивидуальный (стерильный) набор инструментов, то перед проведением следующей операции, набор инструментов от первой операции обязательно погрузите в дезинфектант (в раскрытом виде, очищенные от крови и других органических загрязнений).

2 этап подготовки к операциям – животные:

- перед проведением полостных операций животным не давайте корм как минимум за 4 часа для мыши, за 6 часов для крысы, но не более, чем за 24 часа;
- для проведения малых операций не лишайте корма;
- не ограничивайте! доступ животных к воде перед операцией;
- в местах планируемых разрезов удалите шерсть сбриванием или при помощи специального крема (тщательно смойте крем, так как остатки крема могут привести к ожогам кожи!!!);
- при необходимости зафиксируйте животное на хирургическом столике, привязав петлевидными узлами за лапы;
- обработайте операционное поле (кожу) асептиком от центра к периферии;

- после обработки асептиком, изолируйте операционное поле стерильными салфетками;
- если операция будет длится более 30 минут, обеспечьте подогрев животного, т.к. анестезия может вызывать гипотермию.

Рекомендации по проведению операций:

- операцию начинайте, убедившись, что степень анестезии соответствует предполагаемому оперативному вмешательству;
- при проведении операции обязательно контролируйте состояние животного: наличие и частоту дыхательных движений, признаки гипотермии;
- для операционного доступа произведите минимальный, но достаточный для достижения цели операции разрез;
- в течение операции обязательно периодически орошайте операционное поле стерильным изотоническим раствором, чтобы избежать пересыхания тканей.

Правила наложения швов:

При полостных операциях, предполагающих жизнь животного в течение длительного времени после операции, необходимо наложить шов:

- на разрез мышечной ткани
  - ✓ наложите шов из абсорбируемого материала (предпочтительно);
  - ✓ разрез мышечной ткани зашейте непрерывным швом;
- разрез кожи зашейте прерывистым швом;
- после наложения швов обработайте рану антисептиком: спиртовым раствором бриллиантовой зелени, террамицином или алюминий – содержащим спреем.

Послеоперационный уход за животными:

- после завершения операции поместите животное в чистую отдельную клетку;
- после любой манипуляции, в том числе при взятии крови из хвоста, отсадите животное в отдельную клетку, чтобы избежать покусов;
- после проведения хирургического вмешательства поместите животное в теплое, изолированное чистое место до полного выхода его из наркоза;
- при необходимости перемещения животных исключите нанесение дополнительных травм, сдвигания повязок;
- при кровопотерях после операции введите внутрибрюшинно или подкожно 1-2 мл/100 г веса теплого (35-37^0 С) стерильного изотонического раствора;
- ежедневно и неоднократно следите за состоянием животного после операции, особое внимание уделить состоянию швов.

12. ЭВТАНАЗИЯ, ДОПУСТИМЫЕ МЕТОДЫ ЭВТАНАЗИИ

Под эвтаназией понимают гуманное умерщвление животного, причиняющее минимальное количество боли, страха и дистресса.

Причины эвтаназии:

- окончание эксперимента или появление побочных эффектов в ходе эксперимента;
- для отбора крови, органов и тканей для решения различных научных задач;
- животное нужно избавить от боли, дистресса и страдания.

Методы эвтаназии:

- ингаляция двуокисью углерода (CO2);
- анестезия и обескровливание;
- анестезия и обезглавливание;
- анестезия и смещение шейных позвонков;
- обезглавливание животного в сознании;
- цервикальная дислокация у животного в сознании;
- передозировка инъекционным наркозом;
- передозировка ингаляционным наркозом.

Подтверждение наступления смерти:

- прекращение сердцебиения и дыхания;
- отсутствие рефлексов;
- снижение температуры тела ниже 25 С.

Таблица 8.

Методы эвтаназии животных

Методы	мелкие птицы, грызуны, крысы массой <200 г, кролики[5]<2кг	крысы массой > 200 г, морские свинки	кролики весом > 2 кг	собаки, кошки, приматы	с/х животные (свиньи, жвачные и лошади)	амфибии, рептилии, рыбы
Двуокись углерода	A	A	AWJ[5]	A	A[2]длясвиней весом менее 32 кг UNA	A
Передозировки барбитуратов: в/в введение (100 мг/кг)	A	A	A	A	A	A
Передозировки барбитуратов: в/брюшинное введение (100 мг/кг)	A	A	A	AWJ[4]	A[3] для поросят AWJ[4] для взрослых особей	A
Анестезия и Обескровливание	A	A	A	A	A	A
Обезболивание и в/в введение KCl (1—2 мг-мэкв/кг)	A	A	A	A	A	A
Анестезия и Обезглавливание	A	A	A	UNA	UNA	A
Анестезия и смещение шейных позвонков	A	A	A	UNA	UNA	A
Обезглавливание животного в сознании	A[1]	A[1]	UNA	UNA	UNA	AWJ[1]
Цервикальная дислокация у животного в сознании	A[1]	UNA	A[1]	UNA	UNA	UNA

