

Новое в науке и практике доклинических исследований.**Сообщение 2**

М.Н. Макарова, доктор медицинских наук, заместитель директора, ORCID 0000-0003-3176-6386,

В.Г. Макаров, доктор медицинских наук, профессор, директор, ORCID 0000-0002-2447-7888

Санкт-Петербургский институт фармации

188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, ул. Заводская, д. 3, к. 245

E-mail: makarova.mn@doclinika.ru

Резюме. В статье дан анализ ряда важных публикаций за 2019 г. для ученых, занимающихся биомедицинскими исследованиями. Так, представлена новая модель меланомы на мышах линии c-Kit-CreER с тамоксифеном, которая даст возможность для тестирования новых химио- и иммунотерапевтических методов лечения, а также связанных с ними потенциальных рисков для состояния здоровья. В публикации ученых из Сан-Франциско, занимающихся изучением механизмов старения, на основании изучения иммунитета голой кротовой крысы, продолжительность жизни которой в 10 раз превышает таковую обычных крыс, приводится заключение о значении высокого количества нейтрофилов, играющих важную роль во врожденном и адаптивном иммунитете.

Статья американских ученых, опубликованная в Journal of the American Association for Laboratory Animal Science (ноябрь 2019 г.), посвящена анализу способов обращения с мышами при манипуляциях (чистка клеток, перемещение животных и т.п.), таких как применение щипцов (пинцета), работа в перчатках, использование пластиковых стаканчиков и специальных тоннелей. В июльском номере этого же журнала приведены материалы по обоснованию возможности увеличения интервала санитарной обработки верхних частей (крышек) клеток мышей до 90 дней без ущерба санитарному состоянию и здоровью животных в отличие от клеток для крыс, которые должны обрабатываться не реже одного раза в 2 нед. Это позволяет снизить затраты на уход за мышами и увеличить срок службы оборудования.

Возможности сокращения времени санитарной обработки мышинных клеток в программах ухода за животными посвящена публикация в сентябрьском номере этого же журнала. При этом авторы на основании использования методологии Lean Six Sigma (методология оптимизации процессов) разработали конкретные рекомендации, такие как приобретение дополнительных клеток и стоек для них; составление четких ежедневных графиков работы для каждого сотрудника с учетом конкретных этапов работы; разметка на полу с помощью цветной ленты зон чистых и грязных процессов, а также путей перемещения клеток и стеллажей для того, чтобы обеспечить отсутствие их пересечения. Это позволило сократить среднее время очистки одной стойки мышинных клеток на 35 мин, а сэкономленное время использовать на совершенствование здоровья и условий проживания лабораторных животных.

Ключевые слова: модель меланомы, голая кротовая крыса, уход за лабораторными животными.

Для цитирования: Макарова М.Н., Макаров В.Г. Новое в науке и практике доклинических исследований. Сообщение 2. Лабораторные животные для научных исследований. 2020; 03: с 3–6. <https://doi.org/10/29296/2618723X-2020-03-01>

New in the science and practice of preclinical research. Part 2

V. Makarov, ORCID 0000-0002-2447-7888

M. Makarova, ORCID 0000-0003-3176-6386

St. Petersburg Institute of Pharmacy

188663, Russia, Leningradskiy region, Vsevolozhskiy district, Kuzmolovskiy t.s., Zavodskaya st. 3–245

E-mail: makarova.mn@doclinika.ru

Summary. The article analyzes a number of important publications for 2019 for scientists engaged in biomedical research. Thus, a new model of melanoma in mice of the c-Kit-CreER line with tamoxifen is presented, which will provide an opportunity to test new chemotherapeutic and immunotherapy methods of treatment, as well as the potential health risks associated with them. In another publication, scientists from San Francisco who are studying the mechanisms of aging based on the study of the immunity of the naked mole rat, whose life span is ten times longer than that of ordinary rats, came to the conclusion about the significance of this high number of neutrophils, which play an important role in innate and adaptive immunity.

An article by American scientists published in the journal of the American Association for Laboratory Animal Science in November 2019 is devoted to the analysis of the most commonly used methods of handling mice when manipulating them (cleaning cells, moving animals, etc.), such as the use of forceps (tweezers), gloved hands, plastic cups and special tunnels. In the July issue of the same journal, materials are provided to justify the possibility of increasing the interval of sanitary treatment of the upper parts (covers) of mouse cells to 90 days without compromising the sanitary condition and health of animals, in contrast to cells for rats, which must be treated at least once every 2 weeks. This reduces the labor cost of caring for mice and increases the service life of the equipment.

