



Европейска
комисия

С грижа за животните, в стремеж към по-добра наука

ДИРЕКТИВА 2010/63/ЕС
ОТНОСНО ЗАЩИТАТА НА ЖИВОТНИТЕ, ИЗПОЛЗВАНИ
ЗА НАУЧНИ ЦЕЛИ



**РАМКА ЗА ОЦЕНКА НА
ТЕЖЕСТТА НА ПРОЦЕДУРИТЕ**

Нито Европейска комисия, нито което и да е лице, действащо от името на Комисията, носят отговорност за начина, по който би могла да бъде използвана съдържащата се в настоящата публикация информация.

Люксембург: Служба за публикации на Европейския съюз, 2018 г.

© Европейски съюз, 2018 г.

Повторното използване е разрешено, при условие че се посочи източникът.

Политиката на повторно използване на документите на Комисията е регламентирана с Решение 2011/833/ЕС (ОВ L 330, 14.12.2011 г., стр. 39).

За използването или възпроизвеждането на снимки или други материали, за които ЕС не е носител на авторското право, трябва да се иска разрешение направо от носителите на това право.

Print ISBN 978-92-79-80583-7 doi:10.2779/9141 KH-01-18-213-BG-C

PDF ISBN 978-92-79-80548-6 doi:10.2779/17122 KH-01-18-213-BG-N

Таблица на съдържанието:

Работен документ относно рамка за оценка на тежестта..... 1-23

Примери за илюстриране на процеса на класификация на тежестта,..... 25-102
ежедневната оценка и оценката на действителната тежест

**Национални компетентни органи за прилагането на Директива 2010/63/ЕС
относно защитата на животните, използвани за научни цели**

Работен документ относно рамка за оценка на тежестта

Брюксел, 11—12 юли 2012 г.

Комисията сформира експертна работна група (ЕРГ) за оценката на тежестта на процедурите с цел да се улесни прилагането на Директива 2010/63/ЕС относно защитата на животните, използвани за научни цели. Всички държави членки и организации на основните заинтересовани страни бяха поканени да предложат експерти, които да участват в работата.

ЕРГ за оценката на тежестта проведе две срещи: през декември 2011 г. с насоченост към генетично изменените животни и през май 2012 г., когато беше обсъдена обща рамка за оценяване на действителната тежест, понесена от животните по време на процедурите.

Настоящият документ е резултат от работата на ЕРГ по време на двете срещи, проведените обсъждания с държавите членки, както и на правния принос от страна на Комисията относно разбирането на рамката за оценка на тежестта, нейните компоненти, участниците в нея, както и работните инструменти и методи. Документът бе одобрен от националните компетентни органи за прилагането на Директива 2010/63/ЕС на тяхната среща, проведена на 11—12 юли 2012 г.

Непоемане на отговорност:

Предназначението на настоящия документ е да служи като насоки за подпомагане на държавите членки и други засегнати от тази директива страни да достигнат до общо разбиране на включените в директивата разпоредби. Всички коментари следва да се разглеждат в контекста на Директива 2010/63/ЕС относно защитата на животните, използвани за научни цели.

Единствено Съдът на Европейския съюз има право да тълкува правото на ЕС с правно обвързваща сила.

Съдържание:

Съответните членове от Директива 2010/63/ЕС	3
Общ контекст	3
Общи съображения за оценка на тежестта.....	4
Съображения преди изследването.....	6
Показатели за тежестта	6
<i>Категории от високо равнище</i>	7
<i>Фактори, които следва да бъдат взети предвид при оценката на действителната тежест</i>	8
Как да се гарантира последователност при оценката и определянето на действителната тежест.....	11
<i>Разработване на специфична за процедурата таблица за оценка</i>	11
<i>Последователност при оценката на действителната тежест</i>	12
Кой следва да даде принос за оценката на действителната тежест?	13
Инструменти за наблюдение, средства и други съображения	14
Приложение I - Речник на клиничните наблюдения	16
Приложение II - Основна литература, насоки и онлайн ресурси относно оценяването на хуманното отношение към животните, подложени на научни процедури	20

Съответните членове от Директива 2010/63/ЕС

- **Член 4, параграф 3** *„Държавите членки гарантират облекчаване на развъждането, настаняването и грижите, както и на методите, използвани при процедурите, като се премахва или намалява до минимум всяка възможна болка, страдание, дистрес или трайно увреждане на животните.“*
- **Член 15, параграф 1** *„Държавите членки осигуряват класифицирането на всички процедури като „с необратим край“, „леки“, „средни“ или „тежки“ на индивидуална основа, като се използват критериите за определяне съгласно приложение VIII.“*
- **Член 16, параграф 1, буква г)** *„то [повторното използване] е в съответствие с ветеринарната консултация, като се взема предвид преживяното от съответното животно.“*
- **Член 54, параграф 2** *„Държавите членки събират и правят публично достъпна на годишна база статистическа информация относно използването на животни при процедури, включително информация относно действителната тежест на процедурите и относно произхода и видовете на използваните при процедури нечовекоподобни примати...“*

Общ контекст

Директива 2010/63/ЕС относно защитата на животните, използвани за научни цели, изисква да се изготви прогнозна оценка на тежестта на всяка процедура в даден проект (член 15) и да се определи класификацията на тежестта, която може да бъде „с необратим край“, „лека“, „средна“ или „тежка“. В приложение VIII се предоставят насоки относно факторите, които трябва да бъдат взети под внимание при разглеждането на прогнозната тежест, и се предоставят някои примери за всяка категория тежест.

В член 54 относно отчетността се изисква действителната тежест на болката, страданието, дистреса или трайното увреждане, понесени от животното, да бъдат докладвани с цел събиране на статистическа информация (за разлика от прогнозната оценка или предвиждането за тежестта, направени при оценката на проекта). Освен това действителната тежест на всяка от предишните процедури ще бъде основно съображение при определяне на това дали дадено животно може или не може да бъде използвано повторно в допълнителни процедури (член 16).

Тези мерки предоставят възможности за подобряване на качеството на научните изследвания и хуманното отношение към животните чрез прогнозен преглед на предложенията за проекти, а чрез включване на действителното страдание, понесено от животните, следва да се осигури по-голяма прозрачност и разбиране на въздействието на научните процедури върху хуманното отношение към животните.

Основните ползи от прогнозната оценка, наблюдението, оценяването и отчитането на действителната тежест включват

- Възможности, по-специално за прилагане на мерки за облекчаване и намаляване на страданието, въпреки че бъдещите дискусии обикновено също ще осигурят възможност да се прецени дали използването на животни е необходимо, или не (заместване), и дали проектът за изследването е подходящ, за да се сведе до минимум използването на животни (намаляване).
- Подобряване на хуманното отношение към животните, напр. ако страданието е разпознато и облекчено на по-ранен етап.
- Подобряване на прозрачността, тъй като статистическите данни следва да отразяват по-добре действителните разходи, свързани с хуманното отношение към животните.
- Подобряване на комуникацията между лицата, които отговарят за използването, грижите за животните и тяхното наблюдение.
- Принос за ретроспективна оценка на проекта, когато се извършва такава (член 39).
- Подобряване на качеството на научните данни вследствие на по-добри резултати в областта на хуманното отношение към животните.
- Повишаване на знанията относно оценяването на тежестта и клиничните признаци, което ще насърчи по-голяма последователност при оценките — при условие че подходите и резултатите се разпространяват, напр. чрез списания, дискуссионни групи и срещи.
- Принос към курсове за обучение за научни изследователи, ветеринарни техници и ветеринарни лекари на лабораторни животни, ако резултатите се използват за предоставяне на примери.
- Основана на доказателства информация, която може да се използва при прогнозни оценки на ползите и вредите за подобни бъдещи проекти.

Общи съображения за оценка на тежестта

Разглеждането на тежестта в рамките на дадена процедура следва да бъде **непрекъснат процес**, който започва с първоначалния проект за изследването, преминава през специфичното за изследването ежедневно наблюдение на животните през целия проект до оценката на „действителната“ тежест при приключване на изследването, което предоставя възможности за откриване на начини за допълнителни облекчения при бъдещи изследвания.

ОЦЕНКАТА НА ТЕЖЕСТТА – НЕПРЕКЪСНАТ ПРОЦЕС



При използването на такъв подход съществува по-голяма възможност да се гарантира, че принципите на заместване, намаляване и облекчаване се вземат под внимание и се прилагат през цялото време и че комуникацията между всички участващи лица и последователността ще бъдат подобри.

Ефективната оценка на тежестта изисква

- „Екипен“ подход с принос от лица с различни експертни познания, опит и приоритети, напр. научни изследователи, ветеринарни техници и персонал, грижещ се за животните, наблюдаващ ветеринарен лекар.
- Добро планиране.
- Подходящо продължаващо образование и обучение на целия участващ персонал.
- Системи за ежедневна оценка на тежестта, които са адаптирани по подходящ начин към видовете, щамата и проекта, включително информирани и структурирани наблюдения на животните на подходящи интервали (напр. нарастваща честота по време на процедурите и след тях).
- Съдържащи подробна информация ефективни протоколи за оценяване на поведението и клиничните признаци.
- Анализ на наблюденията, за да се направи информирана оценка на естеството и степента на страдание.

- Осъзнаване на тежестта на всяка процедура и на това какви действия трябва да се предприемат, ако тази тежест бъде достигната или надвишена.
- Последователен подход за цялостни оценки относно действителното страдание (леко, средно, тежко) за целите на статистическата отчетност.
- Обмисляне на това доколко ефективно се прилагат принципите на заместване, намаляване и облекчаване и дали могат да се направят подобрения за бъдещи изследвания.

Съображения преди изследването

Процесът, чрез който да се гарантира, че тежестта е сведена до минимум по време на научноизследователските процедури, започва на **етапа на проектиране**, когато се преценява дали е необходимо и оправдано, или не използването на живи животни, за да се отговори на научните цели.

- Когато използването на живи животни е необходимо и оправдано е важно да се гарантира, че е избран подходящ модел и че проектът за изследването е стабилен.
- Всички аспекти на изследването, които могат да причинят болка, страдание, дистрес или трайно увреждане, следва да бъдат установени и да се обмисли как техните въздействия могат да бъдат сведени до минимум, например чрез проверка в литературата, консултация с колеги, ветеринарни техници, ветеринарен лекар и структурата за хуманно отношение към животните, ако е това е целесъобразно.
- Препоръчаната класификация на прогнозната тежест, определена за процедурите, следва да се основава на най-високата очаквана тежест за всяко подложено на изследване животно.
- Следва да се разработи план за наблюдение на животните, който е адаптиран към изследването. Стандартизирана терминология, която може да бъде разбрана от всички лица, участващи в изследването, ще подобри последователността при отчитането и тълкуването.
- Важно е да се гарантира, че има достатъчен обучен и компетентен персонал, който да е на разположение за провеждане на изследването, за наблюдение и полагане на грижи за животните.