Сокращения:

A *— приемлемый метод эвтаназии.*

AWJ *— приемлемый метод в случае научного обоснования, рассмотренного и одобренного IACUC, т. к. другой метод не соответствует цели эксперимента.* ***UNA*** *— неприемлем.*

Преимущества обезглавливания крыс и мышей:

- самый быстрый, надежный и оптимальный метод эвтаназии;
- исключает негативное влияние фармацевтических препаратов на структуры органов и тканей, используются для забора тканей на исследование ультраструктурного уровня изменений при помощи электронной микроскопии;
- используется в сочетании с забором объема циркулирующей крови для дальнейшего исследования;
- не вызывает опасности для персонала, тогда как пары ингаляционного анестетика (эфир, изофлуран) могут быть опасны;
- используется для новорожденных животных и до 16 недель, учитывая их высокую устойчивость к гипоксии (ингаляционные препараты рекомендуется использовать только для введения в наркоз).

13. ПРИНЦИПЫ ЗАБОРА МАТЕРИАЛА ДЛЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Некропсия (аутопсия, патологоанатомическое исследование, секция, вскрытие) – это посмертная диагностическая процедура, включающая в себя исследование трупа, в том числе внутренних органов, направленная на выявление причин смерти или заболевания, приведшего к гибели. Эта процедура широко применяется в биологических и медицинских исследованиях.

В доклинических исследованиях лекарственных препаратов некропсия и последующее гистопатологическое изучение органов и тканей – основные методы изучения токсичности, без которых невозможна адекватная оценка результатов эксперимента.

Одним из ключевых моментов является правильная фиксация препарата. Процедура фиксации должна быть быстрой, чтобы максимально сохранить антигенные компоненты и морфологию ткани и не допустить лизиса клеток, приводящего к потере и диффузии антигенов.

Фиксация – это одна из ключевых стадий иммуногистохимического исследования.

Идеальным фиксатор:

- максимально сохраняет структуру объекта;
- обеспечивает химическую сохранность интересующего нас антигена;
- сохраняет объект как можно дольше;
- не влияет на дальнейшие этапы исследования;
- обеспечивает отсутствие аутофлюорисценции или, по крайней мере, не усиливает ее в интересующей нас области спектра (если необходимо использование флюорисцентных маркеров).

В настоящее время **не существует идеального фиксатора**. Исследователь должен четко представлять, что в конкретном случае представляет интерес и чем он готов пожертвовать.

Все фиксаторы можно условно разделить на несколько групп:

1. «**Крослинкеры**» (формалин, параформальдегид, глютаровый альдегид, пикриновая кислота) – обеспечивают фиксацию за счет ковалентного связывания молекул, обеспечивают хорошую и долгую структурную сохранность объекта. Недостаток – дают большую аутофлюорисценцию, создают фронт профиксированной ткани через который затруднен доступ к более глубоким слоям, образуют метиленовые мостики между аминогруппами белков. Формалин полностью разрушает часть антигенов, другие маскирует, проявление третьих может снизить в 2-3 раза.

2. **Коагуляторы** (спирты (метанол, этанол), хлороформ, ацетон) – фиксируют объект за счет удаления воды из клеток. Их преимущество - отсутствие аутофлюорисценции, за счет разрушения липидного компонента обеспечивают хороший доступ антител к антигену. Недостаток – они плохо сохраняют структуру объекта. Не подходят для фиксации срезов и других крупных объектов.

3. **Температурная фиксация** (замораживание и кипячение): **Заморозка** приводит к нарушению морфологической структуры, при неправильной заморозке или размораживании. **Кипячение** или нагрев в микроволновой печи, больше разрушает чем стабилизирует образец, используется, как дополнительный метод при работе с парафиновыми срезами.

Кроме фиксации методом погружения образца в фиксатор широко используются **перфузионные методы фиксации**.

В нашей лаборатории используют метод **кардиальной перфузии**.