The possibility of reducing the time of sanitary treatment of mouse cells in animal care programs is discussed in the September issue of the same journal. At the same time, the authors based on the Lean Six Sigma methodology (process optimization methodology) developed specific recommendations, such as: purchasing additional cells and racks for them; drawing up clear daily work schedules for each employee, taking into account specific stages of work; marking on the floor with colored tape areas of clean and dirty processes, as well as ways to move cells and racks in order to ensure that they do not intersect. This reduced the average cleaning time per rack of mouse cells by 35 minutes, and the time saved was used to improve the health and living conditions of laboratory animals.

Key words: model of melanoma, naked mole rat, care of laboratory animals..

For citation: Makarova M., Makarov V. New in the science and practice of preclinical research. Report 2. Laboratory Animals for Science. 2020; 03: с 3–6. <https://doi.org/10/29926/2618723X-2020-03-01>.

Новое в моделировании исследований на животных

В статье Q. Sun и соавт. [1], опубликованной в ноябрьском номере журнала «Nature Communications» за 2019 г., рассматриваются вопросы разработки стратегии раннего выявления у животных такой формы рака кожи, как меланома. При этом авторы отмечают, что меланома практически неизлечима на поздних стадиях развития. Это, в свою очередь диктует необходимость выявления заболевания на ранних стадиях развития, когда оно гораздо легче поддается излечению. Однако отсутствие адекватных моделей на животных, воспроизводящих ранние стадии меланомы, затрудняет разработку методов раннего выявления и лечения.

В своем исследовании ученые из США, Японии, Франции и Германии доказали, что для моделирования меланомы человека наиболее подходящими являются мыши линии c-Kit-CreER, которых они и использовали в своих экспериментах. В основе метода лежит стимуляция стволовых клеток меланоцитов мышей тамоксифеном, которая уже через 10 дней позволила имитировать начальную радикальную фазу роста меланомы человека. Через 26 дней после применения тамоксифена эпидермальные онкогенные меланоциты вторгались в дерму подобно вертикальной фазе роста прогрессирования меланомы человека. При этом исследователи указывают на отсутствие необходимости ультрафиолетового облучения животных, обычно используемого для ускорения развития меланомы. Таким образом, авторы предполагают, что данная новая модель меланомы предоставит уникальную возможность для тестирования новых химио- и иммунотерапевтических методов лечения, а также связанных с ними потенциальных рисков для состояния здоровья.

Новое в патогенезе заболеваний

Исследователи из биотехнологической фирмы Calico Life Sciences, специализирующейся на изу-

чении старения и базирующейся в Сан-Франциско, опубликовали в ноябрьском номере журнала «PloS Biology» за 2019 г. статью, посвященную анализу иммунитета голой кротовой крысы и его связи с продолжительностью их жизни [2]. В то время как естественная продолжительность жизни обычной мыши (*Mus musculus*) составляет всего несколько лет, ее родственница аналогичного размера – голая кротовая крыса (*Heterocephalus glaber*) живет 30 лет и более. И если для большинства долгоживущих видов, включая людей, характерно возрастное снижение уровня здоровья и повышение заболеваемости, то голые кротовые крысы до конца своих дней остаются здоровыми. Эти слепые безволосые животные, обитающие под землей в Восточной Африке, особенно устойчивы к онкологическим заболеваниям.

Из интересных фактов, обнаруженных исследователями, следует отметить отсутствие у голых кротовых крыс естественных клеток-киллеров, являющихся компонентом врожденной иммунной системы, а также первой линией обороны в борьбе с инфекциями, особенно вирусными, к которым голые кротовые крысы восприимчивы. Однако, живя под землей, они сталкиваются в основном с большим количеством бактерий, при этом, как было установлено, у них резко увеличивается число нейтрофилов, играющих важную роль как во врожденном, так и в адаптивном иммунитете. И хотя полученные результаты не объясняют замечательную продолжительность жизни и здоровье голой кротовой крысы, они расширяют перечень уникальных особенностей, обнаруженных у этих животных, и настраивают исследователей на дальнейшие разработки.

Новое в уходе за лабораторными животными

Публикация в Journal of the American Association for Laboratory Animal Science (ноябрь 2019 г.) [3] посвящена оценке различных способов обращения с мышами при манипуляциях с жи-

вотными (чистка клеток, перемещение животных и т.п.). В ней авторы сравнивают наиболее часто используемые для этих целей щипцы (пинцет) и извлечение мышей руками в перчатках, а также пластиковые стаканчики и специальные тоннели.