Показатели за тежестта

Има поведенчески и клинични признаци, които могат да се използват за оценка на тежестта на процедурите „в самата клетка“ (или вана, кошара и т.н.). Терминологията, използвана за описанието им, следва да бъде разбираема за всички, които участват в използването, наблюдението и полагането на грижи за животните. От съществено значение за всяка система за оценка на тежестта е правилното разбиране на

нормалното здравословно състояние, поведението и статуса на видовете от гледна точка на хуманното отношение към тях (щама, когато е приложимо), които се наблюдават.

Целта следва да бъде:

- постигане на възможно най-добро качество на живот за животните;
- гарантиране, че всяко страдание в резултат на научните процедури е признато и
- сведено до минимум, но

продължава да бъде в съответствие с научните цели.

Всяка система за оценка следва ефективно да открива отклонения от нормалното здравословно състояние на животните и хуманно отношение към тях, което позволява на наблюдателя да записва и предава ясна и последователна оценка за всяко животно.

За определяне на протокола за оценка на тежестта може да бъде използван опростен йерархичен подход, който е адаптиран по подходящ начин към видовете, щама, индивидите и процедурата. Процесът за определяне на протокол за оценка в самата клетка следва да установява всички неблагоприятни последици, които могат да настъпят по време на преживяното от животното, включително настаняване, отглеждане, грижи и манипулации, както и неблагоприятни последици вследствие на научноизследователските процедури и техните последици. При разглеждането на всички тези неблагоприятни последици следва да се определят показатели, които могат да бъдат използвани, за да се направи ефективна оценка на благосъстоянието на животното в самата клетка. Тези показатели следва да бъдат адаптирани към видовете, щама и прилаганите експериментални процедури. Показателите също така следва да бъдат лесни за разбиране, идентифициране и записване по последователен начин. Важно е обаче да се гарантира, че също така има възможност за установяване и записване на всички неочаквани неблагоприятни последици, например под формата на свободен текст.

Категории от високо равнище

По-долу е включен набор от всеобхватни категории от „високо равнище“, които се прилагат за всички видове като отправна точка за изготвянето на подробен списък със специфични показатели за всяка процедура или програма за полагане на грижи за животните. Целта е да се изготви специфичен за всяко изследване списък с достатъчно показатели, които да сведат до минимум риска от пропускане на признаци на страдание, без да се изработва прекалено сложна система, която ще бъде ненужно бюрократична и времеемка.

Категориите от високо равнище са:

- външен вид
- телесни функции

- жизнена среда
- поведение
- специфични за процедурата показатели
- свободни наблюдения (други свързани наблюдения).

Показателите в рамките на всяка от тези категории могат да бъдат адаптирани към всички видове. Те следва да се използват за изготвяне на списък от наблюдавани характеристики, които могат да бъдат оценени от подходящо обучено лице с цел да се прецени като цяло здравният статус на животното и хуманното отношение към него.

Тези показатели следва да бъдат обсъдени и избрани във връзка с лицето(ата), отговорно(и) за надзора на хуманното отношение към животните, и структурата за хуманно отношение към животните, ако това е целесъобразно. След това показателите следва да се използват за разработване на специфични за изследването в самата клетка системи за поддържане на клинични регистри за ежедневно наблюдение, следене и оценка.

В приложение I е даден пример за това как тези категории от високо равнище могат да бъдат допълнително подразделени и използвани за разработване на подходящи критерии за наблюдение чрез използване на обща описателна терминология.

В приложение II се предоставя информация относно насоки и онлайн ресурси, които могат да помогнат при разработването на подходящи оценки за хуманно отношение към животните, подложени на научни процедури.

Фактори, които следва да бъдат взети предвид при оценката на действителната тежест

Важно е да се отбележи, че в зависимост от конкретната ситуация редица елементи могат да имат положително или отрицателно въздействие върху тежестта и че трябва да бъдат взети под внимание междувидовите различия.

Оценката на действителната тежест следва да бъде предприета на индивидуална основа за всеки отделен случай, като се използват резултатите от наблюденията, установени по време на ежедневното наблюдение на животните. Когато това е възможно и целесъобразно, могат също така да се използват допълнителни параметри, които се изискват за целите на изследването. Например ненаблюдаеми показатели (като телесна температура, телесно тегло, биохимични параметри или биотелеметрични данни като сърдечен пулс) също могат да бъдат необходими за изследването и следва да бъдат взети под внимание при оценката на тежестта, ако те могат да осигурят допълнителна значима информация.

Действителната тежест, която да бъде отчетена за отделното животно, следва да бъде най-високото равнище, изпитано по време на процедурата, а не да се основава на тежестта в края на процедурата. Освен това оценката не трябва да се разглежда като

прост процес на наслагване, напр. даден брой леки процедури = средна тежест. Оценката следва да се основава на общата оценка на преживяното от животното от началото до края на процедурата.

Списъкът по-долу предоставя примери за елементите, които трябва да бъдат разгледани и претеглени при оценяване на действителната тежест.

Процедура, техника

- Хирургична / нехирургична.
- Равнище и продължителност на ограничаването.
- Въздържане от аналгезия/анестезия, когато едната от тях или двете в противен случай биха били необходими.
- Нов модел или процедура.
- Елементи на жизнената среда (включително настаняване и ограничения по отношение на храна/вода).
- Стрес /дистрес.
- Повторни процедури и интервали между тях (също така трябва да се вземе под внимание честотата и комбинацията от интервенции „под прага“).
- Повторно използване или продължително използване.

Видове, щам, етап на развитие, предишен опит

- **Това следва да бъде основно съображение: необходимо е да се разбира биологията и поведението на видовете и щамата (и понякога на индивида), за да може да се предскаже и ефективно да се оцени тежестта.**
- **Видове и щам.**
- Произход на животното, напр. отгледано специално за целта, неопитомено или диво.
- Набавяне (включително предишни условия за настаняване) и транспортиране.
- Генотип, фенотип, пол, възраст, имунен статус.
- Естествено поведение и биология (напр. относителната важност на различните сетива, напр. зрението за приматите и обонянието за гризачите, както и как тези сетива могат да бъдат засегнати в лабораторна среда).
- Самостоятелно/групово настаняване — обосновка за самостоятелно настаняване на социални животни или разделянето им от установени групи в краткосрочен или дългосрочен план.
- Денонощни ритми, напр. въздействие на провеждането на научни или животновъдни процедури върху нощни животни по време на светлата фаза на денонощието.
- Отделяне на майките при всички видове, включително гризачи.
- Познавателна способност, осведоменост, памет, възприемане на последиците от процедурите.

Честота, интензивност

- Няма пряка връзка между честотата и тежестта, т.е. повишената честота не води задължително до по-голяма тежест. Това е така, тъй като въздействието върху тежестта на повтарящи се процедури или техники зависи от редица фактори, като напр. интензивността на всяка интервенция, нейната продължителност, видовете и преживяното от индивида.
- Когато интервенциите се повтарят, има възможност за аклиматизация, която може да намали тежестта, напр. при нечовекоподобни примати, подложени на леки процедури. Обратно, повторението може да повиши тежестта, напр. поради очакване на стресираща процедура или настъпването на хипералгезия, ако е включена хирургична намеса.
- Възможност за положително подсилващо обучение или „възнаграждаване“ след процедури.
- Вместо тежест на „равнище на възстановяване“ следва да бъде отчетена най-високата степен на тежест.

Продължителност на въздействието

- Продължителността е *свързана с интензивността (и следователно с тежестта)*.
- Дали е възможно да се използват своевременно хуманно или научно приключване на процедурата.

Ефективност на облекчаването

- Подходяща аналгезия, анестезия и следоперативни грижи.
- Облагородяване — както облагородяване на жизнената среда, така и групово настаняване на социални животни.
- Настаняване, отглеждане и полагане на грижи — дали е възможно да се облекчат съгласно настоящата най-добра практика или дали процедурата налага ограничения, като например затваряне в по-малки заграждения (напр. метаболитни клетки), решетъчна настилка или излагане на климатични условия, които могат да причинят стрес.
- Обучаване на животните да съдействат или улесняване на привикването им към процедурите.
- Ефективност на протоколите за оценка в самата клетка.

Кумулативна тежест

- Цялостният жизнен опит на всяко животно, при който ограниченията върху способността да се облекчи настаняването или нуждата от често улавяне,

предаване или ограничаване могат да повлияят върху степента на тежест, трябва да бъде взет под внимание при процедура, включваща редица етапи/интервенции.

- Предишни процедури в случай на повторно използване.
- При обмисляне на повторно използване се изисква да се вземе предвид цялостният жизнен опит, включително елементи като набавяне (напр. ранно „отбиване“) и транспортиране.

Как да се гарантира последователност при оценката и определянето на действителната тежест

Приносът по време на етапа на проектиране на изследването на съответните учени, ветеринарни техници, ветеринарни лекари и персонала, грижещ се за животните, като цяло е необходим, за да се гарантира, че са налични подходящи данни, за да се позволи вземане на информирано решение относно действителната тежест в края на процедурата. Окончателното определяне на категория на действителната тежест ще бъде резултатът от анализ на данните от наблюденията в самата клетка на поведението, клиничните признаци и други подходящи параметри.

Елементите, които допринасят за последователността, обхващат:

- включване на многостранни експертни познания, опит и приоритети — „екипен подход“
- обучение за използване на протокола за ежедневна оценка (включително общата терминология, използвана за описване на наблюденията);
- опит във връзка със здравето на животните, хуманното отношение към тях и тяхното поведение;
- редовен преглед на резултатите;
- комуникация между всички, отговорни за провеждане на изследването и наблюдението на животните (отгоре надолу, отдолу нагоре, в рамките на екипа и между неговите членове);
- надзор (на местно (напр. структурата за хуманно отношение към животните), регионално, национално равнище и на равнището на ЕС).

Необходимо е да бъдат разгледани следните ключови въпроси, за да се гарантира последователност при оценката на действителната тежест:

Разработване на специфична за процедурата таблица за оценка

- Таблицы за оценка, които са адаптирани към видовете, щама и изследването, следва да бъдат разработени и съгласувани преди началото на проекта.
- Цялата налична съответна информация следва да бъде използвана ефективно при разработването на специфични за изследването таблици

за оценка, напр. предишен опит, резултати от изследвания *in vitro* или *in silico*, търсене на литература, информация от пилотни изследвания и наблюдавани клинични признаци при хора или при други животни.

- Следва да е налична информация относно това кои параметри е необходимо да бъдат наблюдавани и как следва да се извършва наблюдението в самата клетка.
- Класификацията на степента на прогнозната тежест ще „диктува“ отчасти нивото на участие, което е необходимо на оперативно равнище, дали по време на наблюдението се изисква екипен подход, както и кой следва да бъде включен при действителните наблюдения и процеса на отчитане. Действителната, окончателна оценка на тежестта и/или нейното потвърждаване се извършват от лицата, които са разработили специфичния за изследването протокол за оценка.
- В зависимост от сложността на изследването може да са от полза отделни таблици за оценка за отделните компоненти, напр. таблица за стандартни оперативни/периоперативни грижи, използвана заедно с адаптиран протокол за оценка на изследването.
- В някои случаи специфичните за изследването таблици за оценка могат също така да включват информация, свързана с управлението на колонията, напр. развъждане на генно изменени животни и данни за растежа.

