

Референсные интервалы по массовым коэффициентам органов мышей и их абсолютным значениям

Е.А. Рощина

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

E-mail: roschina.ea@doclinika.ru

Резюме. Анализ массы органов в токсикологических исследованиях является важной конечной точкой для выявления органов-мишеней тестируемых объектов. В настоящей статье определены референсные интервалы для массовых коэффициентов органов аутбредных мышей (ICR CD-1), а также их абсолютных значений. Данные по массе органов мышей получены от животных контрольных групп токсикологических исследований, проведенных в АО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» за период с 2017 по 2021 г. Возраст животных на момент некропии составлял 12–18 нед. Исследования были выполнены с соблюдением принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей и в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики.

В соответствии с рекомендациями Общества токсикологической патологии (The Society of Toxicologic Pathology, STP) у экспериментальных мышей регистрировали массу следующих органов: печень, сердце, почки, головной мозг, селезенка, тимус, семенники. Дополнительно анализировали массу легких с трахеей. В связи с малыми размерами надпочечников и яичников массу данных органов не регистрировали. Чтобы учесть биологические различия между животными, при статистическом анализе массы органов необходимо использовать массу тела животного. Расчет массовых коэффициентов относительно массы тела снижает диапазон полученных значений из-за различий в массе тела у животных, в то же время резкое увеличение или уменьшение массы тела может привести к ложной интерпретации данных. При значительных изменениях массы тела могут быть полезны соотношения массы органов и мозга, поскольку масса мозга не меняется с изменением массы тела. Таким образом, существуют различные методы оценки массы органов в исследованиях токсичности, поэтому для формирования референсных интервалов анализировали массовые коэффициенты органов относительно массы тела и головного мозга, а также абсолютные значения массы органов.

Для данных был применен непараметрический метод определения референсных интервалов. В выборках по массовым коэффициентам органов количество значений в среднем было более 120, по абсолютным коэффициентам органов — более 60.

По соотношению выбросов массовых коэффициентов относительно массы тела животных и головного мозга у самок мышей различий не выявлено, но у самцов наименьшее количество выбросов установлено при расчете массовых коэффициентов органов относительно массы тела животных.

Ключевые слова: доклинические исследования, непараметрическое определение референсных интервалов, аутбредные мыши ICR CD-1, масса органов

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

For citation: Рощина Е.А. Референсные интервалы по массовым коэффициентам органов мышей и их абсолютным значениям. Лабораторные животные для научных исследований. 2022; 3. 24–29. <https://doi.org/10.57034/2618723X-2022-03-03>.

Original article

Reference intervals of mice organs mass coefficients and absolute weight

E.A. Roshchina

Research and manufacturing company «Home of Pharmacy», Leningrad oblast, Russia

E-mail: roschina.ea@doclinika.ru

Abstract. Organ weight analysis in toxicological studies is an important endpoint for identifying target organs in test system. In this article, reference ranges for organ weight ratios of outbred mice (ICR CD-1), as well as their absolute values, are determined. Data on the organs weight of mice were obtained on the basis of control

© Рощина Е.А., 2022

groups of toxicological studies conducted at the research and manufacturing company «HOUSE OF PHARMACY» for the period 2017–2021. The age of the animals at the time of necropsy was 12–18 weeks. The studies were performed in compliance with the principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes and in accordance with the rules of Good Laboratory Practice. In accordance with the recommendations of the Society for Toxicological Pathology (STP), the weight of the following organs was recorded in experimental mice: liver, heart, kidneys, brain, spleen, thymus, testes. Additionally, the lungs weight with the trachea was analyzed. Due to the small size of the adrenal glands and ovaries, these organs weight was not recorded.

To account the biological variations between animals, the body weight of the animal has to be taken into consideration when analyzing the organ weight statistically. Normalization of organ weights to body weight reduces the variations due to body weight differences in animals, at the same time extreme increase or decrease in body weight may results in sham interpretation. When there is significant change in body weight, organ-to-brain weight ratios may be useful, as brain weight does not change with change in body weight. Thus, there are various methods for assessing organ weights in toxicity studies, so organ weight ratios relative to body and brain weights, as well as absolute organ weight, were analyzed to form reference intervals.

