

**ЛАБОРАТОРНЫЕ ЗАНЯТИЯ**  
**МОДЕЛЬНЫЕ ОБЪЕКТЫ ГЕНЕТИКИ**

**Алматы**

## Лабораторное занятие 1

### Правила работы в лабораториях.

**Цель:** Ознакомить студентов с требованиями к видам лабораторных животных, их карантинированием, содержанием, кормлением, мечением.

**План занятия:**

1. Правила безопасной работы в лабораториях.
2. Модельные объекты, используемые в экспериментальной генетике.

*Оборудование и материалы*

Набор инструментов в стерилизаторе (ножницы, иглы, шприцы, пинцеты, корнцанги), лабораторные животные, ватные спиртовые тампоны краски для мечения, эфир, ксилол, мультимедийное оборудование, плакаты и презентации MS Office Power Point по теме занятия.

Большинство вирусов разных таксономических групп могут быть отличимы друг от друга на основе патогенности для лабораторных животных разных видов или возраста.

*Виды лабораторных животных.* Наиболее широко в лабораториях применяют мышей, белых крыс, кроликов, морских свинок, хомяков, цыплят. У молодых мышей экспериментально воспроизводят грипп, альфа- и флавивирусные инфекции, ящур (на новорожденных мышатах) и др. Они восприимчивы ко многим вирусам, их легко разводить и с ними удобно работать. Лучше использовать мышей инбредных линий, так как они почти одинаково реагируют на тот или иной вирус. У крыс также создают инбредные линии, но эти животные более устойчивы к определенным вирусным инфекциям, чем мыши. Онкогенность некоторых вирусов широко изучают на золотистых хомячках. Для вирусологических опытов обычно используют гладкошерстных морских свинок массой 250-300 г.

Ту или иную инфекцию иногда изучают на животных нескольких видов, обладающих разной чувствительностью к данному вирусу, что позволяет дифференцировать вирусы, вызывающие клинически сходные симптомы болезни (например, ящур, везикулярный стоматит, везикулярная экзантема и везикулярная болезнь свиней).

По генетическим качествам лабораторных животных делят на четыре группы:

- 1) животные смешанного происхождения, полученные от разных животноводов, такие животные гетерогенны;
- 2) животные, полученные непосредственно из одного источника, однако генетически такие животные вариабельны;
- 3) инбредные линии животных. Их получают в результате спаривания брата с сестрой или родителей с детьми, по крайней мере не менее 20 поколений. При таком методе разведения достигается все возрастающая степень гомозиготности;

4) однородные гибриды  $F_1$ . Высокая степень гетерозиготности, характерная для каждого гибрида, связана здесь с генетическим однообразием, которое соответствует степени гомозиготности родительских линий. Как правило, однородные гибриды  $F_1$  менее изменчивы, чем обе родительские линии. Животные-мутанты имеют отдельно выраженный наследственный фактор, который обуславливает видимое отклонение от нормальной формы.

Отрицательная сторона выделения вируса на лабораторных животных - возможность диагностических ошибок вследствие активации скрытого вирусносительства. В этом случае развитие симптомов болезни после введения материала не следствие действия введенного вируса, а результат самой процедуры, нарушающей предшествующее равновесие в организме. В это время проявляется вирус или другой инфекционный агент, длительно персистирующий в организме. Выражается это резкими неврологическими симптомами (повороты вдоль длинной оси тела).

Наличие скрытой вирусной инфекции может также выражаться уменьшением или исчезновением чувствительности животных к исследуемому вирусу вследствие явления интерференции. Возможен и противоположный эффект, а именно - явление синергизма в действии вирусов, что дает иногда результаты, трудные для правильной интерпретации.

Для некоторых вирусологических работ, например при выделении вируса с невыясненными болезнетворными свойствами, необходимо использовать гнотобиотов. Термин «гнотобиоты» объединяет две категории животных: безмикробных (стерильных), не содержащих никаких жизнеспособных микробов, и гнотофор - носителей одного (моноготофоры), двух (дигнотофоры) или более (полигнотофоры) микроорганизмов. В настоящее время безмикробные животные по динамике роста делятся на три группы: I - обезьяны, поросята, цыплята растут лучше обычных животных или наравне с ними; II - крысы, мыши, собаки, кошки растут наравне с обычными животными; III - морские свинки, кролики, козлята, ягнята растут хуже обычных животных.

Стерильных птиц получают посредством инкубации яиц со стерильной скорлупой в стерильном инкубаторе, лабораторных животных - путем кесарева сечения или гистерэктомии. Содержат животных в стерильных изоляторах. Воздух, вода и корм должны быть стерильными.

Особое значение среди гнотобиотов занимают СПФ-животные (Specific pathogen free), 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 лабораторные СПФ-животные - крысы, морские свинки, кролики, поросята, птицы и др.

#### **Контрольные вопросы:**

1. Правила безопасной работы в лабораториях.
2. Модельные объекты, используемые в экспериментальной генетике.

## Лабораторное занятие 2.

### Изучение наследования отдельных признаков.

**Цель:** ознакомить студентов с изучением наследования отдельных признаков..

**План занятия:**

1. Методы изучения наследования отдельных признаков.

Генетический анализ является методологической основой генетики. Его первым специфическим методом, который предложил И. Г. Мендель в 1865 г., был гибридологический метод анализа отдельных признаков. Впервые определение генетического анализа как "системы опытов, наблюдений и вычислений, имеющих целью разложение свойств (признаков) организма на отдельные наследственные элементы, "отдельные признаки", и изучение свойств соответствующих им генов" было дано одним из основоположников генетического анализа Александром Сергеевичем Серебровским в книге "Генетический анализ" (1970).

*Изучение наследования отдельных признаков.* Изучение наследования отдельных признаков - важнейшая часть генетического анализа, позволяющая определить тип наследования (ядерное или внеядерное), установить гены, по которым различаются исходные формы, и общее число генов, контролирующих данный признак, выявить типы взаимодействия генов и характер их наследования. В случае обнаружения внеядерного наследования выясняют, с какими органеллами (пластидами, митохондриями, цитоплазмой) или другими компонентами клетки (плазмидами, вирусами и пр.) оно связано.