Последователност при оценката на действителната тежест

Оценката на действителната тежест се извършва в края на процедурата и изисква да се направи преценка на общата тежест, действително понесена от животното, въз основа на ежедневни оценки и като се вземат под внимание проведените процедури.

- Един често използван подход е да се определят степените „лека“, „средна“ и „тежка“ за всеки от показателите, използвани при ежедневните оценки, след което на индивидуална основа да се направи оценка на тежестта на показателите.
- **Както при ежедневното наблюдение, от съществено значение е критериите за действителната оценка да са адаптирани към процедурата, видовете и щама:** напр. 10 % загуба на телесно тегло ще има много различни последици за здравето и хуманното отношение към млад, подрастващ плъх, възрастна мишка с бързо нарастващ тумор или възрастно куче.
- Вземането под внимание на периода, в рамките на който се проявяват някои от тези показатели, също е много важен фактор, по-специално по отношение на загубата на тегло и консумацията на храна/вода.

Оценката ще се извършва чрез използване на информацията от ежедневната оценка, като се взема под внимание процедурата, осъществена върху животното, колко дълго продължават неблагоприятните последици и дали животното е било използвано повторно, или не. Въпреки че това неизбежно ще включва известна субективност, подходящото обучение на наблюдаващото лице трябва да е насочено към нейното намаляване.

Определяне на действителната тежест, ако животното бъде намерено мъртво

- Ако дадено животно бъде намерено мъртво, т.е. не е евтаназирано, това може да бъде или последица от експерименталната процедура, или от други, несвързани причини¹.
- Действителната степен на тежест за животните, които са намерени мъртви, следва да бъде отчетена като „тежка“, освен ако не може да бъде взето информирано решение, че животното не е изпитало тежко страдание преди смъртта си.
- Ако е малко вероятно смъртта да е била предшествана от тежко страдание, класификацията на действителната тежест следва да отразява преживяното преди смъртта. Ще трябва да се обърне необходимото внимание и на фактори като честота на наблюдението, използване на аналгезия и т.н.
- „(трайно) увреждане“ може да бъде изпитано само от живо животно.

Необходимо е да бъдат разработени и да се предоставят на научната общност примери за илюстриране на процеса на класификация на степента на тежест, ежедневната оценка и оценката на окончателната действителна тежест.

Кой следва да даде принос за оценката на действителната тежест?

- Наблюдението и отчитането на последиците често са отделни процеси от определянето на действителната тежест.
- Отговорностите трябва да бъдат ясно определени, за да се гарантира ефективно ежедневно наблюдение на животните, с подходяща подкрепа и надзор.
- За насърчаване на последователността следва да се въведе процес на проверка, напр. чрез сравняване на резултатите от оценка, извършена от различни лица.

¹ За целите на статистическата отчетност действителната тежест следва да се свързва основно с тежестта на експерименталните процедури, а не с несвързани инциденти, като болестни огнища или наводняване на клетката. Това този вид инциденти са свързани със здравословни проблеми или с практики за отглеждане и полагане на грижи, а не с увреждане вследствие на процедурите, но следва да бъдат записани, допълнително разследвани и проследявани, за да се предотврати повтарянето им.

- Ролите по отношение на наблюдението и следенето на животните и извършването на оценки на действителната тежест следва да бъдат гъвкави и приспособими въз основа на сложността и тежестта на въпросното изследване — въпреки че правната отговорност за гарантиране на това, че страданието е установено и сведено до минимум, се носи от лицето, посочено в разрешението за проекта.
- Структурите за хуманно отношение към животните също следва да играят роля на равнището на обекта за гарантиране на последователност.
- Националните комитети и компетентните органи също могат да допринесат за насърчаване на последователността.

Инструменти за наблюдение, средства и други съображения

- Използването на таблици за резултатите следва да бъде разгледано на етапа на планиране на проекта.
- Таблиците за резултатите следва да бъдат възможно най-опростени, но да бъдат толкова подробни, колкото е необходимо, и да бъдат адаптирани към вида на изследването.
- Разработени по-рано таблици за оценка могат да бъдат използвани, ако са подходящи за изследването, видовете и щама.
- Електронното съхранение на документацията може да бъде от полза за гарантиране на последователността и лесен достъп до цялата свързана информация.
- Препоръчително е използването на стандартизиран език и терминология.
- Записаните данни следва да бъдат възможно най-обективни.
- Предимствата и недостатъците на i) числовото изражение на резултатите и ii) „двоичните“ (когато показателите са отбелязани като „налице“ или „липсва“) системи за наблюдение следва да се разглеждат на индивидуална основа.
- Всички видове записани наблюдения следва да включват възможност за добавяне на свободен текст, както и предварително определени показатели, така че да могат да бъдат записани и неочаквани резултати от наблюдения.
- Ефективното обучение за целия свързан персонал е от съществено значение, като обхваща по-специално оценката на тежестта и хуманното отношение към животните, както и техниките за наблюдение.
- За да бъде обхванат целият съответен персонал, следва да се изготви комуникационен план. Той следва да включва механизъм за бързо съобщаване на неочаквани резултати на всички подходящи лица и, според случая, на компетентния орган.

- Наблюдението трябва да бъде пропорционално на очакваните последици — процедури, които могат да причинят „тежко“ страдание, обикновено ще изискват по-често и щателно наблюдение.
- Следва да има ясни критерии за интервенция, напр. ако се наблюдават конкретни параметри или ако е достигната предварително определената степен на страдание. Целият съответен персонал следва да е запознат с тези критерии и да знае как да постъпи и с кого да се свърже, ако те се проявят.

Ако процесът на оценка на тежестта се прилага ефективно, животните и целият персонал, участващ в грижите за тях и тяхното използване, ще имат полза от подобреното хуманно отношение към животните, научната валидност и прозрачността.

Добрата вътрешна и външна комуникация във връзка с процеса на оценяване на тежестта и прилагането на принципите на заместване, намаляване и облекчаване ще допринесе за още по-големи ползи.

Приложение I

Речник на клиничните наблюдения

Успехът на всяка схема за оценка на тежестта зависи от подбора на показатели за хуманно отношение към животните, които са:

- лесно и надеждно разпознаваеми;
- ефективни при осигуряване на правилно измерване на хуманното отношение към животните;
- целесъобразни за научното изследване, видовете и щама (когато това е подходящо);
- практични за извършване и не обезпокояват прекалено животните, и
- подходящи за последователно измерване, тълкуване и анализ.

Следователно един общ подход за отчитане на клиничните наблюдения е желана цел, тъй като той ще помогне при разработването на последователни подходи за класификация на тежестта. Това ще улесни сравненията на клиничните констатации между изследванията и ще предостави информация на лицата, участващи в оценката на тежестта.

Наблюденията са структурирани въз основа на следните шест категории от високо равнище:

Външен вид / Телесни функции / Жизнена среда / Поведение/ Специфични за процедурата показатели / Свободни наблюдения

Категории от високо равнище	Области, върху които да бъде съсредоточено вниманието при наблюдаване на животните	Специфични показатели за наблюдение
Външен вид	Телесно състояние	Загуба/наддаване на тегло
		Наднормено тегло
		Отслабване
		Резултат за телесното състояние, ако е налице

	Състояние на козината и кожата	Пилоерекция
		Неподдържана/липса на добър външен вид
		Мазна козина
		Загуба на окосмяване
		Дехидратация — опъване на кожата
		Кожни лезии — оток; струпей; язва; нараняване/рана
		Зацапване с изпражнения или урина
	Отделяне на секрети	Очни; назални; уро-генитални; порфириново оцветяване при някои видове, напр. плъхове
	Очи	Хлътнали или „замъглени“
		Затворени/полузатворени
		Увреждане/нараняване на окото (напр. улцерация на роговицата)
	Уста	Отделяне на слюнка
		Неправилна захапка/прекалено пораснали зъби
Друго	„Изражение, изразяващо болезненост“ – напр. полузатворени очи и издутина на нослето при мишки	
	Свиване в коремната област	
	Подуване на част от тялото, напр. подут корем	
Телесни функции	Дишане	Учестено дишане (тахипнея)
		Затруднено дишане (хиперпнея)
		Много затруднено дишане (диспнея)
		Хриптене или друг звук при дишане
	Прием на вода/храна	Повишен/понижен
	Телесна температура	Повишена/понижена; измерена телесна температура, ако е възможно (напр. чрез микрочип или телеметрично устройство, контактен или безконтактен термометър); цвят на крайниците при гризачи
	Сетива	Нарушено зрение, слух или баланс
Жизнена среда	Жизнена среда в заграждението, включително всякакви видове	Наличие и консистенция на изпражнения
		Мокро леговище, напр. поради полиурия

	постеля, материал за гнездене, елементи за облагородяване	Наличие на повръщано или кръв Дали животното използва елементи за облагородяване на жизнената среда, напр. материал за гнездене, блокчета за дъвчене
Поведение	Социално взаимодействие	Промяна на нормалния темперамент — неспокойни/агресивни взаимодействия с други животни; безпокойство (напр. подчертано избягване при отговаряне, криене)
		Изолиране или странене от другите животни в социалната група
	Нежелано поведение	Повтарящо се/стереотипно поведение
		Скубане на козината (гризачи), трихотиломания
		Повишено агресивно поведение към хора или други животни
	Стойка и подвижност	Необичайна стойка
		Необичаен вървеж; куцане; неподвижност/летаргия/нежелание да се движи, когато е стимулирано
		Некоординирани движения
		Хлътване на корема; клюмнала глава
	Друго	Тремори
Припадъци/конвулсии/спазми		
Вокализация, спонтанна или провокирана. <i>(Забележка: Някои видове, напр. гризачите, обикновено вокализират в ултразвуковия диапазон, така че доловимите вокализации са обект на специално внимание. Вокализацията при зайците обикновено са недоловими, освен когато животното е в състояние на дистрес).</i>		
Специфични за процедурата показатели	Те са определени въз основа на отделния проект, възможните неблагоприятни последици от него и очаквани показатели за тези последици	Например при модел на ЕАЕ това може да включва: загуба на тонус на опашката, слабост в задните крайници, слабост в предните крайници, парализа, загуба на функцията на пикочния мехур

Свободни наблюдения	Схемата за оценка на тежестта следва винаги да включва възможност за отбелязване на всички наблюдения на неочаквани отрицателни въздействия върху хуманното отношение към животните.
----------------------------	--

Приложение II

Основна литература, насоки и онлайн ресурси относно оценяването на хуманното отношение към животните, подложени на научни процедури

American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM) (2006) *Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits* – можете да изтеглите материала от <http://www.tinyurl.com/65ez5vh>

Assessing the Health and Welfare of Laboratory Animals (AHWLA) training resource. Вж. <http://www.ahwla.org.uk/index.html>

Canadian Council on Animal Care (CCAC) *Welfare assessment*. Вж. <http://www.ccac.ca/> и щракнете върху микросайта, посветен на заместването, намаляването и облекчаването, след което потърсете „оценка на хуманното отношение към животните“ (на английски или френски език)

Categorising the severity of scientific procedures on animals - Summary and reports from three round-table discussions, редактирано от Jane A. Smith и Maggy Jennings от името на the Boyd Group and the RSPCA, юли 2004 г.

