

# Референтные интервалы массовых коэффициентов внутренних органов морских свинок

**А.Ю. Бородина**

АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Россия

E-mail: [borodina.ay@doclinika.ru](mailto:borodina.ay@doclinika.ru)

**Резюме.** При проведении токсикологических исследований для определения органов-мишеней одними из контролируемых показателей являются массовые коэффициенты органов и абсолютные массы органов лабораторных животных. Цель данной работы — определение референтных интервалов массовых коэффициентов органов относительно массы тела и массы головного мозга, а также абсолютных масс органов у морских свинок. Для расчета референтных интервалов использовался непрямой метод получения референтных значений, в анализ были включены данные 40 самцов и 61 самки аутбредных морских свинок, полученные при мониторинге здоровья животных в период с 2021 по 2023 г. Начальным этапом получения референтных интервалов является определение статистических выбросов и их исключение по каждому оцениваемому параметру отдельно.

Установлены референтные интервалы с учетом рекомендаций Института клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute) для массовых коэффициентов и абсолютных значений сердца, легких, тимуса, печени, селезенки, почек, надпочечников, головного мозга, семенников и яичников. Ввиду небольшого количества референтных значений (менее 120) использовался робастный метод расчета референтных интервалов с указанием доверительных интервалов. Для повышения прогностической значимости полученных референтных интервалов необходимо увеличение размера анализируемой выборки референтных значений (более 120). С позиции биоэтических норм для достижения данной цели необходимо использовать ретроспективный подход получения дополнительных референтных значений.

**Ключевые слова:** доклинические исследования, робастный метод, референтные интервалы, морские свинки, масса органов

**Благодарности.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.

**Для цитирования:** Бородина А.Ю. Референтные интервалы массовых коэффициентов внутренних органов морских свинок. Лабораторные животные для научных исследований. 2023; 3. 68–73. <https://doi.org/10.57034/2618723X-2023-03-04>.

Original article

## Reference intervals of mass coefficients of internal organs of guinea pigs

**A.Yu. Borodina**

Research and manufacturing company “Home of Pharmacy”, Leningrad oblast, Russia

\* E-mail: [borodina.ay@doclinika.ru](mailto:borodina.ay@doclinika.ru)

**Abstract.** In toxicological studies for the detection of target organs, organ mass coefficients and absolute organ weights of laboratory animals are one of the monitored parameters. The aim of this study is to determine reference intervals of organ mass coefficients in relation to body weight and brain weight, and absolute organ weights in guinea pigs. The indirect method of obtaining reference values was used to determine reference intervals, and data from 40 male and 61 female outbred guinea pigs obtained during animal health monitoring from 2021 to 2023 were included in the analysis. The initial step in obtaining reference intervals is to determine the presence of statistical outliers and their exclusion, for each parameter evaluated separately. Reference intervals were established based on Clinical and Laboratory Standards Institute recommendations for mass coefficient and absolute values of heart, lung, thymus, liver, spleen, kidney, adrenal glands,

© Бородина А.Ю., 2023

brain, testes, and ovaries. Due to the small number of reference values (less than 120), a robust method of calculating reference intervals with confidence intervals was used. To improve the prognostic significance of the obtained reference intervals, it is necessary to increase the size of the analysed sample of reference values (more than 120). From the perspective of bioethical norms, a retrospective approach to obtaining additional reference values should be used to achieve this goal.

**Keywords:** preclinical studies, robust method, reference interval, guinea pigs, organs weight

**Acknowledgements.** The study was performed without external funding.

**For citation:** Borodina A.Yu. Reference intervals of mass coefficients of internal organs of guinea pigs. *Laboratory Animals for Science*. 2023; 3. 68–73. <https://doi.org/10.57034/2618723X-2023-03-04>.

## Введение

Морские свинки являются одной из часто используемых моделей в доклинических исследованиях лекарственных средств. Например, из-за высокой восприимчивости морских свинок к *M. tuberculosis* и схожести наблюдаемых гранулем с таковыми у человека они в течение многих лет используются для исследования противотуберкулезных вакцин и лекарственных препаратов [1]. Кроме того, морские свинки являются распространенной тест-системой в исследованиях респираторных заболеваний, в частности используются для изучения нарушений функции легких и таких патологий, как астма и гиперреактивность дыхательных путей [2, 3]. В исследованиях безопасности для выявления местных и системных иммунных реакций гиперчувствительности разработаны протоколы с использованием морских свинок [3], это исследования токсичности повторных доз в соответствии с руководствами OECD 410<sup>1</sup> и OECD 411<sup>2</sup>, оценка фотобезопасности согласно руководству ICH S10<sup>3</sup>, сенсibiliзирующего потенциала в тестах максимизации Магнуссона и Клигмана и тесте Бюхлера<sup>4</sup> [4].