For the data, a non-parametric method for determining reference intervals was applied. In samples for mass coefficients of organs, the values number on average was more than 120, for absolute coefficients of organs — more than 60.

There were no differences in the ratio of emissions mass coefficients relative to the animal's body weight and brain weight in female mice, but in males the smallest amount of emissions was found when calculating the organs coefficients mass relative to the body weight of animals.

Keywords: preclinical studies, nonparametric determination of reference intervals, outbred mice, organs weight

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

For citation: Roshchina E.A. Reference intervals of mice organs mass coefficients and absolute weight. *Laboratory Animals for Science*. 2022; 3. 24–29. <https://doi.org/10.57034/2618723X-2022-03-03>.

Введение

Аутбредные линии мышей используют в качестве тест-системы в токсикологических, онкологических, инфекционных и фармакологических исследованиях. Аутбредная линия определяется не только как ограниченное поголовье животных с таким же незначительным приростом коэффициента инбридинга (менее 1% в поколение), но и с высокой степенью генетической изменчивости [1].

Мышей стали широко использовать в лабораторных целях, так как они имеют следующие характеристики:

- 1) некоторые схожие анатомические и физиологические особенности с людьми, а также успешное секвенирование их генома, позволяющее выполнять моделирование патологий;
- 2) относительно короткий репродуктивный цикл, который обеспечивает доступ к воспроизводству большого количества особей за короткий промежуток времени.

На данный момент существует много источников литературы, касающихся оптимальных требований к питанию и условиям содержания, что также является преимуществом для данной тест-системы.

Одним из главных недостатков является небольшой размер животных, что затрудняет выполнение ряда процедур, таких как введение объектов исследования, отбор образцов крови и мочи, некоторые аспекты некропсии [2].

Регистрация массы органов является важной частью данных исследований. Общество токсикологической патологии (STP) рекомендует регистрировать массу печени, сердца, почек, головного мозга, селезенки, тимуса, семенников

и яичников, а также надпочечников у мышей, задействованных в токсикологических исследованиях [3]. Однако регистрация массы яичников и надпочечников при практической реализации оказывается не выполнима ввиду их малого размера и отсутствия средств измерений с достаточной точностью. Для получения дополнительной информации можно регистрировать массу легких с трахеей.

Цель настоящей работы — определение референсных интервалов массовых коэффициентов органов, рассчитанных относительно массы тела и головного мозга, и абсолютных значений массы органов аутбредных мышей.

Материал и методы

Для расчета референсных интервалов использованы данные, полученные от контрольных/интактных групп токсикологических экспериментов в период с 2017 по 2021 г. Все исследования проведены в соответствии с принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1986) [4], и правилами надлежащей лабораторной практики.

Во всех экспериментах модельным объектом являлись аутбредные мыши линии ICR (CD1) в возрасте 12–18 недель (всего 124 самца и 128 самок), предоставленные АО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ». Самки не являлись беременными и рожавшими. Животных содержали в стандартных условиях: температура в помещении 18–26 °С, относительная влажность воздуха 45–65%, 12-часовой световой день, группы размещали в стандартных пластиковых клетках на подстиле, площадь пола клетки содержания

Таблица 1.
Доля статистических выбросов при расчете массовых коэффициентов органов самцов и самок мышей относительно массы тела

Органы	Диапазон массы тела самцов 24–42 г (n=124)	Диапазон массы тела самок 20–40 г (n=128)
	Общее количество выбросов, %	
Сердце	2,42	2,34
Легкие с трахеей	1,61	3,13
Тимус	0	3,13
Печень	2,42	0,78
Селезенка	3,23	4,69
Почки	1,61	0,78
Головной мозг	0	2,34
Семенники	8,06	—

Примечание. Здесь и в табл. 4–6: n — число всех особей.