Публикувано от RSPCA Research Animals Department

FELASA Working Group on the Reporting of Clinical Signs in Laboratory Animals (2012) – (под печат)

Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (2008) *Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press

Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (2009) *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press. Вж. http://dels.nas.edu/animal_pain/

Johansen R, Needham JR, Colquhoun DJ, et al. (2006) Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. *Laboratory Animals* **40**: 323–340

Joint Working Group on Refinement (2011) A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals. *Laboratory Animals* **45**: 1-13

Leach MC et al. (2008) Identification of appropriate measures for the assessment of laboratory mouse welfare. *Animal Welfare* **17**: 161-170

National Centre for the Three Rs (NC3Rs) *Welfare assessment*. Вж. <http://www.nc3rs.org.uk/welfareassessment>

National Health and Medical Research Council (2008) *Guidelines to Promote the Wellbeing of Animals Used for Scientific Purposes: The Assessment and Alleviation of Pain and Distress in Research Animals*. Canberra: Australian Government. Вж. <http://www.nhmrc.gov.au> и потърсете за „болка и дистрес“.

Организация за икономическо сътрудничество и развитие (ОИСР) (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation*. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 19. Paris: ОИСР

Wells DJ, Playle LC, Enser WEJ, et al. Assessing the welfare of genetically altered mice. Пълна версия на <http://www.nc3rs.org.uk/gamice>. Обобщение в *Laboratory Animals* **40**: 111–114

Workman P et al. (2010) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* **102**: 1555-1577, можете да изтеглите от <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883160/?tool=pubmed>

1.2 Предложени полезни списания за допълнително информиране

<i>Applied Animal Behaviour Science</i>	http://www.applied-ethology.org/applied_animal_behaviour_science.html
<i>Animal Technology and Welfare</i>	http://www.iat.org.uk/publications/atw.htm
<i>Animal Welfare</i>	http://www.ufaw.org.uk/animal.php
<i>Contemporary Topics in Laboratory Animal Science</i> и <i>Journal of the American Association for Laboratory Animal Science</i>	http://www.aalas.org/publications/index.aspx#ct
<i>Lab Animal</i> и <i>Lab Animal Europe</i>	http://www.labanimal.com/laban/index.html http://www.labanimaleurope.eu/
<i>Laboratory Animals</i>	http://la.rsmjournals.com/

1.3 Примерни ключови думи за търсене на литература

Следните ключови думи са полезни при търсене на информация относно оценката на тежестта:

афект	оценка на вредите и ползите	положителни показатели	скала на тежестта
хуманно отношение към животните	хуманно приключване на процедурата	положително хуманно отношение към животните	поведение при болест
страдание на животните	нужди	качествена оценка на поведението	стрес
оценка	обективна оценка	качество на живота	страдание
дискомфорт	болка	облекчаване	оценка на хуманното отношение към животните
дистрес	оценка на болката	таблици за резултатите	показател за хуманно отношение към животните
оценка на вредите	измерване на болката	система за оценяване по скала	резултати в областта на хуманното отношение към животните

Референтни материали, свързани с класификацията на действителната тежест

CCAC (1998) *Guidelines on: Choosing an Appropriate Endpoint in Experiments Using Animals for Research, Teaching and Testing*. Canadian Council on Animal Care.

Материалът може да бъде намерен на: http://www.ccac.ca/en_/standards/guidelines (на английски език) и http://www.ccac.ca/fr_/normes/lignes_directrices (на френски език)

FELASA Working Group on Pain and Distress (1994) Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. *Laboratory Animals* **28**: 97-112

Jones HRP, Oates J and Trussell BA (1999) An applied approach to the assessment of severity. В: Hendriksen CFM. & Morton DB (eds), *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research*. Proceedings of the International Conference, 22-25

November 1998, Zeist, The Netherlands. Royal Society for Medicine Press Ltd., London pp 40-47

LASA /APC (2008) *Final Report of a LASA/APC Working Group to Examine the Feasibility of Reporting Data on the Severity of Scientific Procedures on Animals*. Може да бъде намерено на: <http://www.lasa.co.uk/publications.html>

Morton, DB и Hau J (2011) Chapter 18: Welfare assessment and humane endpoints. In *Handbook of Laboratory Animal Science, 3rd Edition, Volume 1 Essential Principles and Practices*. Hau J and Schapiro, SJ (eds), CRC Press LLC, USA, pp 535-572

Prescott MJ, Morton DB, Anderson D, Buckwell A, Heath S, Hubrecht R, Jennings M, Robb D, Ruane B, Swallow J and Thompson P (2004) Refining dog husbandry and care, Eighth report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals* **38 Suppl 1**: S1:1-S1:94

Wolfensohn S и Lloyd M (2003) *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, 3rd Edition*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford (4-то издание в процес на подготовка)

(Всички URL адреси са разгледани за последен път на 24 май 2012 г.)

Примери за илюстриране на процеса на класификация на тежестта, ежедневната оценка и оценката на действителната тежест

Брюксел, 11 януари 2013 г.

В работния документ относно рамката за оценка на тежестта, изготвен на проведената през юли 2012 г. среща от експертната работна група на Европейската комисия и одобрен от националните компетентни органи за прилагането на Директива 2010/63/ЕС относно защитата на животните, използвани за научни цели, се препоръчва разработването на примери, които да илюстрират „процеса на класификация на тежестта, ежедневната оценка и окончателната, действителната оценка на тежестта“, които следва да бъдат предоставени на научната общност.

Вследствие на това експертната работна група изготви редица примери, които да покажат как процесът, описан в *работния документ*, може да бъде приложен при различни процедури. Предназначението на тези примери е да помогнат на компетентните органи, ползвателите, ветеринарните техници, ветеринарните лекари и целия друг съответен персонал да гарантират, че болката, страданието и дистресът се прогнозира, разпознават и облекчават, когато това е възможно, както и че са оценени по последователен начин по време на процедурите. Този документ бе одобрен от националните компетентни органи за прилагането на Директива 2010/63/ЕС на срещата им, проведена на 23 — 24 януари 2013 г.

От решаващо значение е, че при използването на тези примери са взети под внимание редица важни фактори:

- Приема се, че **добрата практика се прилага** през цялото време във връзка с настаняването; отглеждането и грижите; процедурите за облекчаване; образованието и обучението; оценката на компетентността; извличането и прилагането на актуална информация относно заместване, намаляване и облекчаване; както и подготовката на опити.
- Видовете таблици за резултатите, включени в примерите, са предназначени да **допълват — не да заместват — преценката на обучен, компетентен и проявяващ щадящо отношение персонал**. Целта е да се даде възможност за по-систематично и обективно наблюдение, за водене на регистър и оценка на страданието, но не и да се замества професионалната преценка.
- Всеки резултат е свързан с **хипотетична, но реалистична ситуация**. Не би било подходящо да се включват всички подробности, които ще бъдат на разположение на практика, но са включени достатъчно подробности, **за да се обясни как се прилага процесът**.
- Както се посочва в *работния документ*, от съществено значение е **оценката на тежестта** за видове, шамове и процедури да се **обмисля и приспособява**, както се извършва при обекта на конкретен ползвател. Въз основа на това експертната група **настоятелно препоръчва да не се използват** посочените в примерите таблици и системи от таблици за резултатите във вида, в който са, **дори и за същата процедура**. Необходимо е да се извършва редовен преглед на всички протоколи за оценка на тежестта във връзка с ефективността и при необходимост да се преразглеждат.
- **Примерите също подлежат на преразглеждане**, тъй като познанията относно показателите за болка, страдание и дистрес се увеличават, а подходите се променят, за да се оцени и класифицира тежестта. Всеки пример е обозначен с дата; за актуализации моля проверете на уебсайта на ЕК http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/interpretation_en.htm.
- **Ще се приветства предоставянето на обратна информация** във връзка с полезността на примерите и ще бъдат включени предложения за бъдещи процедури; моля, изпратете коментари на env-laboratory-animals@ec.europa.eu

Съдържание:

Модел 1 — Онкологични изследвания.	28
<i>Модел 1(а) Поддържане на човешки туморни клетъчни линии при имунокомпрометирани голи мишки.</i>	<i>29</i>
<i>Модел 1(б) Ефикасност на нови фармацевтични агенти върху нарастването на туморите.....</i>	<i>36</i>
Модел 2 — Експериментален автоимунен енцефалит (ЕАЕ) при мишки.....	44
Модел 3 — Артрит.....	55
Модел 4 — Инсулт.....	67
Модел 5 — Производство на поликлонални антитела при зайци.....	81
Модел 6 — Производство и отглеждане на генетично изменени (ГИ) животни.....	88
<i>Модел — ген $A^{tm1a(Funding)Lab}$.....</i>	<i>90</i>
<i>Модел — $Tg(\text{ген } B)^{Labcode}$.....</i>	<i>97</i>
<i>Модел — ген $C^{tm1a(Funding)Lab}$.....</i>	<i>100</i>

Илюстративни примери за процеса на определяне на тежестта

Модел 1 — Онкологични изследвания (1a и 1б)

Последна актуализация: 05/02/2013

1. Животински модели в онкологични изследвания (1a и 1б)

Общ контекст: Оценка на нови *in vivo* противоракови агенти

Раковите заболявания са една от основните причини за смъртността в развитите страни, а застаряването на населението неизбежно ще доведе до увеличаване на социално-икономическото отражение на заболяемостта от рак. Към 2010 г. вероятността от настъпване на смърт, свързана с раково заболяване, преди навършване на 70 г. в рамките на ЕС беше приблизително едно към седем. От това следва, че е необходимо да се разработят нови, по-ефикасни лекарства за лечението на раковите заболявания. Предимствата от това ще включват намаляване на смъртността, причинена от ракови заболявания, и подобряване на качеството на живот на тези, които ще развият болестта в бъдеще.

Понастоящем в разработването на нови лекарства за лечението на раковите заболявания, в допълнение към компютърното моделиране и *in vitro* методологиите, като например анализ на клетъчни култури, се използват и животински модели. След *in vitro* потвърждаване на селективността и активността на съединенията за изпитване върху животни се избират само тези от тях, които имат благонадеждни характеристики. Изследванията на поносимостта са проведени с малки групи животни, за да се установи максимално допустимата доза (МДД) и пригодността на режима на дозиране, преди да се проведат по-големи проучвания на ефикасността.

Тежестта на въздействието върху животните ще зависи от моделите и целта на изследването. Поддържането на туморни клетъчни линии например няма да оказва значително въздействие върху хуманното отношение към животните, при условие че непрекъснато се спазва най-добрата практика, включително подходящо наблюдение, и приемането на ранни хуманни крайни етапи. При все това има вероятност изследванията, които имат за цел оценяването на нов вид лечение в метастатични модели, да доведат до по-значими проблеми във връзка с хуманното отношение към животните поради развитието на множество тумори и вероятните вредни въздействия на цитотоксичните лекарства.