Протокол кардиальной перфузии:

- **растворы** приготовьте заранее**:** 50 мл физиологического раствора, 50 мл формалина
- **наркоз** – после того, как все приготовили к проведению перфузии, введите животное в наркоз;
- **фиксация** – зафиксируйте животное в наркозе к операционному столу за конечности, используйте бинты или широкий лейкопластырь;
- **вскройте** брюшную полость по срединной линии живота снизу вверх до мечевидного отростка грудины при помощи острых ножниц;
- зафиксируйте грудину пинцетом;
- потяните грудину кверху, разрезая ребра с двух сторон;
- отодвиньте ребра с грудиной наверх, открывая доступ к грудной полости;
- **надрежьте диафрагму;**
- **надрежьте перикард;**
- **вскройте** ножницами правое предсердие (рис. 41);
- **подколитесь** к левому желудочку иглой, подсоединенной к системе (рис. 41):

1. сначала к флакону с физиологическим раствором (50 мл), используйте **критерий эффективности перфузии физраствором** - органы светлеют и увеличиваются в объеме, из правого предсердия сначала вытекает кровь, а затем прозрачный раствор;

2. затем переключитесь на флакон с 10% раствором формалина (50 мл), используйте **критерий эффективности перфузии формалином -** наблюдаются мышечные подергивания конечностей.

Жидкости из флаконов должны поступать под давлением, которое примерно соответствует нормальному кровяному давлению животного. Этого можно достичь, если, например, поднять флаконы, содержащие перфузирующие жидкости, на высоту около 150 см над животным (Рис. 42.) или использовать шприц большого объёма.

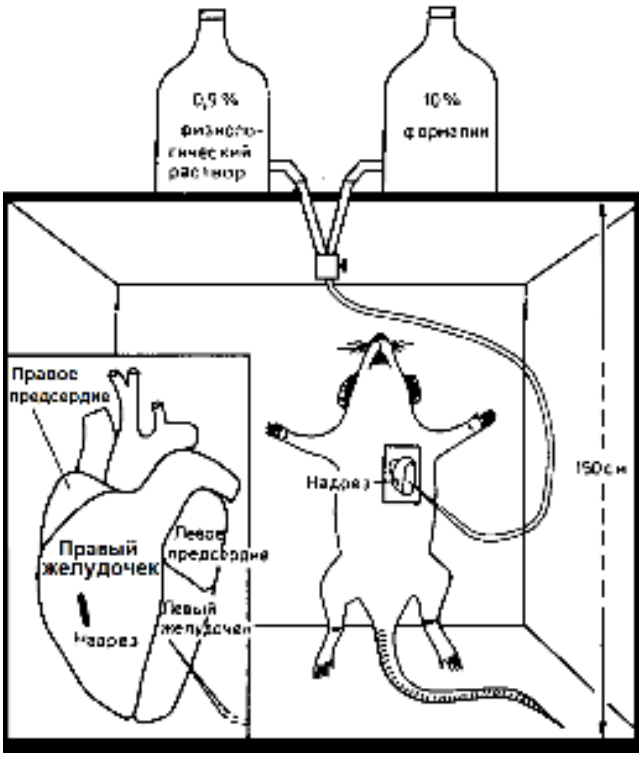


Рис. 42. Проведение перфузии

Основные правила проведения вскрытия:

- каждый этап вскрытия должен быть фото-задокументирован;
- все данные, получаемые по ходу вскрытия, обязательно регистрируйте в протоколе;
- перед вскрытием проведите осмотр животного (визуальный осмотр и пальпацию).
- определите массу тела, проведите забор крови и других образцов тканей для иных диагностических исследований;
- для иссечения тканей используйте только чистые и острые инструменты;
- для извлечения органов применяйте пинцет с плоскими браншами (анатомический);

- органы желудочно-кишечного тракта после извлечения промойте физиологическим раствором натрия хлорида для удаления содержимого;
- <u>извлеченные органы сразу!!! поместите в формалин или иную фиксирующую жидкость</u> (по протоколу эксперимента);
- <u>не допускайте высушивание органов на воздухе</u>!!!;
- <u>не допускайте контакт органов с проточной водой</u>, поскольку это может привести к разрушению клеток из-за разницы в осмотическом давлении.