Таблица 2.
Референсные интервалы по массовым коэффициентам органов самцов мышей, рассчитанные как отношение массы органа к массе тела

Органы	Диапазон массы тела 24–42 г
Сердце	0,46–0,80 (n=121)
Легкие с трахеей	0,54–1,38 (n=122)
Тимус	0,093–0,317 (n=124)
Печень	4,46–7,58 (n=121)
Селезенка	0,28–1,26 (n=120)
Почки	1,47–2,38 (n=122)
Головной мозг	1,03–1,75 (n=124)
Семенники	0,30–0,96 (n=112)

Таблица 3.
Референсные интервалы по массовым коэффициентам органов самок мышей, рассчитанные как отношение массы органа к массе тела

Органы	Диапазон массы тела 20–40 г
Сердце	0,39–0,85 (n=125)
Легкие с трахеей	0,54–1,61 (n=124)
Тимус	0,102–0,560 (n=124)
Печень	3,67–6,76 (n=127)
Селезенка	0,30–1,16 (n=122)
Почки	1,21–2,10 (n=127)
Головной мозг	1,16–2,18 (n=125)

Примечание. Здесь и в табл. 3 и 7–10: n — число особей после удаления из выборки выбросов.

на одно животное соответствовала регламентирующим стандартам [5]. Эвтаназию выполняли в рамках проводимых исследований при помощи диоксида углерода (CO₂) с последующим удалением жизненно важных органов (легкие, сердце, головной мозг). В течение эксперимента доступ к корму и воде не был ограничен, за исключением 4 ч перед эвтаназией. Массу тела определяли непосредственно перед некропсией. Процедуру взвешивания внутренних органов осуществляли на электронных весах «Adventure» модель RV 214 («ОНАУС», Китай). Максимальный предел взвешивания составлял 210 г, минимальный — 0,001 г. Цена поверочного деления 0,001 г. Класс точности 1.

Массовые коэффициенты относительно массы тела были рассчитаны по формуле:

$$(m_o/m_t) \times 100, \quad (1)$$

где m_o — масса органа, m_t — масса тела животного.

Для определения массовых коэффициентов относительно массы головного мозга использовали следующую формулу:

$$(m_o/m_{gm}) \times 100, \quad (2)$$

где m_o — масса органа, m_{gm} — масса головного мозга.

Полученные данные по массовым коэффициентам органов относительно массы тела и головного мозга были отдельно представлены для самцов и самок мышей. Данные по абсолютным значениям органов были разделены на 2 группы в зависимости от массы тела животных (самцы: 24–31 и 32–42 г — по 62 особи, самки: 20–28 г — 63, 29–40 г — 65), так как при расчете коэффициентов используется масса тела и при анализе можно рассматривать результаты, не учитывая массу тела, но в случае с абсолютными значениями необходимо отталкиваться от показателей массы тела животных.

Таблица 4.
Доля статистических выбросов при расчете массовых коэффициентов органов самцов и самок мышей относительно головного мозга

Органы	Диапазон массы тела самцов 24–42 г (n=124)	Диапазон массы тела самок 20–40 г (n=128)
	Общее количество выбросов, %	
Сердце	0,81	3,70
Легкие с трахеей	0,81	3,70
Тимус	0	3,70
Печень	1,61	0,81
Селезенка	3,23	4,44
Почки	2,42	2,22
Семенники	3,23	—

Таблица 5.
Доля статистических выбросов при анализе абсолютных масс органов самцов мышей

Органы	Диапазон массы тела, г	
	24–31 (n=62)	32–42 (n=62)
	Общее количество выбросов, %	
Сердце	0	1,61
Легкие с трахеей	3,23	3,23
Тимус	0	1,61
Печень	1,61	1,61
Селезенка	4,84	3,23
Почки	1,61	0
Головной мозг	6,45	1,61
Семенники	4,84	9,68

Статистическую обработку результатов осуществляли в программе Statistica 10 (StatSoft, США). Статистические выбросы оценивали при помощи метода Тьюки. Референсные интервалы определяли непараметрическим методом.

Результаты и обсуждение

По данным каждого органа отдельно определяли статистические выбросы, лежащие за пределами интервала $(Q1-1,5IQR)-(Q3+1,5IQR)$, где Q1 и Q3 — границы 1-го и 3-го квартилей, а IQR — межквартильный интервал $(Q3-Q1)$ [6] (табл. 1). Обнаруженные выбросы были исключены из массива данных.

Референсные интервалы для полученных результатов были определены в промежутке 2,5–97,5%, представленные в табл. 2 и 3 [7].