При проведении токсикологических исследований для определения органов-мишеней одними из контролируемых показателей являются массовые коэффициенты органов, которые, как и абсолютные массы органов, могут дать информацию о наличии атрофических или гипертрофических изменений органов, а также быть критерием «за» или «против» в дополнение к другим определяемым параметрам. При сравнении результатов с контрольной группой выявленные отличия не всегда могут иметь клиническую значимость, в связи с чем возникает необходимость устанавливать собственные внутривлабораторные референтные интервалы для возможности вынести объективное суждение о действии ксенобиотиков.

Цель данной работы — определение референтных интервалов массовых коэффициентов органов и их абсолютных значений у морских свинок.

## Материал и методы

Для получения референтных интервалов использовали данные, полученные при мониторинге здоровья животных, используемых в биомедицинских исследованиях в период с 2021 по 2023 г. в АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ». Мониторинг здоровья животных проводился на основании рекомендации Федерации европейских ассоциаций в области науки о лабораторных животных (FELASA)<sup>5</sup>.

В анализируемом массиве представлены данные, полученные от 101 аутбредной морской свинки (40 самцов и 61 самка), масса тела самцов 435–1704 г и возраст от 4 нед, масса тела самок 418–1060 г и возраст от 8 нед. Самки использовались небеременные и нерожавшие. Животные находились в стандартных условиях в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных и Директивой 2010/63/EU<sup>6</sup>. Морские свинки содержались по две головы в стандартных пластиковых клетках со стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением. Температура воздуха в помещении 15–26 °С и относительная влажность воздуха 45–65%, световой режим 12 ч света и 12 ч темноты. Морские свинки получали полнорационный комбикорм, в качестве докорма использовали травяную муку и морковь, воду *ad libitum*. Эвтаназию животных осуществляли с помощью диоксида углерода (CO<sub>2</sub>) с последующим обескровливанием полостей сердца или извлечением жизненно важных органов.

Регистрацию массы тела животных проводили непосредственно перед некропсией. Органы, извлеченные при некропсии, взвешивались, парные органы взвешивались вместе.

<sup>1</sup> OECD T. N. 410. Guideline for testing of chemicals. Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28-day Study N. 410. 1981.

<sup>2</sup> OECD T. N. 411. Guideline for testing of chemicals. Subchronic Dermal Toxicity: 90-day Study. N. 411. 1981.

<sup>3</sup> ICH S10. Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals. Guidance for Industry. 2015.

<sup>4</sup> OECD T. N. 406. Guideline for testing of chemicals. Skin Sensitisation. N. 406. 2022.

<sup>5</sup> FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. 2014.

<sup>6</sup> Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Санкт-Петербург, 2012.

**Таблица 1.**  
Доля статистических выбросов при расчете МКО морских свинок относительно массы тела

Орган	Общее количество выбросов, %	
	Самцы (n=40)	Самки (n=61)
Сердце	0	0
Легкие с трахеей	0	3,3
Тимус	5,0	11,5
Печень	2,5	1,6
Селезенка	2,5	3,3
Почки	17,5	8,2
Надпочечники	0	0
Головной мозг	12,5	1,6
Семенники	12,5	—
Яичники	—	13,1

**Таблица 2.**  
Доля статистических выбросов при расчете МКО морских свинок относительно головного мозга

Орган	Общее количество выбросов, %	
	Самцы (n=40)	Самки (n=61)
Сердце	5,0	0
Легкие с трахеей	2,5	0,0
Тимус	5,0	11,5
Печень	0	0,0
Селезенка	0	3,3
Почки	0	0
Надпочечники	0	0
Семенники	15,0	—
Яичники	—	13,1

**Таблица 3.**  
Доля статистических выбросов при анализе абсолютных масс органов морских свинок

Орган	Общее количество выбросов, %	
	Самцы (n=40)	Самки (n=61)
Сердце	5,0	0
Легкие с трахеей	0	1,6
Тимус	5,0	13,1
Печень	0	0
Селезенка	0	1,6
Почки	0	0
Надпочечники	0	0
Головной мозг	0	0
Семенники	2,5	—
Яичники	—	13,1

Массовые коэффициенты органов (МКО, %) были рассчитаны относительно массы тела и головного мозга по формулам:

$$МКО = M_o / M_t \times 100\%, \quad (1)$$

где  $M_o$  — масса органа, г;  $M_t$  — масса тела животного, г.

$$МКО = M_o / M_{гм} \times 100\%, \quad (2)$$

где  $M_{гм}$  — масса головного мозга животного, г.