Публикувани са редица насоки относно хуманното отношение към животните и тяхното използване при онкологичните изследвания, напр. в „British Journal of Cancer“ (Workman et al. 2010). Те предоставят подробен преглед на различните животински туморни модели, които са налични, как те оказват влияние върху животните и как страданието може да бъде сведено до минимум.

Тук са представени два примера, които илюстрират онкологични животински модели за различни класификации на тежестта.

Използвана литература

Workman et al. (2010) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* (2010) 102(11), 1555 – 1577;
безплатно можете да изтеглите на <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883160/pdf/6605642a.pdf>

1 (a) — Поддържане на човешки туморни клетъчни линии при имунокомпрометирани голи мишки

Някои човешки туморни клетъчни линии не се възпроизвеждат ефективно в култури и понякога е необходимо човешки клетъчни линии да се характеризират и поддържат в ксеногенетични *in vivo* модели.

Изследване

Тридесет мъжки BALB/C голи мишки ще бъдат последователно инжектирани в левия хълбок с 10^3 НСТ 116 клетъчна суспензия в 0,1 ml физиологичен разтвор. Животните ще бъдат настанени по групи в клетки с отделна вентилация (IVCs) с постеля и материал за гнездене. Хуманното отношение към животните ще се оценява ежедневно и ще бъдат претегляни на всеки четири дни. Индивидите ще бъдат палпирани за наличието на тумори всеки втори ден и всички откриваеми тумори също ще бъдат измервани с дебеломер всеки втори ден. Животните ще бъдат евтаназирани на 15-ия ден за събиране на туморите.

Първоначална прогнозна оценка и разглеждане на специфични облекчения и хуманни крайни етапи

Какви действия спрямо животните са обхванати в настоящото изследване?	Какво ще изпитат животните? Колко страдание би могло да им бъде причинено? Какво би могло да доведе до влошаване?	Как страданието ще бъде сведено до минимум?	
	Неблагоприятни въздействия	Методология и интервенции	Крайни етапи
Отглеждане на имунокомпрометирани мишки	Животните са податливи на инфекция.	<p>Настанени в клетки с отделна вентилация съгласно животновъдните практики, приспособени специално за свеждане до минимум на риска от заразяване</p> <p>Настанени групи от животни и осигурено облагородяване на жизнената среда с цел понижаване на стреса</p> <p>Животновъдните практики и грижите ще се преразглеждат при установени признаци за дистрес, агресия или необичайно поведение</p>	Всички животни, показващи признаци за влошено здравословно състояние, ще бъдат умъртвени
Подкожно	Краткотраен дискомфорт след	Еднократно инжектиране.	Животните ще бъдат умъртвени

инжектиране на туморни клетки	инжектиране	Ще бъде инжектирано подходящо количество (максимално 0,2ml) Животните ще бъдат внимателно наблюдавани по време на периода непосредствено след инжектирането	по хуманен начин, ако проявят признаци за дистрес или дискомфорт, който е повече от слаб, ако нямат признаци за бързо възстановяване, наблюдавано след инжектиране (много рядко)
Нарастване на тумора	Може да причини дискомфорт или да засегне нормалното поведение или движение Туморът може да се инфектира или да се образуват рани (но не трябва да има метастази)	Нарастването на тумора ще се измерва всеки втори ден. Схемата за наблюдение ще включва внимателно наблюдение на стойката, вървежа, както и на размера и състоянието на тумора	Ако туморът води до образуване на рани или пречи на нормалното поведение, стойка или движение, или надвишава 1,2 cm в диаметър (Workman et al. 2010), животното ще бъде умъртвено

Анализ

Очаква се животните да изпитат само **ЛЕК** дискомфорт и ще бъдат умъртвени, ако възникнат каквито и да било проблеми, свързани със здравословното им състояние или хуманното отношение към тях, които са над това равнище.

Следователно е подходяща прогнозна класификация на тежестта като ЛЕКА.

В края на този модел е включен пример за попълнена таблица за наблюдението.

Клинични наблюдения

Изготвена бе таблица за основните резултати, която е съсредоточена върху размера на тумора, телесното тегло, стойката и вървежа, тъй като се очакват няколко други клинични признаци. За неочаквани клинични признаци има включено поле, в което да бъдат

записани под формата на свободен текст. Вписването на НУА (няма установени аномалии) потвърждава, че животните са проверени и не са открити аномалии. По-долу е представен пример.

Резултати

- При нито едно от животните не бе отбелязана значителна загуба на тегло;
- При 5 от животните не бе отбелязано развитие на тумор;
- 25 животни развиха тумори на хълбока. Тези тумори не оказват влияние върху нормалното поведение и са с максимален размер от 1 cm на 14-ия ден, когато животните бяха евтаназирани, съгласно с протокола на изследването за събиране на тумори;
- Прояви на агресивно поведение и сбиване в една от клетките; едно от животните имаше рани от ухапване по опашката и гърба и бе отделено в самостоятелна клетка, раните бяха дезинфекцирани локално всеки ден до излекуването им и животното бе запазено до края на процедурата.

Оценка на действителната тежест

- При двадесет и девет животни изследването приключи само с леко страдание в резултат на поставянето на инжекцията и нарастването на туморите.
Действителната тежест за тези животни бе определена като **ЛЕКА**, 1 от животните имаше рани от ухапване, които бяха ефективно обработени. При това животно се наблюдаваше допълнително страдание, причинено вследствие на агресия, но то не бе свързано с процедурата. Тези инциденти бяха успешно преодолени и страданието бе сведено до минимум. Въпреки че равнището на страдание, понесено от съответното животно, бе умерено, тъй като този инцидент не бе свързан с процедурата, действителната тежест, свързана с процедурата, която следва да се докладва, бе счетена за **ЛЕКА**.

Пример за таблица за наблюдението (попълнена за хипотетичен случай)

Нарастване на тумор при голи мишки — Таблица за процедурите и наблюдението				
Клетка 1 — Мишки номера от 1 до 5				
Дата	Процедура	Размер на тумора (cm)	Тегло (g)	Клинични наблюдения — проверете внимателно стойката и вървежа
28/02	Подкожно инжектиране		1—21 2—22 3—21 4—22 5—22	Няма признаци за проблеми във връзка с хуманното отношение към животните след инжектирането
01/03				Няма установени аномалии (НУА)
02/03	Палпация			НУА
03/03				НУА

04/03	Палпация		1—21 2—22 3—21 4—22 5—22	НУА
05/03				НУА
06/03	Палпация			НУА
07/03				Определено агресивно поведение; няма видими рани
08/03	Измерване на тумора	1—0,1 2—0,1 3—0,1 4 — няма тумор 5—0,2	1—21 2—22 3—21 4—22 5—22	Мишка 1 имаше рани от ухапване по опашката и гърба — локално лечение; преместена за самостоятелно настаняване. Кутиите за изграждане на гнездо са предвидени за самостоятелно настанени животни, но са преместени от клетката с останалите четири мишки, в случай че това може да породи агресия
09/03				Дезинфекцирани рани на мишка 1, добре зараснали, няма признаци за агресия между останалите животни

10/03	Измерване на тумора	1—0,2 2—0,1 3—0,1 4 — няма тумор 5—0,2		Дезинфекцирани рани на мишка 1
11/03				Дезинфекцирани рани на мишка 1
12/03	Измерване на тумора	1—0,4 20,3 3—0,3 4 — няма тумор 5—0,5	1—22 2—22 3—21 4—21 5—23	Излекувани рани на мишка 1, дезинфекцията преустановена
13/03				НУА
14/03	Евтаназия и събиране на тумори			

1 (б) Ефикасност на нови фармацевтични агенти по отношение на нарастването на туморите — Многоетапна процедура

Изследването е предназначено за оценка на ефикасността на нови агенти при намаляване или спиране на нарастването на туморни клетки. Преди да е възможно да започне лечението туморът трябва да бъде установен добре (обикновено 0,5 cm в диаметър е достатъчно), като поради продължителността на изследването някои тумори могат да достигнат най-много до 1,2 cm в диаметър, обикновено в контролната група с носителя. Много вероятно е цитотоксичните лекарства да предизвикат някои неблагоприятни въздействия върху хуманното отношение към животните.

Тридесет мъжки BALB/C голи мишки ще бъдат инжектирани с бавно нарастващи туморни клетки (0,1 ml). Хуманното отношение към животните ще бъде оценявано ежедневно и те ще бъдат претегляни веднъж седмично в продължение на три последователни седмици. Нарастването на тумора ще се измерва с дебеломер на 7-ия и на 14-ия ден. На 20-ия ден туморът ще бъде измерен отново, животните ще бъдат рандомизирани и лечението ще започне под формата на поставяне на интраперитонеални инжекции два пъти дневно в продължение на 7 дни.

Първоначална прогнозна оценка и разглеждане на конкретни облекчения и хуманни крайни етапи

Какви действия спрямо животните са обхванати в настоящото изследване?	Какво ще изпитат животните? Колко страдание би могло да им се причинено? Какво би могло да доведе до влошаване?	Как страданието ще бъде сведено до минимум?	
	Неблагоприятни въздействия	Методология и интервенции	Крайни етапи
Отглеждане на имунокомпроментирани мишки	Животните са податливи на инфекция	Настанени в клетки с отделна вентилация съгласно животновъдните практики, приспособени специално за свеждане до минимум на риска от заразяване.	Всички животни, показващи признаци за развиващи се съпътстващи заболявания, ще бъдат умъртвени

		<p>Настанени групи от животни и осигурено облагородяване на жизнената среда с цел понижаване на стреса.</p> <p>Животновъдните практики и грижите ще бъдат преразглеждани при установени признаци за дистрес, агресия или необичайно поведение</p>	
Подкожно инжектиране на туморни клетки	Краткотраен дискомфорт след инжектиране	<p>Еднократно инжектиране</p> <p>Ще бъде инжектирано подходящо количество (максимално 0,2 ml).</p> <p>Животните ще бъдат внимателно наблюдавани по време на периода непосредствено след инжектирането</p>	Животните ще бъдат умъртвени по хуманен начин, ако проявят признаци за дистрес или дискомфорт, който е повече от слаб, ако нямат признаци за бързо възстановяване, наблюдавано след инжектиране (много рядко)
Нарастване на тумора	<p>Може да предизвика дискомфорт или да засегне нормалното поведение или движение.</p> <p>Туморът може да се инфектира или да се образуват рани (но не трябва</p>	<p>Ежедневно наблюдение на животните, редовен мониторинг на общото им здравословно състояние и нарастването на тумора.</p> <p>Схемата за мониторинг ще</p>	Животните ще бъдат умъртвени, ако туморът води до образуване на рани или нарушаване на нормалното поведение, стойка или движение, или ако надвишава 1,2cm в диаметър

	да има метастази)	включва внимателно наблюдение на стойката, вървежа, както и на размера и състоянието на тумора. Фармацевтичните интервенции ще започнат, когато туморът достигне 0,5 cm в диаметър (измерен с дебеломер)	(Workman et al. 2010)
Интраперитонеално инжектиране на нов вид фармацевтичен агент	Краткотраен дискомфорт след инжектиране Цититоксичните лекарства могат да причинят диария, загуба на тегло, анорексия или летаргия	Животните ще бъдат наблюдавани внимателно по време на периода непосредствено след инжектирането Максимален обем от 10 ml/kg дневно за 7 дни Ще бъдат използвани минимални дози (определени след изследвания за вариране на дозата). За оценка на хуманното отношение ще бъде използвана система за клинично оценяване по скала	Животните ще бъдат умъртвени, ако загубата на тегло надвишава 20 % от първоначалното телесно тегло. Животни, които не се хранят или имат диария в продължение на повече от 48 часа, ще бъдат умъртвени Като хуманен краен етап ще бъде зададена по-висока граница за клиничния резултат

Анализ

Предвид размера на тумора, нарастването на опасността от образуване на рани, честотата на поставяне на инжекциите и неблагоприятните въздействия на дадените лекарства подходящата в този случай **прогнозна класификация на тежестта е УМЕРЕНА.**

Може ли границата на тежестта да бъде ЛЕКА?