Ввиду возможного влияния тестируемых объектов на массу тела животных (в сторону снижения) при анализе полученных данных

массовые коэффициенты органов, рассчитанные относительно массы тела, увеличиваются. В таких случаях можно выполнить анализ данных по массе органов относительно массы головного мозга, поскольку масса мозга не изменяется с увеличением или снижением массы тела. Также для исключения подобных ошибок можно выполнить анализ абсолютных значений массы органов.

Статистические выбросы, определенные методом Тьюки, при расчете массовых коэффициентов органов самцов и самок мышей относительно головного мозга и представлены абсолютных значений были исключены из массива данных. Общее количество выбросов представлено в табл. 4–6.

Соотношение выбросов, полученных при анализе массовых коэффициентов органов относительно массы тела животных и массы головного мозга, у самок мышей не различалось. У самцов мышей меньшее количество

Таблица 6.
Доля статистических выбросов при анализе абсолютных масс органов самок мышей

Органы	Диапазон масс тела, г	
	20–28 (n=63)	29–40 (n=65)
	Общее количество выбросов, %	
Сердце	2,94	4,48
Легкие с трахеей	7,35	0
Тимус	1,47	4,48
Печень	1,47	0
Селезенка	5,88	4,48
Почки	1,47	1,49
Головной мозг	2,94	0

Таблица 7.
Референсные интервалы по массовым коэффициентам органов самцов мышей, рассчитанные как отношение массы органа к массе головного мозга

Органы	Диапазон массы тела 24–42 г
Сердце	30,4–55,6 (n=123)
Легкие с трахеей	42,4–90,3 (n=123)
Тимус	7,0–21,7 (n=124)
Печень	307,1–582,1 (n=122)
Селезенка	19,5–86,4 (n=120)
Почки	100,2–186,5 (n=121)
Семенники	21,7–80,1 (n=120)

Таблица 8.
Референсные интервалы по массовым коэффициентам органов самок мышей, рассчитанные как отношение массы органа к массе головного мозга

Органы	Диапазон массы тела 20–40 г
Сердце	25,2–56,8 (n=123)
Легкие с трахеей	37,0–101,1 (n=123)
Тимус	7,3–30,5 (n=123)
Печень	230,2–461,4 (n=127)
Селезенка	21,4–86,5 (n=120)
Почки	70,8–135,3 (n=125)

выбросов выявлено при расчете массовых коэффициентов органов относительно массы тела животных.

В табл. 7 и 8 представлены референсные интервалы по массовым коэффициентам органов, рассчитанных как отношение массы органа к массе головного мозга (данные представлены без деления на диапазоны масс).

Масса остальных органов зависит от массы тела, поэтому в случае анализа абсолютных значений массы органов данные были разделены на две выборки в соответствии с двумя интервалами массы тела животных (табл. 9 и 10).

Закключение

Одна из основных целей любого доклинического исследования токсичности — определение органов-мишеней. При анализе данных нужно учитывать, что чем меньше масса органа, тем больше погрешность его массы при взвешивании. Поэтому регистрация массы яичников и надпочечников у мышей является

недостаточно точным показателем. При значительном снижении массы тела животного предпочтительнее использовать массовые коэффициенты органов относительно массы головного мозга.

Данные о массе органов следует оценивать в контексте всего исследования, включая изменение массы тела, фармакологического действия тестируемого препарата, данных клинико-лабораторных, макроскопических и микроскопических показателей.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Shin H.J., Cho Y.M., Shin H.J. et al. Comparison of commonly used ICR stocks and the characterization of Kori: ICR // Laboratory Animal Research. 2017. Vol. 33. N. 1. P. 8–14. doi: 10.5625/lar.2017.33.1.8.
2. Gad S.C. Biomarkers in toxicology: Chapter 2. Rodents model for toxicity testing and biomarkers. Academic Press, 2017. P. 7–69. doi: 10.1016/B978-0-12-404630-6.00002-6.
3. Sellers R.S., Mortan D., Michael B. et al. Society of Toxicologic Pathology Position Paper: Organ Weight