*Локализация генов.* В решение этой задачи входит определение группы сцепления для вновь обнаруживаемых мутаций, изучение совместного наследования нескольких признаков, локализация генов в группе сцепления с помощью уже картированных генов, построение генетических, цитологических, физических (рестриктных) карт хромосом. Арсенал методов, применяемых для локализации генов, достаточно велик. Это метод гибридизации с использованием специально создаваемых линий, маркированных по разным хромосомам рецессивными или доминантными мутациями или перестройками хромосом; картирование на основе митотического кроссинговера; гибридизация соматических клеток; рестриктное или физическое картирование; гибридизация *in situ*.

Предметом изучения в генетическом анализе является фенотип организма, его отдельные признаки. Признаком в генетике считают любое свойство, любую особенность, по которым особи могут отличаться друг от друга. Это - морфологические, биохимические, физиологические, анатомические различия, чувствительность или устойчивость к различного рода воздействиям, особенности поведения и т. д.

По генетической структуре признаки можно разделить на элементарные (простые) и сложные. Подобно тому, как генотип особи можно разложить на

элементарные наследственные единицы - гены, фенотип особи также можно представить как совокупность элементарных единиц - "фенов", каждый из которых контролируется аллелями одного гена. Фен есть простой, элементарный признак. Сложные признаки контролируются несколькими генами, представляя собой определенное сочетание фенов.

Очевидно, что для того, чтобы понять, с каким признаком мы имеем дело, необходимо установить число генов, его контролирующих. Очевидно также, что об элементарности признака можно говорить после изучения природы изменения (мутации) на уровне конечного продукта действия гена, на уровне фермента, белка, ибо, даже получив расщепление 3:1, мы не можем утверждать окончательно, что имеем дело с одним геном, а не с двумя, тесно сцепленными. Следовательно, одна из основных задач анализа фенотипа - это разложение признака на элементарные признаки - фены.

Хотя развитие и проявление каждого признака находится в конечном итоге под контролем всего генотипа, изучение элементарных признаков позволяет выявить связь между геном и феном, изучать функции и структуру каждого гена, его плеiotропные эффекты и изменчивость. Анализ сложных признаков проливает свет на механизм неаллельных взаимодействий, позволяет исследовать на биохимическом уровне этапы метаболизма, изменение которых приводит к тому или иному фенотипическому проявлению изучаемого признака.

#### **Контрольные вопросы:**

1. Методы изучения наследования отдельных признаков.

### **Лабораторное занятие 3.**

#### **Логика, принцип и этапы генетического анализа.**

**Цель:** ознакомить студентов с этапами генетического анализа.

#### **План занятия:**

1. Логика и принцип генетического анализа.
2. Этапы генетического анализа.

В основе генетического анализа лежит следующая логика: разложение признаков на фены, установление гена; от гена - к генному продукту и выяснению молекулярных механизмов его действия, к расшифровке генетического контроля метаболических путей, обуславливающих развитие изучаемого признака.

**Принцип анализа** - получение наследственно различающихся по изучаемым признакам форм и изучение этих различий на разных уровнях: организменном, клеточном, молекулярном, популяционном.

Основная задача **первого этапа анализа** - изучение наследования отдельных признаков для установления гена.

**Следующий этап анализа** предполагает локализацию установленных генов в группе сцепления и картирование хромосом.

Расшифровка биохимических нарушений метаболизма в результате действия установленных генов, выяснение механизмов их действия и функций и анализ структуры генов - **завершающий этап** изучения генетического контроля отдельных признаков.

Основываясь на данных о наследовании отдельных признаков, решают другие задачи генетического анализа: изучают генетическую структуру организмов, проводят геномный и популяционный анализ и др. На каждом этапе могут использоваться разные методы анализа.

**Контрольные вопросы:**

1. Логика и принцип генетического анализа.
2. Этапы генетического анализа.

#### **Лабораторное занятие 4.**

##### **Методы генетического анализа.**

**Цель:** ознакомить студентов с методами генетического анализа.

**План занятия:**

1. Методы генетического анализа..

Основной специфический метод генетического анализа – *гибридологический метод* - создан и разработан И. Г. Менделем в 1865 г. Его основные особенности заключаются в следующем. Для скрещивания подбираются (или создаются) гомозиготные исходные формы, различающиеся по одному или нескольким альтернативно, контрастно проявляющимся признакам. Проводится индивидуальный анализ потомства от каждого скрещивания в ряду поколений. В каждом поколении ведется строгий количественный учет всех потомков по всем изучаемым признакам, причем отдельно по каждому признаку, независимо от других. Это - один из важнейших принципов анализа расщеплений. Обычно анализируют два или три (иногда больше) поколения реципрокных скрещиваний.

*Реципрокные скрещивания* - система из двух скрещиваний (прямое и обратное). В прямом скрещивании признак в одном из своих проявлений вносится со стороны матери, в обратном - со стороны отца.

Уже по результатам F1 таких скрещиваний в большинстве случаев можно определить характер генетической природы признака (ядерная или внеядерная), выявить сцепление признака с полом. Анализ расщеплений в F2 служит основой для предложения гипотез о числе генов, типе их взаимодействия и характере наследования.

*Анализирующее скрещивание* - скрещивание с гомозиготной рецессивной формой, которая служит анализатором, так как образует только один тип гамет с рецессивными аллелями, на фоне которых выявляются аллели анализируемой особи. На основе расщепления в F<sub>a</sub> можно определять все, что и в F<sub>2</sub>, кроме типа взаимодействия генов, но на меньшей по сравнению с F<sub>2</sub> выборке. Его используют для анализа наследования при сцеплении, для

картирования хромосом и оценки частоты гамет, образуемых гетерозиготным родителем.

*Возвратные скрещивания* F<sub>v</sub> - скрещивания потомков с одним из родителей. В ряде случаев оно может оказаться анализирующим. Для решения ряда задач ставятся системы скрещиваний с участием нескольких форм.