Малко вероятно, освен в случаите когато научните цели могат да бъдат постигнати с по-ранни крайни етапи, например намаляване на максималния размер на тумора. Това също така би означавало инжектирането на лекарствата в дози, за които е известно, че не причиняват значителни неблагоприятни клинични въздействия. При тези условия **ЛЕКА** тежест може да бъде счетена за подходяща.

Клинични наблюдения

В края на този модел е включен пример за таблица за наблюдението и таблица за резултатите от образците.

Резултати

От 30 мъжки BALB/C мишки, 25 бяха използвани за оценка на ефикасността, на 10 животни бе дадено лекарство В при доза Н, на 10 бе дадено лекарство В при доза Х, а на 5 животни бе дадено лекарство С при доза Y;

Оценка на действителната тежест

- 3 животни не развиха тумори и бяха евтаназирани като неизползваеми за експеримента — **ЛЕКА**
- 2 животни получиха рани на мястото на инжектиране на тумора преди започване на лечението и бяха евтаназирани — **УМЕРЕНА**
- при 10 животни, на които се дава лекарство В при доза Н, се наблюдаваха тумори, които останаха относително малки, без значителна загуба на телесно тегло и без клинични признаци — **ЛЕКА**
- при 7 животни, на които се дава лекарство В при доза Х, се наблюдаваше намаляване на размера на тумора, 15 % загуба на телесно тегло и наличие на разстройство, но бяха запазени до края на експеримента — **УМЕРЕНА**

- при 3 животни, на които се дава лекарство В при доза Х, се наблюдаваше намаляване на размера на тумора, 15 % загуба на телесно тегло, наличие на разстройство, анорексия и бяха много летаргични. Те бяха умъртвени по хуманен начин на 25-я ден — **ТЕЖКА**
- при 5 животни, на които се дава лекарство С при доза Y, се наблюдаваше продължаващо нарастване на размера на тумора, увеличена загуба на телесно тегло, без клинични признаци, различни от нарастването на тумора. Тези животни бяха евтаназирани, когато размерът на тумора надвиши 1,2 cm — **УМЕРЕНА**.

Пример за таблица за резултатите

Животно №				
Дата	01/06	02/06	03/06	04/06
Външен вид				
Телесно тегло				
Състояние на козината				
Телесна функция				
Диспнея и/или тахипнея				
Прием на храна				
Жизнена среда				
Разстройство или диария				
Кръв в				

изпразненията				
Поведение				
Манипулации				
Агресия				
Нарушен вървеж				
Нарушена стойка				
Нежелание за движение				
Специфични за процедурата показатели				
Размер на тумора				
Улцерация на тумора				
Възпрепятствано от тумора движение				
Общ резултат				
Всякакви други наблюдения				

Примери за клинични резултати

Външен вид	Резултат
Телесно тегло	
5—10 % загуба на тегло	1
11—15 % загуба на тегло	2
16—20 % загуба на тегло	3
20 % + загуба на тегло	ХКЕ
Състояние на козината	
Леко рошава козина	1
Лека пилоерекция	2
Значителна пилоерекция	3
Телесна функция	
Тахипнея (учестено дишане)	1
Диспнея (затруднено дишане)	3
Жизнена среда	

Действия	
Резултат 1	Преглед на честотата на наблюдение
2	Обмисляне на допълнителни грижи, <i>напр.</i> допълнително течности
4	Консултация с ветеринарен лекар
6	Прилагане на хуманен краен етап

Разстройство или диария	1
Кръв в изпражненията	ХКЕ
Поведение	
Напрегнатост и нервност по време на манипулациите	1
Значителен дистрес по време на манипулациите, напр. треперене, вокализация, агресивност	3
Движение	
Леко нарушен/а вървеж/стойка	1
Значително нарушен/а вървеж/стойка	2
Значителни проблеми с придвижването / нежелание за движение	3
Неподвижност >24 h	ХКЕ
Специфични за процедурата показатели	
Размер на тумора >1,2cm	ХКЕ
Улцерация на тумора	ХКЕ
Възпрепятствано от тумора движение	ХКЕ

Илюстративни примери за процеса на определяне на тежестта Модел 2 — Експериментален автоимунен енцефалит (ЕАЕ) при мишки

Последна актуализация: 05/02/2013

Общ контекст

Експерименталният автоимунен енцефаломиелит (ЕАЕ) се използва за моделиране на различни аспекти на множествената склероза (МС) при гризачи и примати. МС е многостранно, комплексно неврологично разстройство, което се проявява при млади хора. Неговите симптоми включват възпаление, демиелинизация и аксонална загуба. Животинските модели се използват за изследване на физиопатологията на това заболяване, както и за оценка на възможните защитни или лечебни стратегии, включително имуномодулация, имунозащита, аксонална регенерация и възстановяване на миелина. Многостранните многофазови характеристики на МС изискват използването на подходящи модели за решаване на специфични въпроси, свързани с различни етапи на болестта.

ЕАЕ включва генериране на активност на имунната система, насочена към миелина, което предизвиква възпаление в централната нервна система и отваряне на кръвно-мозъчната бариера. Това може да доведе до тежък неврологичен синдром в животинския модел, който би следвало да бъде последван от частично възстановяване по време на първата хронична пристъпно-ремитентна фаза. Тази фаза е свързана с възпаление и обратима демиелинизация. След 9—10 седмици животното ще навлезе в прогресираща форма, която се характеризира с хронична демиелинизация и аксонална загуба. По време на тази фаза е възможно да се направи оценка на различните терапевтични стратегии. Хуманните и научните крайни етапи трябва да бъдат избрани много внимателно, като се вземат под внимание целите на изследването.

Използвана литература

- Emerson MR *et al.* (2009) Enhancing the ability of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis to serve as a more rigorous model of Multiple Sclerosis through refinement of the experimental design. *Comparative Medicine* **59**: 112-128
- Miller SD *et al.* (2010) Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the mouse. *Current Protocols in Immunology*. **88**: 15.1.1 – 15.1.20
- Weissert R (ed) (2012) *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis - Models, Disease Biology and Experimental Therapy*. Published by In Tech, DOI: 10.5772/1190, <http://www.intechopen.com>
- Wolfensohn S *et al.* (in prep) Reducing suffering in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.

Изследване

В този пример ЕАЕ ще бъде индуцирана в четири мъжки и четири женски Biozzi АВН мишки (широко използван щам, за който се счита, че има висока транслационна стойност), с цел да се направи оценка на възможна терапия за МС. В началния етап на планиране на проекта при обсъждане, включващо ветеринарния техник, персонала, грижещ се за животните, както и лекуващия ветеринарен лекар, ползвателят разглежда всяко възможно нежелано събитие за животните и определя евентуалните причини за страдание. Всички те проучват облекченията и те се въвеждат в проекта. В социално отношение мишките ще бъдат настанени в еднopolови групи от по четири мишки. Особено внимание ще бъде обърнато на местната среда, тъй като животните с ЕАЕ ще бъдат със значителни двигателни дефицити. В клетките ще бъде осигурена твърда настилка, дървени стърготини за постилане, подходящ материал за подслон и за гнездене, както и блокчета за гризане. Животните ще бъдат третирани с възпалителен адювант, за да се предизвика ЕАЕ, и ще бъдат наблюдавани по време на фазата на възстановяване и хроничната пристъпно-ремитентна фаза (от 9-та до 10-та седмица). След като бъде развита прогресиращата форма, изпробваните терапевтични съединения ще бъдат оценявани при мишки, намиращи се в третата седмица от изследването.

Първоначална прогнозна оценка и разглеждане на специфични облекчения и хуманни крайни етапи

Какви действия спрямо животните са обхванати в настоящото изследване?	Какво ще изпитат животните? Колко страдание би могло да им бъде причинено? Какво би могло да доведе до влошаване?	Как страданието ще бъде сведено до минимум?	
	Неблагоприятни въздействия	Методология и интервенции	Крайни етапи
Многократно поставяне на инжекции с възпалителен адювант	Дискомфорт или болка в резултат на първоначалното инжектиране. Възможна реакция на мястото на инжектиране, причиняване на	В множество подкожни области (без лапичките или основата на опашката) ще бъдат инжектирани малки дози.	Животните ще бъдат умъртвени по хуманен начин, ако след инжектирането се наблюдава повече от краткотрайна умерена

	дразнение или дискомфорт	Адювантът и носителят са формулирани така, че да предизвикват минимално дразнение След инжектирането животните ще бъдат наблюдавани	болка или дистрес
Индуциране на ЕАЕ — първоначален тежък неврологичен синдром, последван от фаза на възстановяване	Парализа, която може да причини дистрес или безпокойство: загуба на тонус на опашката, слабост в задните крайници, хипомотилитет, парализа на крайниците, урологична дисфункция (инконтиненция или задържане)	Урологичната функция ще бъде наблюдавана, като ще се следи ежедневно състоянието на пикочния мехур. В случай на задържане пикочният мехур ще бъде изпразван ръчно (наблюдавайте внимателно за признаци за болка или дистрес след изпразване на мехура) Ако животните са инконтинентни, клетката ще бъде проверявана често за влажен постелъчен материал или материал за гнездене; при необходимост поставете нови материали Ще бъде осигурен подходящ подслон и материал за гнездене	Хуманни крайни етапи за всеки един от следните критерии: <ul style="list-style-type: none"> • Двустранна парализа на предните крайници >24 ч. • Двустранна парализа на задните крайници в продължение на до 5 дни • Всякакво самоосакатяване • Продължително задържане на урина/Неспособност за изпразване на мехура • Пареза (загуба на подвижност; лека парализа) • Загуба на тегло от 35 %* • Отказ да яде или пие за >24 ч. след настъпване на заболяването • Липса на възстановяване от ЕАЕ 3 седмици след настъпване на клиничното заболяване