Таблица 9.
Референсные интервалы по абсолютным массам органов самцов мышей, г

Органы	Диапазон массы тела, г	
	24–31	32–42
Сердце	0,13–0,24 (n=62)	0,15–0,26 (n=62)
Легкие с трахеей	0,17–0,39 (n=60)	0,19–0,51 (n=60)
Тимус	0,036–0,091 (n=62)	0,030–0,106 (n=61)
Печень	1,30–2,18 (n=61)	1,49–2,43 (n=61)
Селезенка	0,094–0,514 (n=59)	0,088–0,348 (n=60)
Почки	0,35–0,70 (n=61)	0,50–0,83 (n=62)
Головной мозг	0,36–0,52 (n=58)	0,35–0,55 (n=61)
Семенники	0,126–0,285 (n=59)	0,096–0,352 (n=56)

Таблица 10.
Референсные интервалы по абсолютным массам органов самок мышей, г

Органы	Диапазон массы тела, г	
	20–28	29–40
Сердце	0,12–0,21 (n=61)	0,13–0,28 (n=62)
Легкие с трахеей	0,15–0,42 (n=58)	0,17–0,49 (n=65)
Тимус	0,038–0,126 (n=62)	0,030–0,150 (n=62)
Печень	1,10–1,82 (n=62)	1,08–2,10 (n=65)
Селезенка	0,098–0,419 (n=59)	0,094–0,388 (n=62)
Почки	0,34–0,51 (n=62)	0,36–0,67 (n=64)
Головной мозг	0,33–0,56 (n=61)	0,35–0,54 (n=65)

Recommendations for Toxicology Studies // Toxicologic Pathology. 2007. Vol. 35. N. 5. P. 751–755. doi: 10.1080/01926230701595300.

- European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes, Strasbourg, 1986.
- Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Восьмое издание / пер. с англ. Под ред. И.В. Белозерцевой, Д.В. Блинова, М.С. Красильщиковой. М.: ИРБИС, 2017. 336 с. [Rukovodstvo po soderzhaniyu i ispolzovaniyu laboratornykh zhivotnykh. Vos'moe izdanie / per. s angl. Pod red. I.V. Belozercevoi, D.V. Blinova, M.S. Krasil'shikovoi. M.: IRBIS, 2017. 336 p. (In Russ.)].
- Луговик И.А., Макарова М.Н. Токсикологические исследования. Референтные интервалы массовых

коэффициентов внутренних органов на выборке в 1000 аутбредных крыс // Лабораторные животные для научных исследований. 2021. №1. С. 3–11 [Lugovic I.A., Makarova M.N. Toksikologicheskie issledovaniya. Referentnye intervaly massovykh koeffitsientov vnutrennykh organov na vyborke v 1000 autbrednykh krysov // Laboratory animals for scientific research. 2021. N. 1. P. 3–11 (In Russ.)]. doi: 10.29296/2618723X-2021-01-01.

- Евгина С.А., Савельев Л.И. Современные теория и практика референтных интервалов // Лабораторная служба. 2019. Т. 8. №2. С. 36–44. doi: 10.17116/labs2019802136 [Evgina S.A., Savel'ev L.I. Sovremennyye teoriya i praktika referentnykh intervalov // Laboratornaya sluzhba. 2019. Vol. 8. N. 2. P. 36–44 (In Russ.)].

Информация об авторах

Е.А. Рощина, научный сотрудник
отдела специфической токсикологии
и фармакодинамики, roschina.ea@doclinika.ru,
<https://orcid.org/0000-0002-9257-4241>

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

Дата поступления рукописи
в редакцию: 12.05.2022

Дата рецензии статьи: 20.07.2022

Дата принятия статьи к публикации: 15.08.2022

Information about the authors

E.A. Roshchina, Researcher, Department
of Specific Toxicology and Pharmacodynamics,
roschina.ea@doclinika.ru,
<https://orcid.org/0000-0002-9257-4241>

Research and manufacturing company
«Home of Pharmacy»,
188663, Russia, Leningrad oblast,
Vsevolzhskiy district, Kuzmolovskiy t.s.,
Zavodskaya st. 3-245

Received: 27 May 2022

Reviewed: 20 July 2022

Accepted for publication: 15 August 2022