*Насыщающие или поглотительные скрещивания* - последовательные скрещивания женских потомков нескольких поколений возвратных скрещиваний, имеющих цитоплазму, пришедшую от матери в исходном скрещивании, с исходной отцовской формой.

Эти скрещивания применяются, в частности, при изучении материнского эффекта цитоплазмы и других типов неядерного наследования.

*Циклические скрещивания* - система скрещиваний многих форм, различающихся или сходных по одному признаку, друг с другом во всех сочетаниях. Применяются для выявления генетического контроля признаков.

*В диаллельных скрещиваниях* также используется много форм, но анализ не всегда проводится по полной схеме циклического скрещивания. Часто он включает лишь часть этих скрещиваний. Например, исследует только результаты прямых скрещиваний либо только обратные скрещивания и т. д. При этом родительские линии могут быть специально отобраны для проведения их оценки, либо они случайно выбираются из некоторой популяции, параметры которой нужно оценить на основании этих скрещиваний. По результатам этих скрещиваний выявляют комбинационную ценность инбредных линий, которая проявляется в варьировании величины гетерозиса по отдельным гибридным комбинациям. Комбинационная ценность одной и той же линии может быть выражена средней величиной гетерозиса, наблюдаемого у всех гибридных комбинаций с этой линией - общая комбинационная способность, либо степенью гетерозиса в конкретной комбинации - специфическая комбинационная способность.

Поэтому в диаллельных скрещиваниях часто анализируются результаты только первого гибридного поколения.

#### **Контрольные вопросы:**

1. Методы генетического анализа.

### **Лабораторное занятие 5**

#### **Лабораторное оборудование.**

#### **Работа в боксах биологической безопасности.**

**Цель:** ознакомить студентов с лабораторными оборудованями и типами боксов биологической безопасности..

#### **План занятия:**

1. Лабораторные оборудованя.
2. Работа в боксах биологической безопасности.

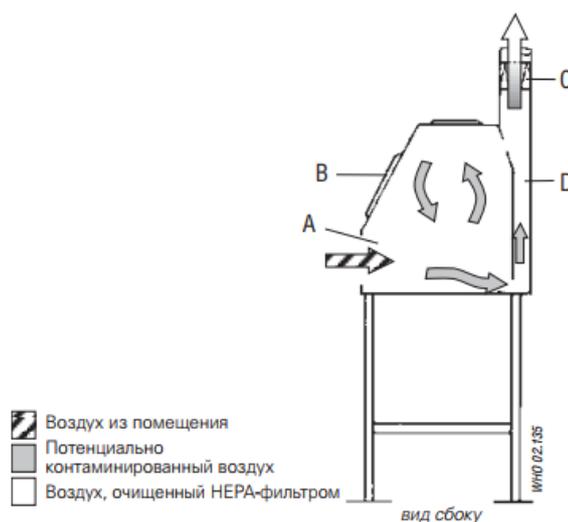
Боксы биологической безопасности (БББ) предназначены для того, чтобы защитить оператора, лабораторное оборудование и рабочие материалы от

воздействия инфекционных аэрозолей и брызг, которые могут возникнуть при работе с материалами, содержащими инфекционные агенты, такими как первичные культуры, инвентарь, диагностические образцы.

### **Бокс биологической безопасности класса I**

На рисунке 6 приведено схематическое изображение БББ класса I. Воздух в него поступает через открытую переднюю часть с минимальной скоростью 0,38 м/сек, проходит через рабочую поверхность и выводится из бокса через выпускной патрубок. Направленный поток воздуха уносит частицы аэрозоля, которые могут образовываться на рабочей поверхности, от лабораторного работника в выпускной патрубок.

Открытая передняя часть дает оператору доступ к рабочей поверхности внутри бокса, а наблюдать за работой он может через стеклянное окно. Это окно можно также полностью поднять, чтобы получить доступ к рабочей поверхности для чистки или других целей.



**Рисунок 6. Схема бокса биологической безопасности класса I.**

*A – открытая передняя часть; B – подъемная оконная рама;  
C – выпускной НЕРА-фильтр; D – вытяжной отсек.*

Воздух из бокса выводится через НЕРА-фильтр: (а) в лабораторию и затем в атмосферу через вентиляционную систему здания; (b) наружу через вентиляционную систему здания; или (c) непосредственно в атмосферу. НЕРА-фильтр может устанавливаться в вытяжном отсеке БББ или в вытяжке здания. Некоторые БББ класса I снабжены встроенным вентилятором вытяжки, другие рассчитаны на наличие вытяжного вентилятора в системе вентиляции здания. БББ класса I был первым признанным боксом биологической безопасности, поэтому, в силу простоты его конструкции, он по-прежнему широко используется во всем мире. Его преимущество состоит в том, что он обеспечивает защиту персонала и окружающей среды и может также использоваться для работы с радионуклидами и летучими химическими веществами. Из-за того, что нестерилизованный воздух проходит через рабочую поверхность прямо в открытую переднюю часть, считается, что он не обеспечивает на постоянной основе надежную защиту препарата.

### **Боксы биологической безопасности класса II**

Поскольку использование клеточных и тканевых культур для размножения вирусов и других целей постоянно расширяется, такое положение, при котором нестерилизованный воздух из помещения проходит над рабочей поверхностью, более не считается удовлетворительным. БББ класса II был сконструирован для защиты не только персонала, но и материалов, находящихся на рабочей поверхности. БББ класса II можно использовать для работы с инфекционными агентами групп риска 2 и 3. Их можно использовать для работы с инфекционными агентами группы риска 4 при наличии подачи воздуха под давлением.

Бокс биологической безопасности класса II типа A1. Встроенный вентилятор засасывает воздух из помещения (подает воздух) в бокс через переднюю дверцу и переднюю заборную решетку. Скорость входящего потока воздуха на уровне передней дверцы должна составлять, как минимум, 0,38 м/сек. Подаваемый воздух проходит через входной НЕРА-фильтр, после чего он попадает вниз на рабочую поверхность. Поскольку поток воздуха идет вниз, он приблизительно в 6-18 см от рабочей поверхности «разделяется» на два потока, из которых один проходит через переднюю выпускную решетку, а другой – через заднюю выпускную решетку.