	<p>Значителна загуба на тегло (напр. до 35 %)</p>	<p>Ще бъде осигурен постоянен достъп до вода и храна, разположени в контейнери на пода на клетката.</p> <p>Телесното тегло и състоянието ще бъдат наблюдавани ежедневно и след започване на загубата на тегло промените ще бъдат отбелязвани по-често (ако е необходимо).</p> <p>Ще бъдат осигурени блокчета, напоени с храни и течности, като ще бъдат допълвани подкожно, когато е необходимо</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Клинични признаци за развиващо се съпътстващо заболяване, напр. изгърбване
<p>Пристъпно/ремитентно клинично развитие</p>	<p>Хроничен неврологичен дефицит</p>	<p>Всички стресови фактори ще бъдат намалени, включително нивата на шума</p> <p>При необходимост температурата на жизнената среда ще бъде повишена, като се използват затоплящи подложки, допълнителна постеля и материали за гнездене</p>	

Прилагане на нов терапевтичен агент (по време на прогресиращата форма)	Дискомфорт вследствие на инжектирането Странични ефекти или липса на ефикасност на агента	След инжектирането на изпробвания агент животните ще бъдат наблюдавани внимателно	Животните ще бъдат умъртвени по хуманен начин, ако се наблюдава някой от посочените по-горе показатели или ако са налице някакви тежки странични ефекти в резултат на новия терапевтичен агент
--	--	---	--

* Загубата на тегло от 35 % е определен краен етап, който изисква сериозна научна обосновка. В този случай значителната загуба на тегло е неизбежна и животните могат да се възстановят от това с подходящата подкрепа, напр. допълнително затопляне и хранене, включително хранене от ръка, ако е необходимо. За това конкретно изследване краен етап от 35 % се определя като начин за намаляване на изискването за индуциране на ЕАЕ в допълнителни нетретирани животни, което ще бъде значително по-високо с „по-конвенционален“ краен етап (напр. 20 %).

Анализ

В случая за подходяща се счита ТЕЖКА прогнозна степен на тежест, тъй като се очаква процедурата да доведе до тежко влошаване на общото физическо и здравословно състояние на животните.

Може ли тежестта да бъде УМЕРЕНА?

Въпреки че поради описаните по-горе причини прогнозната тежест на този модел следва винаги да бъде ТЕЖКА, ретроспективната класификация на тежестта може да бъде УМЕРЕНА в зависимост от продължителността на изследването и прилагането на ранни хуманни крайни етапи, както е посочено тук.

Клинични наблюдения

По време на изследването мишките бяха наблюдавани от ветеринарния техник и персонала, грижещ се за животните, които използваха система от таблици за клиничните резултати, съобразени с протокола, след обсъждане с участието на ползватели, ветеринарни техници, персонала, грижещ се за животните, и ветеринарен лекар). Тя включваше параметри, свързани с теллото, състоянието на козината, тонаса на опашката, контрола на пикочния мехур, изправяне, вървеж, пареза и напреднали симптоми (заемане на странично положение при покой; почти пълна парализа; учестено, забавено или дълбоко дишане). Тъй като проектът включваше тежки процедури, животните бяха наблюдавани много внимателно и ползвателят редовно изготвяше текущи прегледи за степента на тежест след обсъждане с органа, отговарящ за хуманното отношение към животните, ветеринарен техник и назначен ветеринарен лекар. Подолу е представен илюстративен пример за таблица за резултатите.

Пример за подходяща таблица за резултатите

Таблица. Таблица за клиничните резултати, използвана за ЕАЕ при мишки

Дата:					
Външен вид					
Телесно тегло					
Състояние на козината					
Телесна функция					
Контрол на пикочния мехур					
Тонус на опашката					

Дишане					
Жизнена среда					
Състояние на гnezдото					
Поведение					
Социално поведение					
Вървеж					
Специфични за процедурата показатели					
Заемане на странично положение при покой					
Време за изправяне					
Пареза					
Парализа					
Други наблюдения					
(Свободен текст)					

Забележки: Всеки показател е оценен съгласно системата в таблицата по-долу, при която (например) „1“ ще бъде вписано в таблицата срещу „тонус на опашката“, ако се наблюдава намалено повдигане, а „2“ срещу „състояние на гнездото“, ако гнездото не е било достатъчно добре оформено.

Таблица. Система за оценка на показателите в таблицата за клиничните резултати за ЕАЕ

Резултат:	1 = Лека	2 = Умерена	3 = Тежка
Загуба на тегло	до 10 %	От 10 до 20 %	От 20 до 35 %
Състояние на козината	Леко рошава	Неподдържана	Значителна /продължителна пилоерекция
Контрол на пикочния мехур — инконтиненция	Доказателство за определена загуба на контрол, напр. малко количество урина в гнездото.	По-изразено „изпускане“ на урина	Инконтиненция
Контрол на пикочния мехур — задържане	Мехурът може да се палпира, но се изпразва при манипулация	Изискват се малко повече усилия за изпразване на мехура	Неспособен да уринира без намеса; признаци за дискомфорт/дистрес по време на или след ръчно изпразване
Тонус на опашката	Намалено повдигане или навиване на опашката	Загуба на тонус в дисталния край на опашката	Загуба на тонус по цялата дължина на опашката
Дишане: учестено, забавено или дълбоко дишане	Слабо	Умерено	Значително

Състояние на гнездото	Недостатъчно добре оформено	Има опит за създаване на гнездо, но не е достатъчно добре оформено	Няма гнездо
Социално поведение	Не се очаква промяна с наличие на леко страдание; оценяването започва при 2	Понижено взаимодействие с другите животни	Значително намалено взаимодействие, пасивен
Вървеж	Тромав	Влачи единия от задните си крайници	Влачи задните си крайници
Заемане на странично положение при покой	Не се очаква промяна с наличие на леко или умерено страдание; оценяването започва при 3	Не се очаква промяна с наличие на леко или умерено страдание; оценяването започва при 3.	Налице
Време за изправяне	Бавно изправяне при поставяне по гръб	Значително затруднение при изправяне	Неспособност да се изправи в рамките на 5 секунди след поставяне по гръб
Пареза	Слаба абдукция на предните крайници при поставяне по гръб	Намалена степен на абдукция на предните крайници при поставяне по гръб	Няма абдукция на предните крайници
Почти пълна или пълна парализа	Не се очаква промяна с наличие на леко или умерено страдание; оценяването започва при 3	Не се очаква промяна с наличие на леко или умерено страдание; оценяването започва при 3	Налице

Оценка на действителната тежест

В края на процедурата бе направен преглед на таблицата за резултатите за всеки индивид, за да се види колко високо са били оценени показателите и как това се е променило в течение на времето.

- Две мишки загубиха 8 % от телесното си тегло след индуцирането на ЕАЕ, имаха леко рошава козина и лека абдукция на предните крайници, но показаха резултат „2“ по отношение на всички други показатели през първите пет дни от проекта. След това техният резултат бе върнат на „1“ или „0“ за всеки показател за пристъпната/ремитентната фаза и по време на изпитването на лекарството. Тежест=**УМЕРЕНА**
- Три мишки загубиха между 22 и 32 % от телесното си тегло и показаха резултати в комбинация от „3“, „2“ и „1“ по време на пристъпната/ремитентната фаза и по време на изпитването на лекарството. Тежест = **ТЕЖКА**
- Една мишка загуби 37 % от телесното си тегло по време на постиндукционната фаза и бе умъртвена по хуманен начин. Тежест = **ТЕЖКА**
- Две мишки загубиха 15 % и съответно 18 % от телесното си тегло и показаха резултат в комбинация от „2“ и „3“ за всички други показатели за първите четири дни от изследването. След това показаха резултат в комбинация от „1“ и „2“ по време на пристъпната/ремитентната фаза и по време на изпитването на лекарството. Тежест = **ТЕЖКА**

Не бе наблюдавана парализа и се оказа, че е много трудно да се оцени дишането на равнището на страничната стена на клетката, така че и двата показателя бяха изтрети от таблиците с данни. Увеличаването на прекараното в подслона време, отбелязано в полетата за свободен текст, е ранен показател за страдание, поради което той беше включен в таблиците за бъдещи проекти.

При 6 животни степента бе счетена за **ТЕЖКА**, при 2 животни — за **УМЕРЕНА**.

Възможности за допълнително прилагане на принципа на заместване, намаляване и облекчаване

След оценката на действителната тежест ползвателите проведоха консултации с колеги и потърсиха литература с цел по-нататъшни облекчения. Бяха отбелязани следните допълнителни облекчения:

- предварително хранене на животните с високоенергийни хранителни добавки, като желе и кондензирано мляко, преди прилагане на адюванта;

- използване на по-ниска доза адювант;
- използване на алтернативен протокол за изследването, така че да бъде намалено времетраенето на проекта.

Тези възможности бяха добавени към протокола за бъдещи изследвания с намерението да се сравнят действителните равнища на тежест, за да се разбере дали облекченията са били ефективни.

Илюстративни примери за процеса на определяне на тежестта

Модел 3 — Артрит

Последна актуализация: 05/02/2013

Общ контекст

Животинските модели на артрит се използват за изследване на патогенезата на болестта и за оценка на потенциалните лекарства за артрит за клинична употреба. Следователно важният критерий за избор на модел включва морфологичните сходства с болестта при човека и капацитета на модела да предвижда ефикасността на изпробваните терапевтичните съединения при хората.

Широко използваните животински модели на ревматоиден артрит включват: адювантен артрит при плъх, колаген тип II за артрит при плъхове, колаген тип II за артрит при мишки и антигенно индуциран артрит при няколко вида (Bendele, 2001). Широко използвано е инжектирането в основата на опашката, тъй като то предоставя добър имуногенен отговор, въпреки че в литературата се съобщава и за други места за инжектиране. Също така има значителни различия в щамовете по отношение на чувствителност, тежест и латентност към появата на артрит. Например податливостта на генетично изменените (ГИ) линии по отношение на развитието на артрит може да бъде модифицирана (повишена или потисната) в зависимост от въздействието на генните изменения. При животинските модели на артрит, които са използвани често и поради това са добре утвърдени, настъпването на болестта ще бъде лесно предвидимо, а техниките за оценка е вероятно да бъдат добре дефинирани и характеризирани. При такива модели могат да се използват множество оценки, включително анализ на вървежа и използването на влакна Von Frey, които се различават от единичните мерки за наблюдение.

Трябва да се има предвид, че следва да се извършва редовен преглед на наличните щамове, протоколи и облекчения, така че да се избере/ат най-подходящия/ите от тях, изисквани с оглед на научните въпроси, разглеждани при всеки отделен случай (Joe et al, 1999).

Моделът, представен в настоящия пример, е колаген тип II за артрит при плъхове, който може да причини тежко страдание. Поради това за неговото използване е абсолютно задължително да е налице убедителна научна обосновка. Плъховете са имунизирани срещу хетероложен колаген тип II, който предизвиква лезии, подобни на тези, наблюдавани при ревматоиден артрит при човека

(Bendele, 2001). Полученият полиартрит се характеризира със значително разрушаване на хрущяла, свързано с отлагане на имуен комплекс върху ставните повърхности, костна резорбция и периостална полиферация и достигане на по-умерени нива по отношение на подчертан синовит и околоставно възпаление.