Статистический анализ выполняли с помощью лицензированного программного обеспечения Microsoft Excel и бесплатного программного обеспечения Reference Value Advisor v2.1 (National Veterinary School, Toulouse, France) [5].

## Результаты и обсуждение

Существует два метода определения референтных интервалов (РИ), основанных на способе получения данных референтных значений (РЗ): в одном используют данные, полученные целенаправленным рекрутингом референтных индивидуумов, — прямой метод, во втором применяют массив данных, уже накопленный в организации, — непрямой метод [6]. В данном случае использовался непрямой метод определения РИ, разработанный Институтом клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) [7]. РИ рассчитывали для таких РЗ, как МКО относительно массы тела, МКО относительно массы головного мозга и абсолютных масс органов. Эти показатели выбраны для определения РИ, так как, например, при проведении токсикологических исследований может быть недостаточно информации только по МКО относительно массы тела, например, может произойти резкое изменение массы тела, связанное с лишением корма перед отбором крови, эвтаназией, что приводит к недостоверному изменению МКО относительно массы тела. В этом случае может помочь расчет и анализ данных МКО относительно головного мозга, так как масса головного мозга является своеобразной константой, которая не подвержена колебаниям, связанным с изменением массы тела. Кроме того, наглядным показателем изменений могут служить абсолютные массы органов.

Начальным этапом получения РИ служат определение наличия и исключение РЗ, значительно отличающихся от основного массива данных (статистические выбросы). Выбросы определяли по каждому показателю отдельно и для каждого пола по методу, созданному Тьюки и доработанному Хорном [7]. Для этого в Microsoft Excel рассчитывали значения нижнего Q1 и верхнего Q3 квартилей, а также межквартильный интервал  $IQR = Q3 - Q1$ . Затем вручную исключали значения, лежащие

**Таблица 4.**  
Референтные интервалы по МКО морских свинок, рассчитанные как отношение массы органа к массе тела

Орган	Референтный интервал (90% доверительные интервалы)					
	n	Самцы		n	Самки	
		Нижняя граница	Верхняя граница		Нижняя граница	Верхняя граница
Сердце	40	0,203 (0,160–0,255)	0,682 (0,631–0,735)	61	0,247 (0,216–0,287)	0,689 (0,648–0,728)
Легкие с трахеей	40	0,395 (0,283–0,504)	1,435 (1,278–1,567)	59	0,506 (0,430–0,580)	1,422 (1,323–1,525)
Тимус	38	0,023* (0,018–0,029)	0,387* (0,250–0,549)	54	0,018* (0,011–0,027)	0,296* (0,218–0,396)
Печень	39	2,305 (2,064–2,577)	4,469 (4,214–4,716)	60	2,497 (2,271–2,801)	5,361 (5,053–5,674)
Селезенка	39	0,076 (0,066–0,089)	0,179 (0,168–0,190)	59	0,079 (0,063–0,094)	0,256 (0,237–0,269)
Почки	33	0,608 (0,580–0,643)	0,880 (0,844–0,911)	56	0,517 (0,485–0,556)	0,954 (0,907–0,996)
Надпочечники	40	0,038 (0,028–0,048)	0,121 (0,111–0,128)	61	0,028 (0,021–0,035)	0,105 (0,097–0,113)
Головной мозг	35	0,259 (0,214–0,300)	0,567 (0,519–0,614)	60	0,279 (0,236–0,315)	0,712 (0,665–0,752)
Семенники	35	0,344 (0,305–0,385)	0,638 (0,600–0,675)	—	—	—
Яичники	—	—	—	53	0,140* (0,127–0,161)	0,484* (0,437–0,519)

Примечание. Здесь и в табл. 5, 6: n — количество животных после исключения выбросов из выборки; \* — референтные интервалы рассчитаны робастным методом после преобразования Бокса–Кокса.

за нижней границей  $Q1-1,5IQR$  и превышающие верхнюю границу  $Q3+1,5IQR$  (табл. 1–3).

При анализе выбросов выявлено наибольшее количество выпадающих значений в данных МКО относительно массы тела. Меньшее количество выпадающих значений определено при анализе абсолютных масс органов. У самцов и самок чаще встречаются выбросы по показателю «тимус», а также «семенники» и «яичники». После выявления и устранения статистических выбросов оставшиеся РЗ использовали для определения РИ.