#### **Выбор бокса биологической безопасности**

БББ следует выбирать, главным образом, в зависимости от вида необходимой защиты: защита препарата; защита персонала от микроорганизмов групп риска 1-4; защита персонала от радионуклидов и летучих токсичных химикатов; или от сочетания этих видов. В таблице 8 показано, какие БББ рекомендуются для каждого вида защиты. С летучими токсичными химикатами нельзя работать в тех БББ, которые рециркулируют воздух в помещении, то есть в БББ класса I, которые не подсоединены к системам вытяжки здания, или в боксах класса IIA1 или класса IIA2. БББ класса IIB1 пригодны для работы с небольшими количествами летучих химикатов и радионуклидов. Для работы со значительными количествами радионуклидов и токсичных химикатов необходим БББ класса IIB2, который также называется боксом с полной сменой отработанного воздуха.

**Таблица 8. Выбор бокса биологической безопасности (БББ) по виду необходимой защиты**

ВИД ЗАЩИТЫ	ВЫБОР БББ
Защита персонала, микроорганизмы групп риска 1-3	Класс I, класс II, класс III
Защита персонала, микроорганизмы группы риска 4, лаборатория, оборудованная боксом с резиновыми перчатками	Класс III
Защита персонала, микроорганизмы группы риска 4, лаборатория для работы в спецодежде	Класс I, класс II
Защита препарата	Класс II, класс III только в случае подвода ламинарного потока
Защита летучих радионуклидов/ химическая защита, малые количества	Класс IIB1, класс IIA2 при наличии клапанов снаружи
Защита летучих радионуклидов/ химическая защита	Класс I, класс IIB2, класс III

#### **Контрольные вопросы:**

1. Лабораторные оборудования.
2. Работа в боксах биологической безопасности.

## Лабораторное занятие 6

### Правильное использование пипеток и пипетирующих средств.

**Цель:** научить студентов правильному пользованию пипеток и пипетирующих средств.

**План занятия:**

1. Правильное использование пипеток и пипетирующих средств.

Автоматические пипетки. Эти устройства получили свое начало от микропипеток компании Eppendorf и использовались для дозирования объемов 10–200 мкл. К настоящему времени рабочие объемы возросли до 5 мл, поэтому термин «микропипетки» не всегда соответствует реальности, и это устройство называется по-разному: дозатор, автоматическая пипетка, пипетман и т.п. Только наконечники этих пипеток нуждаются в стерилизации, среди ограничений в использовании автоматических пипеток — длина наконечников, определяющая выбор используемых сосудов. Если стерильная жидкость забирается из контейнера с помощью автоматической пипетки, ее нестерильный корпус не должен касаться сторон контейнера. Реагенты объемом 10–20 мл могут быть дозированы на объемы от 5 мкл до 1 мл из универсального контейнера или на объемы 1–200 мкл из миниатюрного флакона. Для дозирования на объемы 100 мкл—1 мл можно использовать пробирки типа Eppendorf, но они требуют стерилизации.

Предполагается, что внутри автоматическая пипетка стерильна либо не производит перемещения воздуха, достаточного для заражения наконечников. Однако в некоторых ситуациях даже минимальная возможность заражения имеет значение. Например, если вы осуществляете серийное субкультивирование ростковой клеточной линии (в противоположность кратковременному эксперименту с клетками, которые в конечном счете будут взяты на анализ либо уничтожены, но не предполагают их размножение), безопасность и чистота клеточной линии становятся первостепенными, поэтому вы должны использовать либо обычные стеклянные пипетки с ватным фильтром, либо одноразовые пипетки, которые стерильны по всей длине, что является существенным при необходимости достичь необходимой точки в сосуде, из которой отбираются пробы. Если вы используете достаточно маленькие контейнеры, то можно избежать прикосновения нестерильных частей корпуса автоматической пипетки, поэтому ее использование допустимо при условии, что наконечник снабжен фильтром, препятствующим перекрестному заражению и минимизирующим микробную контаминацию. В противном случае вы рискуете получить микробное загрязнение от нестерильных частей автоматической пипетки или, что более значимо, перекрестное заражение из аэрозоля и жидкости, заброшенных в ствол этой пипетки.

**Контрольные вопросы:**

1. Правильное использование пипеток и пипетирующих средств.

## Лабораторное занятие 7

### Категорирование животных. Классификация животных-моделей.

**Цель:** ознакомить студентов с классификацией животных-моделей.

**План занятия:**

1. Категорирование животных.
2. Классификация животных-моделей.

*Категорирование животных.* Получение надежных и воспроизводимых результатов медико-биологического эксперимента можно достигнуть лишь при соблюдении стандартности всех его слагаемых и условий проведения. В этом смысле лабораторное животное является наиболее уязвимым звеном в системе медико-биологического эксперимента. Его состояние как живого объекта, зависит от воздействия многочисленных как экзогенных, так и эндогенных факторов, влияние которых далеко не всегда бывает явным и легко регистрируемым. Среди них, прежде всего, следует отметить факторы инфекционной и инвазионной природы. Причем различные, в том числе даже патогенные представители вирусной и бактериальной флоры, не всегда вызывают клинически явную картину заболевания. Часто они протекают в латентной форме или же в виде носительства. В настоящее время актуальность приобретает так называемая оппортунистическая, эндогенная инфекция, активизирующаяся при иммунодефицитных состояниях.

*Классификация животных-моделей.* Достижение современного уровня медико-биологического исследования возможно лишь при унификации всех факторов, воздействующих на организм лабораторных животных путем строгой стандартизации, как условий содержания, так и самих животных.

Введение в мировую практику требований системы GLP (Good Laboratory Practice) для проведения доклинических испытаний лекарственных веществ предъявило еще более жесткие условия к проблеме стандартизации животных, состоянию их здоровья.