Протокол вскрытия:

- положите труп животного на спину и зафиксируйте на препаровальном столике лейкопластырем или бинтами за лапы (Рис. 43.);
- анатомическим пинцетом захватите и приподнимите кожу с подлежащей подкожной клетчаткой в нижней части живота, надрежьте ее;

Рис. 43.
Правильно зафиксированный труп животного

- сделайте продольный разрез по белой линии живота от основания нижней челюсти до паха таким образом, чтобы брюшная стенка осталась неповрежденной (Рис. 44.);
- вскройте брюшную полость, сделав разрез мышечной стенки от паха вдоль средней линии, держа ножницы тупым концом вниз, приподняв пинцетом или зажимом участок брюшной стенки (внимательно следить за тем, чтобы не повредить внутренние органы) (Рис. 45.)
- вскройте грудную полость 2-мя разрезами косо вверх (слева и справа) по бокам от грудины (по окологрудинным линиям) (Рис. 46.) перерезая ребра и мягкие ткани;
- извлеките органокомплекс, для этого перережьте зафиксированные пинцетом трахею и пищевод в области шеи, затем аккуратно подтяните органокомплекс вверх (Рис. 47.), отсеките диафрагму от реберных краев и осторожно отделите брюшину вдоль позвоночника;
- комплекс малого таза отсеките как можно ниже;

Рис. 44.
Продольный разрез по белой линии живота

Рис. 45.
Вскрытие брюшной стенки

Рис. 46.
Вскрытие грудной клетки по окологрудинным линиям

- извлекая органы только грудной полости, перережьте комплекс в области диафрагмы;
- уложите органокомплекс на поднос для дальнейшего извлечения из него органов;
- извлеките из органокомплекса печень путем разреза удерживающих ее серозных связок: венечной, прикрепляющейся к диафрагме, почечно-печеночной, желудочно-печеночной и печеночно-двенадцатиперстной,

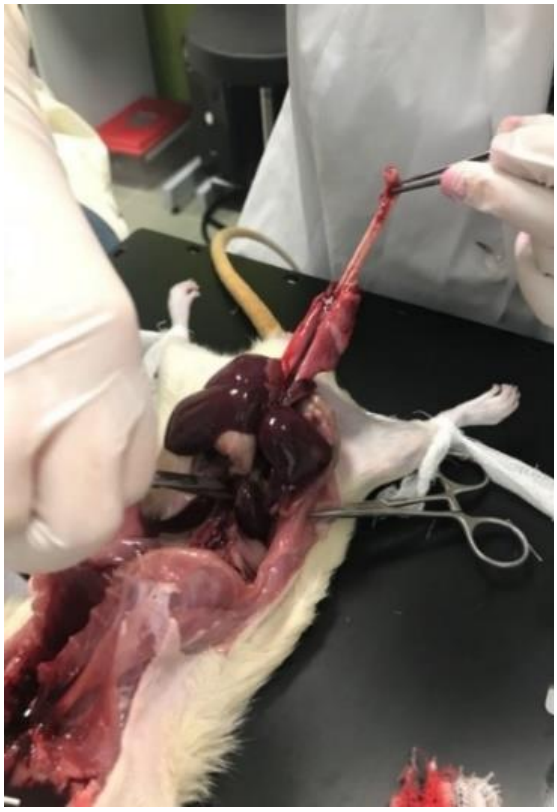


Рис. 47.
Извлечение органокомплекса

- если необходимо по условиям эксперимента, проведите вырезку отдельных фрагментов печени (Рис. 48.); извлеките сердце, почки (Рис. 49.)), селезенку (Рис. 50.), поджелудочную железу из органокомплекса, удерживая их пинцетом и перерезая удерживающие органы сосуды;

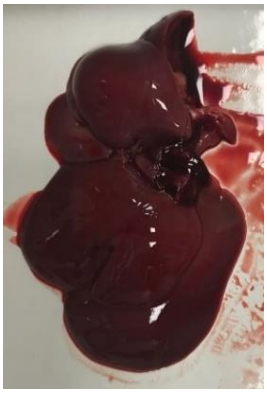


Рис. 48.
Выделенная печень

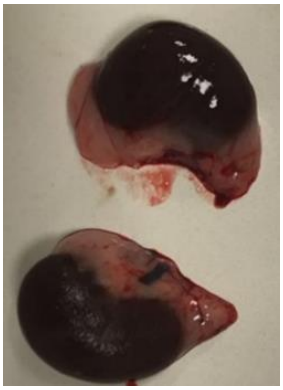


Рис. 49.

Выделенные почки

Рис. 50.
Извлечение селезёнки из органокомплекса

Извлечение головного мозга можно осуществлять двумя способами:

Способ 1 (Рис. 51.):

- при помощи ножниц с большими браншами отрежьте голову по линии между атлантом и черепом;
- отпрепарируйте кожу и фасции от верхней части черепной коробки (Рис. 51. а);
- сделайте продольные разрезы в черепе с обеих сторон по направлению от большого отверстия к ушным проходам (Рис. 51. б, в);
- пинцетом отломите части теменной и височной костей черепа (Рис. 51. г);
- начиная от зоны фронтальной части, подцепите и извлеките головной мозг (Рис. 51. д, е).