Расчет пределов РИ проводили с помощью робастного метода, в котором применяется специальный робастный алгоритм, присваивающий РЗ различный вес в зависимости от удаленности РЗ от медианы. Робастный метод применяется в тех случаях, когда доступно небольшое количество РЗ — от 20 до 120 [7]. При наличии менее 20 РЗ определение РИ не рекомендуется [8]. Робастный метод помогает обеспечить релевантные РИ при наличии небольшого числа выборок [9].

Для расчета РИ с помощью робастного метода был использован набор макросов для Microsoft Excel — Reference Value Advisor v2.1 (National Veterinary School, Toulouse, France) [5], которые вычисляют РИ на основе

данных, содержащихся в электронной таблице. Программное обеспечение полностью соответствует руководству CLSI [7].

Reference Value Advisor использует тест Андерсона–Дарлинга для проверки на соответствие закону нормального распределения, поскольку тест в основном ищет отклонения от нормальности в хвостах распределения, которые имеют первостепенное значение для определения РИ. Если распределение не являлось Гауссовым, то было использовано преобразование Бокса–Кокса.

Программа также позволяет рассчитать 90% доверительные интервалы (ДИ), которые представлены в табл. 4–6 вместе с РИ. ДИ референтных интервалов должны быть указаны независимо от размера выборки, используемой для расчета. ДИ дают полезную информацию о точности вычисленного РИ [5, 6, 8].

## Заключение

Рассчитанные референтные интервалы необходимо использовать как дополнительный критерий в ходе комплексного подхода к принятию решения о наличии/отсутствии токсического действия исследуемого агента в совокупности с данными о состоянии животных (клинические

**Таблица 5.**  
Референтные интервалы по МКО морских свинок, рассчитанные как отношение массы органа к массе головного мозга

Орган	Референтный интервал (90% доверительные интервалы)					
	n	Самцы		n	Самки	
		Нижняя граница	Верхняя граница		Нижняя граница	Верхняя граница
Сердце	38	39,7 (29,0–53,4)	142,7 (127,5–156,5)	61	43,1 (35,9–52,0)	144,4 (134,8–154,0)
Легкие с трахеей	39	120,2 (98,2–141,7)	295,5 (274,6–312,7)	61	110,8 (95,6–127,0)	289,2 (271,8–306,4)
Тимус	38	3,4* (2,9–4,3)	101,2* (63,5–143,8)	54	3,9* (3,0–5,4)	53,9* (44,5–63,4)
Печень	40	436,6 (367,4–514,5)	1060,8 (991,5–1126,1)	61	403,6 (339,0–480,6)	1200,1 (1115,6–1268,3)
Селезенка	40	13,7 (10,8–17,0)	44,8 (41,5–48,4)	59	11,7 (8,3–15,0)	54,5 (48,5–59,0)
Почки	40	93,5 (77,8–111,7)	232,7 (220,8–246,2)	61	88,3 (77,0–98,5)	213,7 (202,9–223,9)
Надпочечники	40	4,9 (2,3–7,8)	31,7 (28,8–34,3)	61	3,2 (0,9–4,7)	24,3 (22,2–26,5)
Семенники	36	71,0 (62,4–81,8)	150,1 (140,2–159,3)	–	–	–
Яичники	–	–	–	53	1,7* (1,5–2,0)	10,4* (8,4–12,8)

**Таблица 6.**  
Референтные интервалы по абсолютным массам органов морских свинок

Орган	Референтный интервал (90% доверительные интервалы)					
	n	Самцы		n	Самки	
		Нижняя граница	Верхняя граница		Нижняя граница	Верхняя граница
Сердце	38	1,79 (1,36–2,22)	5,70 (5,20–6,27)	61	1,88 (1,65–2,18)	5,35 (5,03–5,69)
Легкие с трахеей	40	4,82 (4,12–5,52)	11,78 (10,89–12,50)	60	4,42 (3,71–4,94)	10,88 (10,23–11,49)
Тимус	38	0,15* (0,13–0,19)	4,44* (2,66–6,34)	53	0,15* (0,12–0,21)	1,90* (1,57–2,26)
Печень	40	18,66 (16,34–21,16)	42,53 (39,58–44,91)	61	18,46 (16,21–20,82)	43,68 (40,99–45,82)
Селезенка	40	0,57 (0,46–0,71)	1,82 (1,67–1,95)	60	0,53 (0,38–0,65)	2,05 (1,86–2,21)
Почки	40	4,18 (3,66–4,73)	9,29 (8,73–9,73)	61	3,82 (3,36–4,13)	7,87 (7,54–8,25)
Надпочечники	40	0,23 (0,13–0,35)	1,25 (1,14–1,35)	61	0,25* (0,22–0,28)	0,98* (0,87–1,07)
Головной мозг	40	3,49 (3,34–3,63)	4,74 (4,59–4,87)	61	3,09 (2,91–3,29)	4,80 (4,65–4,93)
Семенники	39	3,14 (2,83–3,45)	5,87 (5,59–6,19)	–	–	–
Яичники	–	–	–	53	0,06* (0,05–0,07)	0,36* (0,29–0,43)