Основой этих критериев является принцип недопустимости носительства ряда патогенных и условно-патогенных агентов инфекционной и инвазионной природы: вирусов, бактерий, паразитов. Во многих странах разработаны стандарты различных категорий качества животных по состоянию здоровья. Они включают перечень возбудителей, носительство которых исключается. Чем выше категория качества животного, тем больше перечень недопустимых агентов. Однако, стандарты различных стран не идентичны. Единой международной классификации лабораторных животных по категориям качества и соответствующих стандартов не существует. В связи с этим, животные, именуемые как SPF (Specific pathogen free), не имеют четкой характеристики качества, и, полученные из разных источников, могут значительно различаться по своему статусу. В последние годы отмечается явная тенденция к унификации критериев качества животных и создания единых стандартов. Примером могут служить разработки группы исследователей европейских стран: GV-SOLAS, FELASA.

Специалисты нашей страны совместно с зарубежными коллегами на основе мирового опыта также предприняли попытку создания требований к качеству лабораторных грызунов различных категорий, которые были приняты в 1989 г. На совместном совещании в Софии. Однако опыт работы по контролю состояния здоровья животных позволил видоизменить эти нормативы (Таблица ).

**Контрольные вопросы:**

1. Категорирование животных.
2. Классификация животных-моделей.

## **Лабораторное занятие 8**

### **Технология содержания лабораторных животных.**

**Цель:** ознакомить студентов с технологией содержания лабораторных животных.

**План занятия:**

1. Технология содержания лабораторных животных.
2. Основные правила содержания лабораторных животных.

Получение надежных и воспроизводимых результатов эксперимента с использованием лабораторных животных возможно только при соблюдении всех правил их содержания.

Основные правила содержания лабораторных животных

Лабораторным животным в питомнике и ЭБК должны быть обеспечены:

- полноценное кормление и уход;
- поддержание нормального состояния здоровья;
- содержание в соответствующих для каждого вида нормативных условиях;
- возможность удовлетворения физиологических и поведенческих потребностей;
- ежедневный контроль условий содержания;
- быстрое устранение недостатков и факторов, могущих повлечь за собой стресс и страдания животных.

В каждом помещении питомника и ЭБК рекомендуется содержать животных только одного вида и участвующих в одном исследовании, за исключением отдельных случаев, предусмотренных условиями эксперимента, на каждой клетке (боксе, вольере) должна быть этикетка с указанием данных о животном и другой специальной информацией.

Обслуживание одним работником животных разного вида в питомнике не допускается. В случае обслуживания одним рабочим небольших групп животных разных видов в ЭБК следует соблюдать следующую последовательность при работе: морские свинки, мыши, крысы, кролики. Такая последовательность обслуживания обусловлена чувствительностью лабораторных животных к появлению возможной инфекции.

### **Контрольные вопросы:**

1. Технология содержания лабораторных животных.
2. Основные правила содержания лабораторных животных.

## **Лабораторное занятие 9**

### **Мониторинг здоровья лабораторных животных.**

**Цель:** ознакомить студентов с проведением мониторинга здоровья лабораторных животных.

#### **План занятия:**

1. Мониторинг здоровья лабораторных животных.

Оценка качества лабораторных животных в процессе содержания и эксперимента должен включать в себя микробиологический и генетический контроль, контроль внешней среды, заключающийся в мониторинге температуры, влажности, освещения, шума и т.д., и контроле питания.

Использование животных низкого качества может привести к необходимости увеличения количества животных для проведения эксперимента и даже полностью исказить результаты опыта.

*Контроль качества животных и учет.* В соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Совет Европы, Страсбург, 2004 г.) следует придерживаться нормативов содержания лабораторных животных.

В особых случаях, для молодых или голых особей может требоваться содержание при более высоких температурах. Все ввозимые в страну животные должны пройти карантин согласно национальному законодательству. Сроки карантина в условиях лаборатории обычно определяются соответствующим лицом исходя из обстоятельств, этим лицом обычно является назначенный учреждением ветеринар.

Контроль качества должен проводиться на основе использования стандартных процедуры обращения с животными, касающихся размещения, питания, физического обращения, ухода и контроля состояния здоровья. Должны учитываться следующие факторы: размер клеточного оборудования, количество животных в одной клетке, методы их удерживания и перемещения, а также используемая система разведения. Другой важной переменной для качества животных является кормление. Основные показатели кормления должны быть проанализированы и зафиксированы для каждого эксперимента.

Дополнительно следует проверять корм на наличие химического загрязнения.

Микробиологический статус животного также является определяющим для результатов эксперимента. Агенты, в обычных условиях не вызывающие заболеваний, могут вызвать проблемы в ходе проведения эксперимента из-за стресса, испытываемом животными. Другие агенты, как например, лактатдегидрогеназа вируса мышей может не вызвать заболевания в процессе

эксперимента, но исказить его результаты. Учитывая это, желательно использовать как можно более «чистых» лабораторных животных, с известным микробиологическим статусом.

Генетический профиль лабораторных животных может быть крайне важным для успеха эксперимента. Учреждения, занимающиеся лабораторным животноводством, должны уделять особое внимание генетической чистоте животных. В рамках этих учреждений должны действовать программы по предотвращению генетического загрязнения линий, по вине человека или в результате случайного спаривания, и раннему выявлению мутаций. Каждая линия имеет особый генетический профиль, определить который можно с помощью биохимических, иммунологических и морфологических маркеров. Желательно проводить предварительный генетический контроль до начала эксперимента.

Важно вести письменный учет процедур, проводимых с животными; обычно для этих целей заводится специальный журнал. В журнал должны заноситься записи о ежедневных наблюдениях, проводимых процедурах и другая текущая информация.

**Контрольные вопросы:**

1. Мониторинг здоровья лабораторных животных.

## **Лабораторное занятие 10**

### **Микробиологический мониторинг. Сравнительные методы микробиологической диагностики.**

**Цель:** ознакомить студентов с микробиологическим мониторингом и методами микробиологической диагностики.

**План занятия:**

1. Микробиологический мониторинг.
2. Сравнительные методы микробиологической диагностики.

Микробиологический статус животного также является определяющим для результатов эксперимента. Микробиологический контроль лабораторных животных посредством ПЦР-реакций, посева флоры на питательных средах, серологических и микроскопических исследований, преследует обычно 2 цели: диагностику заболеваний и контроль микробиологического статуса.