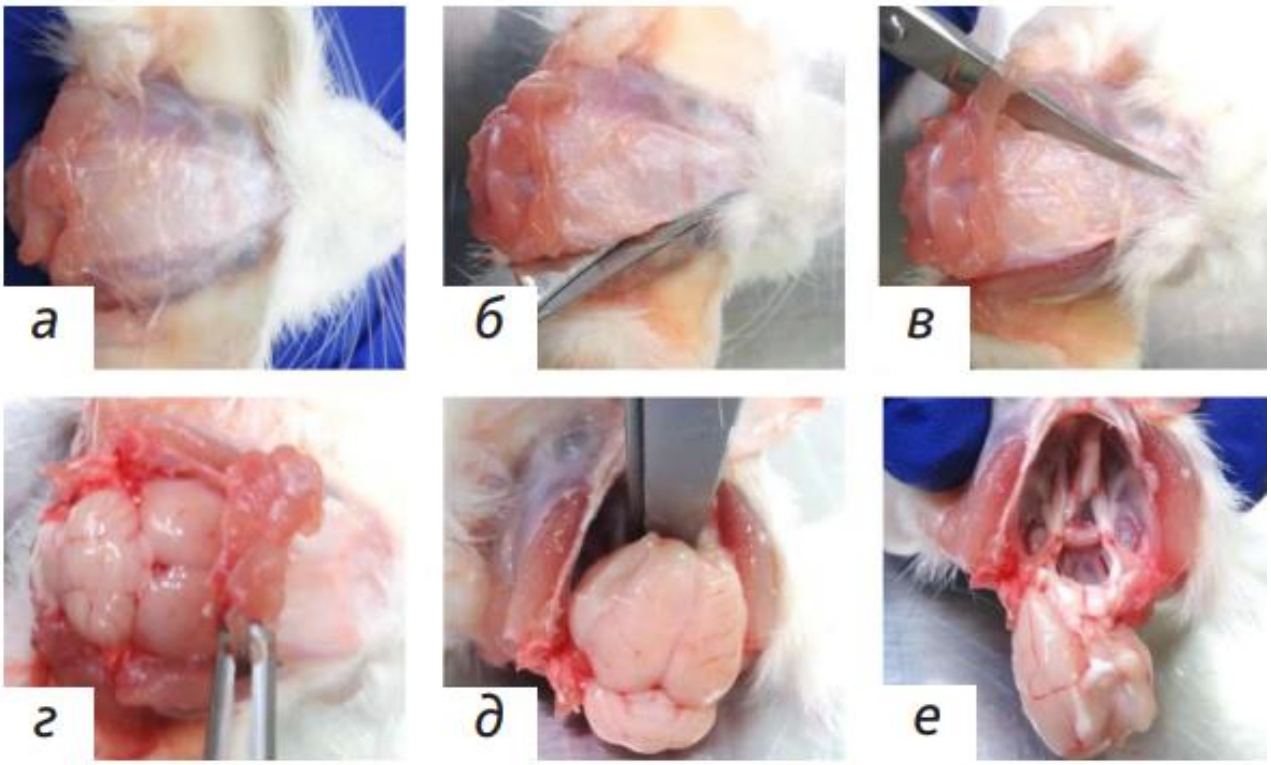


Рис. 51. Извлечение головного мозга, способ 1: а - удаление кожи; б, в – продольные разрезы в черепе с обеих сторон по направлению от большого отверстия к ушным проходам; г – вскрытие черепной коробки в области теменной и височной кости черепа; д, е – извлечение головного мозга из черепной коробки

Способ 2 применяется при необходимости извлечения обонятельных луковиц:

- отделите голову и снимите кожу с черепа;
- ножницами сделайте поперечный разрез на уровне носовой перегородки (Рис. 52. а);
- продолжайте разрезать затылочную и теменную кости (ножницы не должны слишком глубоко проникать в носовую полость) (Рис. 52. б, в);
- удалите череп, обнажив мозг и мозговые оболочки (Рис. 52. г);
- извлеките головной мозг с обонятельными луковицами (Рис. 52. д).