признаки интоксикации), патологоанатомических и клинико-лабораторных исследований. Для повышения прогностической значимости полученных референтных интервалов — расчет более точных (узких) значений — необходимо увеличение размера анализируемой выборки референтных значений. С этической точки зрения для достижения данной цели целесообразно использовать ретроспективный подход получения дополнительных референтных значений.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Lin P.L., Flynn J.A.L. Tuberculosis research using non-human primates // *Nonhuman primates in biomedical research*. Academic Press, 2012. P. 173–196. DOI: 10.1016/B978-0-12-381366-4.00003-1.
2. Hargaden M., Singer L. Anatomy, physiology, and behavior // *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. Academic Press, 2012. P. 575–602. DOI: 10.1016/B978-0-12-380920-9.00020-1.
3. Huneke R.B. Basic experimental methods // *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. Academic Press, 2012. P. 621–635. DOI: 10.1016/B978-0-12-380920-9.00022-5.
4. Каргопольцева Д.Р., Крышень К.Л., Кательникова А.Е. и др. Опыт применения теста максимизации Магнуссона и Клигмана на морских свинках при оценке сенсibiliзирующего потенциала химических веществ // *Лабораторные животные для научных исследований*. 2018. № 4. С. 74–87. [Kargopol'tseva D., Kryshen K., Katelnicova A. et al. Opyt primeneniya testa maksimizacii Magnussona i Kligmana na morskikh svinkah pri ocenke sensibiliziruyushchego potentsiala himicheskikh veshchestv // *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovanij*. 2018. N. 4. P. 74–87. (In Russ.)]. DOI: 10.29296/2618723X-2018-04-06.
5. Geffré A., Concordet D., Braun J.-P. et al. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel // *Veterinary Clinical Pathology*. 2011. Vol. 40. P. 107–112. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2011.00287.x.
6. Евгина С.А., Савельев Л.И. Современные теория и практика референтных интервалов // *Лабораторная служба*. 2019. Т. 8. № 2. С. 36–44. [Evgina S.A., Savel'ev L.I. Sovremennye teoriya i praktika referentnykh intervalov // *Laboratornaya sluzhba*. 2019. T. 8. N. 2. P. 36–44. (In Russ.)]. DOI: 10.17116/labs2019802136.
7. CLSI Document C28-A3c. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline, third edition. Wayne, Pa., USA: CLSI, 2010.
8. Friedrichs K.R., Harr K.E., Freeman K.P. et al. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics // *Veterinary clinical pathology*. 2012. Vol. 41. N. 4. P. 441–453. DOI: 10.1111/vcp.12006.
9. Horn P. S., Pesce A.J., Copeland B.E. A robust approach to reference interval estimation and evaluation // *Clinical chemistry*. 1998. Vol. 44. N. 3. P. 622–631. DOI: 10.1093/clinchem/44.3.622.

#### Информация об авторах

**А.Ю. Бородина**, младший научный сотрудник, borodina.ay@doclinika.ru

АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,  
188663, Россия, Ленинградская обл.,  
Всеволожский район, г.п. Кузьмолловский,  
ул. Заводская, д. 3, к. 245.

#### Information about the authors

**A.Yu. Borodina**, junior researcher, borodina.ay@doclinika.ru

Research and manufacturing company  
“Home of Pharmacy”,  
188663, Russia, Leningrad oblast,  
Vsevolozhskiy district, Kuzmolovskiy t.s.,  
Zavodskaya st. 3–245.

#### Сведения о конфликте интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

#### Conflict of interest

The author declare no conflict of interest.

Дата поступления рукописи  
в редакцию: 20.06.2023

Дата рецензии статьи: 10.08.2023

Дата принятия статьи к публикации: 13.09.2023

Received: 20.06.2023

Reviewed: 10.08.2023

Accepted for publication: 13.09.2023