Основой диагностики заболевания является микробиологическое обследование, но в ходе ее также учитывается и другая информация, касающаяся клинической картины, репродуктивных функций и патологий. Образцы микробов и пробы, которые необходимо взять у животных, определяются соответственно клиническими и патологическими отклонениями. Время проведения контроля не фиксировано и зависит от проявления заболеваний.

Микробиологический мониторинг представляет собой процесс, призванный периодически подтверждать неизменность микробиологического

статуса животного или группы животных по сравнению с ожидаемыми показателями.

В этих целях у случайно выбранных животных из общей популяции берутся пробы для выявления определенных видов микробов с целью выяснения микробиологического статуса животных. Таким образом, эти исследования могут проводиться с целью обнаружения как патогенов, так и непатогенов, то есть микробов, являющихся частью нормальной флоры. В микробиологический контроль необходимо также включать обследование на наличие паразитов.

Количество животных, у которых необходимо взять пробы для микробиологического контроля, зависит от уровня инфицирования популяции. Например, в случае, если показатель инфицирования превышает 50%, для обнаружения возбудителя достаточно взять анализы у нескольких животных, но, если уровень инфицирования ниже 20%, возбудителя можно найти, только обследовав, как минимум, 20 особей. В случае, если искомые патогены обладают средними и высокими показателями инфицирования 20-50%, способными повлиять на результаты исследования, достаточно обследовать 10 особей.

**Контрольные вопросы:**

1. Микробиологический мониторинг.
2. Сравнительные методы микробиологической диагностики.

## **Лабораторное занятие 11**

### **Карантин, адаптация и распределение животных, находящихся в эксперименте.**

**Цель:** ознакомить студентов с карантином, адаптацией и распределением животных, находящихся в эксперименте.

**План занятия:**

1. Карантин, адаптация и распределение животных, находящихся в эксперименте.

Лабораторные животные, приобретенные для экспериментальных исследований, должны пройти карантин, адаптацию, осмотр ветврача, и только после этого на них будет возможно проведение исследований.

*Прием и первоначальная оценка животных.* Животные поступают в корпус биомедицинских исследований, заранее обработанные специальным дезраствором, например, 0,5% раствором «Глютекса» и УФ.

Картонные контейнеры обрабатываются со всех сторон 0,5% раствором «Глютекса» или «Аэродезином 2000». Персонал, получающий животных, переодевается в стерильную одежду: куртка, брюки, шапочка, маска, перчатки. Обработанные контейнеры заносятся в комнату с передаточным шлюзом, где вскрываются. Животные пересаживаются в чистую проавтоклавированную клетку, которая передается через передаточный шлюз. С обратной стороны (в «чистой» зоне), животные пересаживаются в

подготовленные клетки содержания и помещаются в «карантинную» комнату (комната содержания животных, отведенная для адаптации). Разные виды животных помещаются в разные комнаты.

Разные партии животных по возможности также содержатся в разных комнатах.

**Контрольные вопросы:**

1. Карантин, адаптация и распределение животных, находящихся в эксперименте.

## **Лабораторное занятие 12**

### **Уход и содержание лабораторных организмов.**

**Цель:** ознакомить студентов с уходом и содержанием лабораторных организмов..

**План занятия:**

1. Уход и содержание лабораторных организмов.

Получение надежных и воспроизводимых результатов эксперимента с использованием лабораторных животных возможно только при соблюдении всех правил их содержания.

*Основные правила содержания лабораторных животных*

Лабораторным животным в питомнике и ЭБК должны быть обеспечены:

- полноценное кормление и уход;
- поддержание нормального состояния здоровья;
- содержание в соответствующих для каждого вида нормативных условиях;
- возможность удовлетворения физиологических и поведенческих потребностей;
- ежедневный контроль условий содержания;
- быстрое устранение недостатков и факторов, могущих повлечь за собой стресс и страдания животных.

В каждом помещении питомника и ЭБК рекомендуется содержать животных только одного вида и участвующих в одном исследовании, за исключением отдельных случаев, предусмотренных условиями эксперимента, на каждой клетке (боксе, вольере) должна быть этикетка с указанием данных о животном и другой специальной информацией.

Обслуживание одним работником животных разного вида в питомнике не допускается. В случае обслуживания одним рабочим небольших групп животных разных видов в ЭБК следует соблюдать следующую последовательность при работе: морские свинки, мыши, крысы, кролики. Такая последовательность обслуживания обусловлена чувствительностью лабораторных животных к появлению возможной инфекции.

**Контрольные вопросы:**

1. Уход и содержание лабораторных организмов.

## Лабораторное занятие 13

### Устройство вивариев. Утилизация отходов.

**Цель:** ознакомить студентов с устройством вивариев и способами утилизации отходов.

**План занятия:**

1 Устройство вивариев. Утилизация отходов.

*Виварий* для лабораторных животных должен иметь основное помещение для животных, моечную (с боксом, сушильными и стерилизационными установками), кухню для приготовления корма с одним, по крайней мере, столом, оборудованным для приготовления корма, и холодильником для скоропортящихся продуктов, кладовую, операционную, гардероб и санитарное помещение для обслуживающего персонала. Помещения должны быть чистыми, стены и полы легко дезинфицируемыми. Запасы корма следует хранить в специальных помещениях. В местах содержания опытных животных желательно иметь гигрометр и термометр.

Мышей, крыс, хомяков и морских свинок в период опыта рекомендуется содержать в стеклянных банках с крышкой из проволочной сетки или перфорированного листового железа. Это облегчает наблюдение за ними, а банки легко чистить и дезинфицировать. Можно содержать животных в металлических клетках, которые также легко дезинфицировать.

В качестве подстилки применяют материалы, которые адсорбируют влагу и могут быть использованы животными для постройки гнезда: стружку для мышей, крыс, хомяков, морских свинок, хорьков, кур; опилки для крупных мышей, крыс, хомяков, хорьков, кур; солому для хомяков, морских свинок, кроликов, собак, кур; мякину для мышей, крыс; сено для мышей, крыс, хомяков, хорьков, кур; песок для кур. Следует использовать такую подстилку, которая образует как можно меньше пыли, так как последняя может привести к заболеванию органов дыхания. Любую подстилку необходимо предварительно стерилизовать при 100 °С в течение 30 мин.