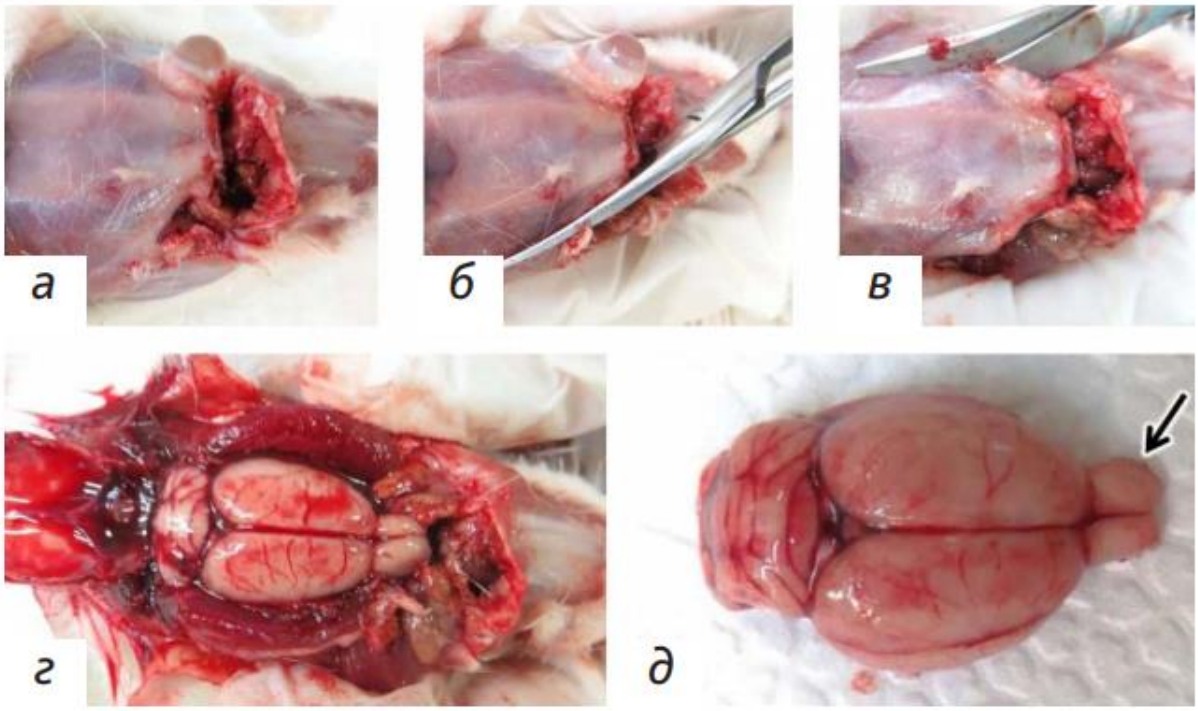


Рис. 52. Извлечение головного мозга, способ 2: а − поперечный разрез на уровне носовой перегородки; б, в − продольные разрезы затылочной и теменной кости; г − вскрытие черепной коробки в области теменной и височной кости черепа; д − извлеченный головной мозг с обонятельными луковицами (указаны стрелкой)

Извлечения спинного мозга:

- рассеките вдоль позвоночника мышцы спины;
- остроконечными ножницами пересеките с обеих сторон остистые отростки позвонков и ребра;
- максимально очистите позвоночный столб от мягких тканей;
- не извлекайте спинной мозг из спинномозгового канала;

- фиксацию спинного мозга проведите вместе с позвоночным столбом без извлечения мозга из спинномозгового канала.

Приложение 1.

Биологические характеристики мыши, зоотехнические параметры, параметры микроклимата, физиология и биохимия мыши

Биологические характеристики мыши:

Половая зрелость в возрасте	– 30-35 дней
Физиологическая зрелость	- 50-60 дней
Продолжительность охоты	- 20-25 часов
Продолжительность жизни	– 1-2 года (до 3 лет)
Продолжительность беременности	– 18-24 (21) дня
Плодовитость	– 4 -12 мышат в помете (в ср.6)
Продолжительность лактации	– 20-28 дней
Масса новорожденных мышат	- 1,0-1,9 г
Возраст прозревания мышат	- 14-16 дней
Возраст отсадки молодняка	- 21-30 дней (при достижении веса 8-10 г)
Масса тела взрослого животного	- 15 - 60 г (в зависимости от линии)

Зоотехнические параметры:

Площадь пола (см. прим.)	– 40 кв. см/гол / 60 - 100 кв. см/гол
Число мышей на одну клетку	– не более 15 голов
Расстояние между прутьями клетки	– 10 мм
Минимально необходимое количество подстилки в месяц на 1 животное	- 0,1 кг
Фронт кормления	- 1 см/гол
Фронт поения	– 1 ниппельная поилка на 10 голов

Нормы расхода полнорационного гранулированного корма:

взрослые подопытные животные и производственное поголовье	– 12 г/гол х сутки
молодняк до 14 г живой массы	– 5 г/гол. х сутки
молодняк свыше 14 г живой массы	– 8 г/гол. х сутки
Половое соотношение самки : самцы	
племенное ядро	- 1 : 1
производство	- 2 : 1

Параметры микроклимат:

Температура воздуха	– 22 град. С

Относительная влажность воздуха	– 40-60%
Нормы освещения	– 50 лк
Количество воздуха	– 0,25 куб. м./час/гол.
Скорость движения воздуха	– 0,2 м/с

Физиология и биохимия мышей:

Температура тела мыши	- 37-39 град. С
Частота дыхания	– 130-200/мин
Количество крови	- 62-78 мл/кг живой массы
Кровяное давление (систолическое)	- 82 – 105 мм. рт. ст.
Пульс	- 500-700 уд./мин. (310-840)
Количество выделяемого кала	- до 3 г/гол. х сутки
Удельная масса мочи	- 1,01-1,04
Реакция мочи	- нейтральная
Масса селезенки	- 0,38% от массы тела
Масса печени	- 2,26% от массы тела
Масса сердца	- 0,2% от массы тела
Масса мозга	- 0,54% от массы тела
Масса легких	- 0,54% от массы тела
Масса почек	- 0,54% от массы тела
Масса надпочечников	- 2 – 3 мг
Масса поджелудочной железы	- 0,3% от массы тела
Эритроциты, млн/мкл	- 8,0-10,5
Лейкоциты, тыс./мкл	- 5,1-11,6
Лимфоциты,%	- 63-75
Моноциты,%	- 0,7-2,6
Нейтрофилы,%	- 6,7-37,2
Эозинофилы,%	- 0,9-3,8%
Гемоглобин, г/дл	- 12-17
Гематокрит,%	- 42-46
Глюкоза,мг/дл	- 108-132
Креатинин, мг/дл	- 0,5
Билирубин, мг/дл	- 0,18-0,54
pH крови	- 7,3-7,4

Приложение 2.

Биологические характеристики крысы, зоотехнические параметры, параметры микроклимата, физиология и биохимия крыс

Биологические характеристики крысы:

Половая зрелость в возрасте	– 60-70 дней
Физиологическая зрелость	- 80-90 дней
Продолжительность охоты	- 20-27 часов
Продолжительность жизни	– 2-3 года
Продолжительность беременности	– 16-23 (18) дня
Плодовитость	– 5 -9 крысят в помете (8 – 14)
Продолжительность лактации	– 28-35 дней
Масса новорожденных крысят	- 3-6 г
Возраст прозревания крысят	- 14-17 дней
Возраст отсадки молодняка	- 21-35 дней
Половое соотношение, самки : самцы	
племенное ядро	- 1 : 1
производство	- 2 : 1
Масса тела взрослого животного	- 200 – 400 г

Зоотехнические параметры:

Площадь пола (см. прим.)	– 150 кв. см/гол / 200- 600 кв. см
Число крыс на одну клетку	– не более 10 голов
Расстояние между прутьями клетки	– не более 15 мм
Фронт кормления	- 2 см/гол
Фронт поения на 10 голов	– 1 см или 2 ниппельные поилки
Минимально необходимое количество подстилки в месяц на 1 животное	- 0,31 кг

Нормы расхода полнорационного гранулированного корма:

взрослые подопытные животные и производственное поголовье	– 50 г/гол х сутки
молодняк 40-130 г живой массы	– 15 г/гол. х сутки
молодняк 130-240 г живой массы	– 20 г/гол. х сутки
молодняк 240-350 г живой массы	- 25 г/гол х сутки

Параметры микроклимата:

Температура воздуха	– 20-22 град. С
Относительная влажность воздуха	– 50-60%
Нормы освещения	– 50 лк
Количество воздуха	– 1,40 куб. м./час/гол.

Скорость движения воздуха	– 0,2 м/с

Физиология и биохимия крыс:

Температура тела	- 38,5-39,5 град. С (37 – 38)
Частота дыхания	– (85-)110 – 180/мин
Количество крови	- 76-90 мл/кг живой массы
Кровяное давление (систолическое)	- 100 – 130 мм. рт. ст.
Пульс	- (300) 400-450 уд./мин.
Количество выделяемого кала	- до 30 г/гол. х сутки
Количество выделяемой мочи	- 2-2- мл/гол. х сутки
Удельная масса мочи	- 1,02-1,04
Реакция мочи	- нейтральная
Масса селезенки	-
Масса печени	
Масса мозга	- 0,87% от массы тела
Масса сердца	- 0,34% от массы тела
Масса легких	- 0,45% от массы тела
Масса почек	- 0,23% от массы тела
Масса надпочечников	- 13 – 38 мг
Масса щитовидной железы	- 23-28 мг (вес крысы 200 г)
Масса семенников	- 2,5 г (в ср.)
Масса поджелудочной железы	- 0,16% от массы тела
Эритроциты, млн/мкл	- 7,2-9,6
Лейкоциты, тыс./мкл	- 8-14
Лимфоциты,%	- 65-77
Моноциты,%	- 0,1-4
Нейтрофилы,%	- 13-30
Эозинофилы,%	- 0,1-1
Гемоглобин, г/дл	- 12-17
Гематокрит,%	- 40-50
Глюкоза,мг/дл	- 50-115
Креатинин, мг/дл	- 0,43
Билирубин, мг/дл	- 0,42

14. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Госманов Р.Г., Галиуллин А.К., Нургалиев Ф.М. Лабораторные животные для микробиологических исследований. // Учебное пособие: ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, 2017. - С.67

2. Каркищенко Н.Н., Грачев С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях – М.: Профиль-2С, 2010. – 15-22 с.

3. Коробейникова Е.П., Комарова Е.Ф. Лабораторные животные - биомодели и тест-системы в фундаментальных и доклинических экспериментах в соответствии со стандартами надлежащей лабораторной практики (нлп/glp) Журнал фундаментальной медицины и биологии УДК 591.2.001.5(083.74)

4. Мужикян А.А., Макарова М.Н., Гущин Я.А. Особенности патологоанатомического исследования группы экспериментальных животных. СПб: Международный вестник ветеринарии. 2014; 1: 75-80.

5. Об утверждении Правил лабораторной практики: приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 № 708н // Рос. газ. - 2010.

6. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами ГОСТ 33216-2014

7. Руководство по работе с лабораторными животными для сотрудников ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, занятых проведением доклинических испытаний

8. Рыбакова А.В., Макарова М.Н. Методы эвтаназии лабораторных животных в соответствии с Европейской директивой 2010/63. Международный вестник ветеринарии. 2015; 2: 96-107.

9. Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев): постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29 августа 2014 г. N 51 // Рос. газ. - 2015.- 6 февр. -N 24/1 (специальный выпуск).

10. Линева А. Физиологические показатели нормы животных. Справочник. М.: Аквариум ЛТД, К.: ФГУИППВ, 2003. - 256 с.

11. Fiette L1, Slaoui M. Necropsy and Sampling Procedures in Rodents // Drug Safety Evaluation: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. 2011. Vol. 691: 39–56. doi :10.1007/978-1-60761-849-2_3

12. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy press. - Washington, D.C. 1996. - 137 p.

13. McInnes E. (Ed.). Pathology for Toxicologists: Principles and Practices of Laboratory Animal Pathology for Study Personnel. Chichester: John Wiley & Sons. 2017: 25–6.

14. Parkinson C. et al. Diagnostic necropsy and selected tissue and sample collection in rats and mice. Journal of Visualized Experiment. 2011, 54: 2–7. doi: 10.3791/2966

15. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 1 // Experimental and Toxicologic Pathology. 2003. Vol. 55: 91–106. doi: 16.1078/0940-2993-00311

17. Scudamore C. L. (Ed.). A Practical Guide to the Histology of the Mouse. Chichester: John Wiley & Sons. 2014: 17–20.

18. Suckow M.A., Stevens K.A., Wilson R.P. (Eds.). The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents. London: Academic Press; Elsevier. 2012: 135–6.

ИНТЕРНЕТ - ресурсы

1. Анатомо-физиологические особенности мышей http://handcent.ru/laboratornye-zhivotnye/434-anatomo-fiziologicheskie-osobennosti-myshey-chast-1.html

2. КиберЛенинка: https://cyberleninka.ru/article/n/laboratornye-zhivotnye-biomodeli-i-test-sistemy-v-fundamentalnyh-i-doklinicheskih-eksperimentah-v-sootvetstvii-so-standartami

3. Коптяева К.Е., Мужикян А.А., Гущин Я.А., Беляева Е.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Методика вскрытия и извлечения органов лабораторных животных (крысы). Лабораторные животные для научных исследований; Номер журнала: 2, 2018, DOI: https://doi.org/10.29296/2618723X-2018-02-08

4. Методы эвтаназии животных, рекомендованные IACUC Research Animal Resources: Euthanasia Guidelines http://www.animallaw.com/Model-Law-Humane-Euthanasia.cfm