Использование щипцов для манипулирования с мышами широко распространено среди исследователей. Этот метод выполняется с помощью щипцов с мягким наконечником для мягкого захвата мышей у основания хвоста или рыхлой кожи холки. При большом ежедневном количестве таких повторяющихся манипуляций, сопровождающихся эргономическим напряжением опорно-двигательного аппарата, создается высокий риск повреждения не только непосредственно задействованных кистей рук и запястий, но и локтей, плеч, шеи и спины. Кроме этого, извлечение мышей щипцами за основание хвоста приводит к более высокому беспокойству животных, чем использование тоннеля или руки в перчатках. Причем в последнем варианте наряду с уменьшением тревожности и агрессивности отмечали снижение уровня глюкозы в крови. Доказано также, что бережное обращение с животными, когда их переносят руками, использование тоннелей и других приспособлений сглаживают депрессивное поведение в нейропсихиатрических моделях в отличие от обращения с мышами с помощью щипцов сказываются на результатах исследований.

В качестве критериев сравнительной оценки используемых методов применяли кратность смены клеток, оценку санитарной обработки и ретроспективный анализ данных о здоровье колоний мышей и их размножении. При этом время для замены клеток тратили значительно меньше в группах, где манипуляции производились руками в перчатках и щипцами по сравнению с другими методами. Так, например, среднее время на смену 14 клеток руками в перчатках составило 7,5 мин, а с помощью тоннеля – 12,5 мин. При оценке санитарной обработки (дезинфекции) поверхностей используемых средств (тоннелей, стаканчиков, перчаток и щипцов) достоверных различий не обнаружено. Анализ отчетов о состоянии здоровья животных, полученных на протяжении всего исследования, не выявил увеличения частоты заболеваний между группами. При сравнении среднего количества новорожденных в помете, родившихся в ходе исследования, не обнаружено существенных различий между группами.

Использование тоннелей и пластиковых стаканчиков намного более трудоемко и финансово затратно по сравнению с другими методами. Вместе с тем авторы подчеркивают, что при обра-

щении с мышами в перчатках следует соблюдать меры предосторожности, учитывая тот факт, что увеличенная площадь контакта по сравнению со щипцами или пинцетом может приводить к повышению нагрузки органическими составляющими. Смена перчаток между сторонами стойки с клетками или перед переходом к животным, принадлежащим другому исследователю, сводит к минимуму вероятность перекрестного загрязнения.

Новое в контроле среды обитания лабораторных животных

В Journal of the American Association for Laboratory Animal Science за 2019 г. опубликовано несколько статей, посвященных контролю среды обитания лабораторных животных, санитарной обработке клеток и помещений содержания животных.

В статье М.А. Esvelt и соавт. [4], опубликованной в № 4, сообщается, что согласно Руководству по уходу и использованию лабораторных животных [5], клетки, стеллажи и аксессуары (например, верх клеток) должны подвергаться санитарной обработке не реже 1 раза в 2 нед. Однако регулярное снятие и санитарная обработка верхней части клеток чаще, чем это может быть необходимо, влекут за собой увеличение затрат труда на уход за животными и сокращение срока службы оборудования. Поэтому авторы поставили перед собой задачу обосновать частоту санитарной обработки съемных частей клетки для грызунов на примере верхней части микроизоляционной клетки для мышей и крыс. Для контроля санитарного состояния клеток пробы для бактериологического анализа отбирали на 0, 14, 30, 60 и 90-й день.

Как показало исследование, уровень накопления бактерий на крышках клеток мышей и крыс существенно отличался. Так, загрязнение внутренних поверхностей крышек клеток крыс происходило значительно быстрее и интервал санитарной обработки 1 раз в 14 дней оказался оптимальным, в то время как для крышек клеток, в которых содержались мыши, этот интервал без ущерба санитарному состоянию и здоровью животных может быть увеличен до 90 дней.

В №5 журнала представлено исследование J.V. Kovach, A. Dash [6] об использовании методологии Lean Six Sigma (методология оптимизации процессов) для сокращения времени санитарной обработки мышинных клеток в программах ухода за животными. Следует отметить, что окружающая среда, в которой содержатся животные для биомедицинских исследований, может существенно

влиять на результаты этих исследований, поэтому эффективная очистка, мытье и дезинфекция клеток являются одной из важнейших задач персонала по уходу за животными.