Помещения для лабораторных животных периодически дезинфицируют, особенно перед размещением новой партии животных. Это относится и к предметам ухода за животными (лопаты, скребки, метелки и др.), которые соприкасаются с навозом и различными отбросами из помещения. После окончания каждого опыта клетки обязательно обрабатывают дезинфицирующими растворами, чему должна предшествовать чистка как клеток, так и помещения.

Посуду для корма и воды ежедневно смачивают дезинфицирующим раствором, после чего моют и споласкивают чистой водой. Помещения обрабатывают 1% раствором едкого натра, который используют в течение суток. Дезковрики пропитывают свежим раствором каждые 2 дня. Для дезинфекции предметов ухода, мытья полов и посуды рекомендуется использовать 3% раствор хлорамина, который должен быть применен в

течение 2 ч. В виварии необходимо уничтожить вредителей: мух, комаров, блох, власоедов, клещей, вшей, муравьев, мышей, крыс.

Лабораторных животных размещают так, чтобы, с одной стороны, было обеспечено функционирование всех систем организма в пределах физиологической нормы, с другой - исключено взаимное перезаражение и распространение инфекции за пределы вивария. Животных содержат в виварии с учетом их физиологической потребности в освещенности и температуре. Так, мышам, крысам нужны полумрак и температура воздуха около 20 °С, морским свинкам, кроликам и курам - дневной свет и температура в пределах 16-23, 14-18 и не ниже 0 °С соответственно. Плотность посадки должна составлять примерно 1 г массы лабораторных животных на 1 см<sup>2</sup> дна клетки. Животных обеспечивают регулярным и полноценным кормлением и постоянно питьевой водой.

Если виварий один, то зараженных животных содержат изолированно от здоровых и с последних начинают уборку помещения и кормление. Для ухода за зараженными животными используют отдельный инвентарь и кормушки. Лучше иметь два вивария: для содержания здоровых и зараженных животных.

Обслуживающий персонал при работе в виварии пользуется спецодеждой: халатом, резиновыми перчатками, фартуком, непромокаемой обувью. В виварии ежедневно дезинфицируют инвентарь и проводят влажную уборку с применением дезинфицирующих веществ. По окончании эксперимента клетки дезинфицируют, погибших животных обезвреживают сжиганием в печах или автоклавированием.

В группу для проведения опыта подбирают животных с одинаковыми показателями массы, температуры, состава крови и т. д. От этого в значительной степени зависит успех выделения, титрования и пассирования вируса. При этом учитывают восприимчивость животных к различным вирусам. Отобранных животных метят, распределяют по банкам или клеткам, отмечают дату постановки опыта, его номер, заражающую или профилактическую дозу препарата и, если необходимо, как мечены животные. Последнее важно, когда в одной банке или клетке находятся животные нескольких групп.

Выписывая из питомника беременных животных, особенно мышей, следует учитывать, что самки первое потомство нередко уничтожают. Поэтому лучше брать животных, беременных 2-3-й раз. Беременных белых мышей и крыс следует брать в виварий не позже чем за 2-3 дня до родов, а кроликов и морских свинок - за 15-20 дней. Перемещение животных в более поздние сроки беременности приводит к аборту.

Для предупреждения каннибализма и аборта беременных мышей размещают по 2-3 в банку, а белых и хлопковых крыс, морских свинок и кроликов - по одной. Клетки для морских свинок должны быть размером 0,3 x 0,5 м, а для кроликов - 0,75 x 1,0 м. Маток, проявляющих каннибализм, надо немедленно удалять из гнезда. На каждую матку (белую мышь, белую крысу) должно приходиться не более

10-12 новорожденных Большая нагрузка способствует каннибализму. При проведении с молодыми животными длительных опытов (особенно зимой) в пищу мышей необходимо добавлять витаминизированный рыбий жир, а в рацион хлопковых и белых крыс - молоко и мясо.

Проявлению каннибализма в значительной мере способствуют посторонние запахи, приобретаемые новорожденными в ходе манипулирования с ними экспериментатора. Новорожденных животных следует брать только прокипяченным пинцетом. Экспериментатор должен работать в перчатках, с которых смыты следы антисептика (йода, фенола и др.). Заражать новорожденных животных лучше на весу или на толстом слое стерильной фильтровальной бумаги.

В группу для проведения опыта подбирают животных с одинаковыми показателями массы, температуры, состава крови и т. д. (табл. 1-3). От этого в значительной степени зависит успех выделения, титрования и пассирования вируса. При этом учитывают восприимчивость животных к различным вирусам. Отобранных животных метят, распределяют по банкам или клеткам, отмечают дату постановки опыта, его номер, заражающую или профилактическую дозу препарата и, если необходимо, как мечены животные. Последнее важно, когда в одной банке или клетке находятся животные нескольких групп.

*Устройство вивариев.* Корпус, в котором содержат лабораторных животных, должен быть специально спланированным, в том числе и для проведения исследований на животных. В корпусе должна быть: двухкоридорная барьерная зона содержания животных, лабораторные и технологические помещения. Комнаты для содержания лабораторных животных располагают в «чистой» зоне, должна быть зона между «чистым» и «грязным» коридорами и комнаты для содержания лабораторных животных в краткосрочных экспериментах в конвенциональной зоне. Комнаты содержания лабораторных животных отделяют от лабораторных и технологических помещений системой коридоров и тамбуров.

Комнаты содержания животных должны иметь сообщение с «чистой» и «грязной» зонами. Полы покрывают композицией повышенной износостойкости. Стены выполняют специальными стеновыми панелями. Потолок – подвесной, алюминиевый в который встраивается решетка из нержавеющей стали приточной вентиляции, и светофильтры из матового стекла. Стыки стеновых панелей внутренних стен провариваются. Примыкание поверхности пола к стенам выполняется монолитно. Стыки потолочных панелей герметизируются универсальным герметиком. Для защиты поверхности стен от механических повреждений устанавливают ограничители (бампера).

Комнаты краткосрочного содержания животных в экспериментах, а так же «чистый» и «грязный» коридоры должны соответствовать выше описанным требованиям.

После окончания длительного исследования для эвтаназии и некропсии, а также для проведения кратковременных исследований животные транспортируются из комнат содержания барьерной зоны в процедурные комнаты. Транспортировка животных по коридорам общего пользования осуществляется в клетках содержания на стеллажах или передвижных тележках.

Двери в «чистый» и «грязный» оборудуются замками и медицинскими ручками.

В комнатах содержания животных водопровод и дренаж отсутствуют.

*Утилизация отходов.* Подстилка и мусор. Клетки с грязной подстилкой вывозятся из комнат содержания животных в «грязный» коридор и далее в моечный блок, где подстил ссыпается вручную в бумажные мешки для мусора. Закрытые мешки хранятся в специальном помещении и вывозятся на сжигание в крематорий один раз в неделю.

*Трупы животных.* Трупы животных помещаются в полиэтиленовые пакеты и хранятся в морозильной камере (-20оС) в комнате сбора отходов. Трупы, подлежащие вскрытию, помещаются в холодильник на +2 - +8 не более чем на 12 часов. Ежедневно трупы вывозятся на сжигание в крематорий.

Вредные/опасные отходы собираются и хранятся до вывоза на уничтожение в комнате сбора отходов согласно инструкциям отдела охраны труда и техники безопасности с соблюдением правил хранения соответствующих групп реактивов (использование герметичных промаркированных емкостей для отдельных групп отходов, вытяжных шкафов для летучих токсичных отходов). Вывоз отходов может осуществляться на промежуточный склад ежедневно, а затем со склада утилизироваться централизованно специализированной техникой. Факт проведения данных мероприятий должен фиксироваться в лабораторном журнале, который должен храниться в архиве ЭБК не менее 3 лет после окончания исследования.

#### **Контрольные вопросы:**

1. Устройство вивариев. Утилизация отходов.

## **Лабораторное занятие 14**

### **Подготовка животных к опыту и организация эксперимента.**

**Цель:** ознакомить студентов с способами подготовки животных к опыту и организацией эксперимента.

#### **План занятия:**

1. Подготовка животных к опыту и организация эксперимента.

В подготовительный период постановки токсикологического (фармакологического) эксперимента производится подбор и подготовка животных, прошедших карантин и клиническое обследование. Продолжительность периода определяется задачами исследования, выбором

объекта научного эксперимента, обстановкой в которой будут проводиться опыты и другими условиями. В течение этого периода животных следует приручать к исследователю и проведению простейших манипуляций.

Исходный период постановки эксперимента условно подразделяют на этапы:

- подбор требующихся по условиям опыта животных;
- наблюдение (карантин) и выбраковка животных;
- определение исходных величин исследуемых показателей (фон);
- выбраковка животных с ярко выделяющимися величинами исследованных (фоновых) показателей;
- распределение животных по группам;
- статистическая проверка отсутствия межгрупповых различий.

#### **Контрольные вопросы:**

1. Подготовка животных к опыту и организация эксперимента.

## **Лабораторное занятие 15**

### **Биобезопасность при работе с лабораторными животными.**

**Цель:** ознакомить студентов с содержанием лабораторных организмов.

#### **План занятия:**

1. Биобезопасность при работе с лабораторными животными.

Большое значение в получении лабораторных животных высокого качества и проведении экспериментов на них имеет подготовка персонала. Необходимо уделять особое внимание тому, чтобы было достаточное количество людей, обслуживающих животных в питомниках, экспериментально-биологических клиниках (вивариях), проинструктированных правильному обращению с животными. Кроме соблюдения правил гуманного обращения с животными необходимо соблюдать и правила личной безопасности.

*Биобезопасность при работе с лабораторными животными.* Содержание лабораторных животных в питомниках и ЭБК создает потенциальную возможность взаимного инфицирования человека и животных (антропозоозы), а также перекрестного инфицирования животных, во избежание чего необходимо строгое соблюдение правил личной гигиены работников.

Сотрудники, работающие с лабораторными животными, должны ежегодно проходить медицинское обследование по правилам, действующим для пищевой промышленности, носители патогенной для животных флоры, включая антропозоозы, как и больные люди, к работе с животными не допускаются.

Рекомендуется проводить раз в 3 года медицинское обследование персонала, сходное с проводимым при приеме на работу, включающее сдачу образцов сыворотки.

Персонал питомника и ЭБК должен быть обеспечен требуемым количеством спецодежды, санитарная одежда должна быть персонально маркирована. Ее количество на одного работника «чистой» зоны в питомниках и ЭБК барьерного типа должно позволять стирку не реже, чем через 1 день и ежедневное автоклавирование. Комплект спецодежды для персонала предбарьерной (конвенциональной) зоны имеет тот же набор одежды, но в количествах, обеспечивающих возможность стирки не реже двух раз в неделю. Необходим утвержденный обязательный перечень спецодежды для работников «чистой» и «грязной» зон. Необходимый перечень спецодежды, а также комплектов первой помощи приведены в Руководстве по лабораторным животным и альтернативным моделям.

Вход персонала в «чистую» зону помещения барьерного типа производится через санпропускник, работник снимает одежду, кольца, цепочки, серьги и др. и оставляет их в шкафу «грязной» раздевалки санпропускника, тщательно принимает душ, используя мыло, мочалку, банную щетку, вытирается досуха полотенцем и одевается в полный комплект стерильной одежды. Очки протираются дезраствором. В течение рабочего дня работник из чистой зоны не выходит. В случае экстренного выхода процедура входа в «чистую» зону через санпропускник полностью повторяется заново. Таким же образом входят в чистую зону сотрудники, выполняющие эксперимент на животных и при необходимости технические работники. Рабочий инструмент подвергается автоклавированию или дезинфекции и проводится через шлюзы.

**Контрольные вопросы:**

1. Биобезопасность при работе с лабораторными животными.