Как указывают авторы, процесс очистки клеток животных, используемых в биомедицинских исследованиях, состоит из нескольких этапов и является довольно трудоемким. Поэтому исследователями совместно с персоналом, занимающимся уходом за животными, был проведен анализ существующего процесса обработки клеток мышей в Университете Хьюстона (Хьюстон, Техас). Весь процесс был разбит на отдельные этапы, по каждому из которых с помощью проведенного на основе методологии Lean Six Sigma «мозгового штурма» были выбраны наиболее эффективные меры, направленные как на повышение качества очистки, так и на уменьшение затрат времени.

Непосредственно само исследование состояло из трех фаз, в первой специально подобранная группа из персонала по уходу за животными наряду с постановкой цели и задач определяла желательные качественные и временные показатели основных этапов всего процесса обработки клеток. Во второй фазе исследования были проведены тщательные многократные замеры всех операций по санитарной обработке клеток. И, наконец, в третьей, аналитической, фазе эксперимента были подробно проанализированы причины задержек и нарушения качества обработки по каждому из этапов и разработаны рекомендации по их устранению. Так, например, одной из причин был дефицит чистых клеток и стеллажей (стоек) для них, для того чтобы пересаживать туда мышей на время обработки грязных клеток, в которых они содержались. Второй важной причиной нарушения ритмичности процесса было недостаточное количество технического персонала, непосредственно участвовавшего в процессе обработки клеток. И, наконец, третьей причиной, влияющей в основном на качество работы, стало пересечение зон чистых и грязных процессов.

Проведенное исследование позволило дать конкретные рекомендации, основными среди которых были: приобретение дополнительных клеток и стоек для них; составление четких ежедневных графиков работы для каждого сотрудника с учетом конкретных этапов работы; разметка на полу с помощью цветной ленты зон чистых и грязных процессов, а также путей перемещения клеток и стеллажей для того чтобы обеспечить отсутствие их пересечения. В результате реализации этого проекта среднее время процесса очистки одной стойки мышиных клеток обслуживающим персоналом было сокращено на 35 мин, а сэкономленное время позво-

лило специалистам больше внимания уделять другим задачам по уходу за животными, в том числе проверке состояния их здоровья, совершенствованию питания и др.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов

Макарова М.Н. – идея, работа с источниками литературы, написание, редактирование текста. Макаров В.Г. – сбор и систематизация данных, написание отдельных фрагментов текста.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Authors' contributions

Marina N. Makarova – idea, analysis of literature data, compilation of the list of references, writing, revising the text. Valeriy G. Makarov – data collection and systematization, writing individual parts of the text.

Литература

1. Sun Q., Lee W., Mohri Y., Takeo M., Lim C.H., Xu X., Myung P., Atit R.P., Taketo M.M., Moubarak R.S., Schober M., Osman I., Gay D.L., Saur D., Nishimura E.K., Ito M. A novel mouse model demonstrates that oncogenic melanocyte stem cells engender melanoma resembling human disease. *Nat. Commun.*, 2019; Nov 4; 10 (1):5023. – 16 p. doi: 10.1038/s41467-019-12733-1.
2. Hilton H.G., Rubinstein N.D., Janki P., Ireland A.T., Bernstein N., Fong N.L., Wright K.M., Smith M., Finkle D., Martin-McNulty B., Roy M., Imai D.M., Jojic V., Buffenstein R. Single-cell transcriptomics of the naked mole-rat reveals unexpected features of mammalian immunity. *PLoS Biol.* 2019 Nov; 17(11): e3000528. doi: 10.1371/journal.pbio.3000528
3. Doerning C.M., Thurston S.E., Villano J.S., Kaska C.L., Vozheiko T.D., Soleimanpour S.A., Lofgren J.L. Assessment of Mouse Handling Techniques During Cage Changing. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, 2019 Nov 1; 58 (6): 767-773. doi: 10.30802/AALAS-JAALAS-19-000015.
4. Esvelt M.A., Steiner L., Childs-Thor C., Dysko R.C., Villano J.S., Freeman Z.T. Variation in Bacterial Contamination of Microisolation Cage Tops According to Rodent Species and Housing System. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, 2019 Jul 1; 58(4):450-455. doi:10.30802/AALAS-JAALAS-18-000126.
5. Guide for the care and use of laboratory animals, 8th ed. Institute for Laboratory Animal Research. 2011. Washington (DC): National Academies Press.
6. Kovach J.V., Dash A. Using the Lean Six Sigma Methodology to Reduce Mouse Cage Sanitation Time for Animal Care and Use Programs. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, 2019 Sep 1; 58 (5): 551-557. doi: 10.30802/AALAS-JAALAS-18-000121.