Използвана литература

Bendele, A.M. Animal models of rheumatoid arthritis, *J Musculoskel Neuron Interact* 2001; 1(4):377-385

Jasemian Y et al. (2011) Refinement of the collagen induced arthritis model in rats by infrared thermography. *Br. J. Med. & Med. Res.* **1(4)**: 469-477

Joe, B., Griffiths, M.M., Remmers, E.F., Wilder, R.L. Animal models of rheumatoid arthritis, *Current Rheumatology Reports* 1999 ; 1 139-149

Изследване

В настоящия пример артрит ще бъде индуциран в 18 мъжки и 18 женски плъха на Lewis чрез многократно инжектиране на непълен адювант на Freund (FIA) и колаген. Мястото на инжектиране ще бъде в основата на опашката. Ежедневното третиране ще започне след десет дни (Д 10), когато артритът вече ще се е развил, и след това ще продължи да се прилага ежедневно в продължение на 14 дни (до Д 24). Целта на изследването ще бъде да се тестват предполагаеми терапевтични агенти. За да се прецени дали осигуряването на аналгезия ще повлияе по някакъв начин върху научните цели, бе направен преглед на публикувани по-рано данни за свързани съединения и бе установено, че това ще доведе до объркване при експериментите. Поради това по време на развитието на артрит и при контролите няма да се прилага аналгезия, като по-специално ще се обърне внимание на нефармакологичните методи за облекчаване на болката (напр. облекчения при отглеждането), с цел да се облекчи страданието.

Всички животни ще бъдат наблюдавани и претегляни ежедневно, като резултатите ще се отбелязват в таблица за клиничните резултати и ще бъдат тествани на Д 0 (преди поставянето на първата инжекция), Д 10 (преди началото на третирането), Д 13, Д 16, Д 20 и Д 24. Тестването ще включва косвени мерки за увреждане на физическата функция, напр. диаметър на ставата (измерва се с дебеломер) и клиничния резултат, съгласно системата за оценяване по скала за артрит. Въз основа на клиничните резултати ще бъдат приложени хуманни крайни етапи (вж. по-долу).

Оценка на нови терапевтични фармацевтични агенти при модел на артрит при плъхове (колаген тип II)

Тежка степен на ТЕЖЕСТ

Какви действия спрямо животните са обхванати в настоящото изследване?	Какво ще изпитат животните? Колко страдание би могло да им бъде причинено? Какво би могло да доведе до влошаване?	Как страданието ще бъде сведено до минимум?	
	Неблагоприятни въздействия	Методология и интервенции	Крайни етапи
Подкожни инжекции на говежди колаген тип II в непълен адювант на Freund (FIA) в основата на опашката до три прилагания	<p>Ограничен стрес</p> <p>Краткотрайна болка, умерен оток на мястото на инжектиране и дискомфорт за един или два дни</p> <p>Възможни кожни улцерации, но малко вероятно с FIA</p>	<p>Щадящо отношение и компетентност по време на манипулациите през цялата процедура</p> <p>Стандартизирана доза и формулировка, избрана за максимално намаляване на отока и болката</p>	Ако има кожни улцерации или те се инфектират, животното трябва да бъде умъртвено по хуманен начин
Развитие на артрит (D0—D10)	<p>Дискомфорт, болка, немощ и дистрес; животното може да покаже признаци за влошаване на здравето, включително унил външен вид, липса на апетит, нежелание за движение, загуба на тегло, отичане на ставите, доловима вокализация по време на манипулациите</p>	<p>Внимателно клинично наблюдение с използване на таблица за общите клинични резултати, с увеличена честота на наблюдение при проява на клиничните признаци (обикновено от D8 до D10).</p> <p>Предоставяне на допълнителна мека постеля и материал за гнездене по</p>	Когато животните достигнат предварително определения клиничен резултат за хуманни крайни етапи, те ще трябва да бъдат умъртвени по хуманен начин (вж. таблицата по-долу).

		<p>време на цялото изследване</p> <p>Лесен достъп до вода и храна (напр. на пода на клетката) по време на цялото изследване</p> <p>Ще се използва система за клинично оценяване по скала за артрит, която оценява степента на отичане и броя на засегнатите стави</p>	
<p>Прилагане на фармакологични агенти (тестване и контрол, два пъти дневно) подкожно или интраперитонеално (от Д 10 до Д 24)</p>	<p>Краткотраен дискомфорт след инжектиране</p> <p>Не се очаква фармакологичните агенти да причинят неблагоприятни въздействия предвид предишни данни за животни</p>	<p>Ежедневно внимателно клинично наблюдение с използване на таблица за общите клинични резултати</p>	<p>При наличието на значителни неблагоприятни въздействия ще се прилагат хуманни крайни етапи</p>
<p>Оценка на въздействието на фармакологичните агенти върху тежестта на артритата (Д 0, Д 10, Д 13, Д 16, Д 20 и Д 24)</p>	<p>В зависимост от използваните методи може да се наблюдава допълнителна краткотрайна болка или дискомфорт, напр. използване на влакна на Von Frey, използване на дебелимери, изискване за извършване на манипулации</p>	<p>Внимателно клинично наблюдение</p> <p>Намаляване на честотата на наблюдение (до минимум, в съответствие с научните цели) до възстановяването на животните</p>	<p>Вж. таблицата по-долу</p>

Забележка

Системите за клинично оценяване по скала и за оценяване по скала за артрит следва да бъдат обсъдени от научния изследовател, ветеринарния хирург, ветеринарния техник и персонала, грижещ се за животните, и да бъде постигнато съгласие по тях преди започването на изследването.

Анализ

В резултат на вероятността от значително клинично въздействие върху животното, което може да продължи в рамките на няколко седмици, се счита за подходящо прогнозната класификация на степента на тежест да бъде определена като **ТЕЖКА**.

Може ли тежестта да бъде УМЕРЕНА?

Дали е възможно тежестта да бъде намалена до умерена зависи от целта на изследването. Например с често и задълбочено наблюдение на животните и при наличието на потенциал за изпълнение на по-ранни крайни етапи (напр. при възникване на окуцяване или след период на леко окуцяване при единия крайник, или използване на *in-vivo* образни методи за ранно откриване на промени в патологията на ставите), процедурата би могла да се класифицира като УМЕРЕНА. Такива ранни крайни етапи (напр. приключване на изследването на 6-ия ден, след образната диагностика) са възможни в проекти, при които се изследват ранни възпалителни промени. Профилактично лечение (започнало преди пълното развитие на артрит) с нови фармацевтични агенти, които имат силно противовъзпалително въздействие и потискат развитието на пълен артрит, също може да доведе до понижаване на тежестта до **УМЕРЕНА**. Вида на показаното тук изследване обаче има за цел да се направи оценка на лечението за напълно установен артрит, така че класификацията на степента на тежест се запазва **ТЕЖКА**.

Може ли тежестта да бъде над горната граница?

Съгласно член 15, параграф 2 от Директивата „*държавите членки гарантират, че процедура не се осъществява, ако е свързана със силна болка, страдание или дистрес, които има вероятност да са продължителни и не могат да бъдат облекчени*”. Това изследване има потенциала да предизвиква тежко страдание в продължение на няколко седмици, което следва да се разглежда като продължително. Ако и при четирите крайника се е развил тежък артрит и страданията на животните не могат да бъдат облекчени,

изследването ще бъде над горната граница на тежестта, поради което би било необходимо да се облекчи значително или да се направи позоваване на „предпазна клауза” (член 55 от Директивата) и да се подаде заявление до Комисията за издаване на разрешение.

В настоящия пример обаче са въведени мерки, които да намалят страданието, като същевременно се взема предвид научната цел, включително пречистване на съединенията, доставката и избора на адювант, който позволява развитието на артрит само в задните крайници, като се предоставя комфортна жизнена среда и лесен достъп до храна и вода, цялостна система за наблюдение и хуманни крайни етапи. Следователно този проект няма да се счита за превишаващ горната граница и може да бъде одобрен в резултат на иначе положителна оценка на проекта, включително преглед на вредите и ползите.

По-долу е показан пример за таблица за клиничните резултати от наблюдение по дни на артрит при плъхове

Дата:	Ден 1	Ден2	Ден 3	Ден 4
Външен вид				
Загуба на тегло				
Неподдържане на добър външен вид				
Дехидратация				
Телесна функция				
Диспнея				
Тахипнея				
Поведение				
Нежелание за движение				

Летаргия/апатия				
Неподвижност				
Вокализация				
Специфичен за процедурата показател				
Резултати за артрит на лапичката (вж. таблица 2)				
Други наблюдения				
(Свободен текст)				
Общ резултат				

Забележка: Всеки показател бе оценен съгласно системата в таблици 1 и 2 по-долу. Например, „1” ще бъде вписано в таблицата за резултатите срещу „неподдържане на добър външен вид” (таблица 1), а „5” срещу „специфичен за процедурата показател”, ако двата задни крайника са оценени с „3” и съответно с „2” (таблица 2). В посочените по-долу действия и крайни етапи се вземат предвид изискванията за избягване на тежко страдание, когато това е възможно, но не и умъртвяване на животните по хуманен начин преди получаването на съответните данни, поради което ще е необходимо да се използват допълнително нетретиран животни.

Таблица 1. Система за оценяване по скала за показатели, използвани в таблицата за клиничните резултати

	Резултат
<u>Външен вид</u>	
Нормална < 5 % загуба на тегло	0
5—10 % загуба на тегло	1
11—15 % загуба на тегло	2
16—20 % загуба на тегло	3
20 % + загуба на тегло	ХКЕ
Неподдържане на добър външен вид	1
Нездрава кожа/дехидратация	1
<u>Телесна функция</u>	
Диспнея	2

Таблица 2. Специфичен за процедурата показател — резултат за артрит на лапичката

0	Нормално
1	Еритема и оток на единия глезен
2	Еритема и оток на глезена и проксималната половина на тарзалните стави
3	Еритема и оток на глезена и всички тарзални стави чак до метатарзалните стави
4	Еритема и оток на цялата лапичка, включително пръстите

Настоящата система за оценяване по скала за артрит, използвана като специфичен за процедурата показател, се основава на нарастващите нива на отичане и околоставна еритема. Резултатите се основават на физически преглед и визуално наблюдение и са използвани за изчисление на „артритен индекс”, който се определя като сумата от резултатите за двата задни крайника.

Тахипнея	1
<u>Поведение</u>	
Нежелание за движение	1
Летаргия/апатия	2
Постоянна неподвижност < 24 ч.	3
Неподвижност >24 ч.	ХКЕ
Вокализация по време на манипулациите	1
Вокализация, напрегнатост и нервност по време на манипулациите	2
Вокализация при движение/спонтанност	3
Специфичен за процедурата показател	

Резултат за артрит на лапичката (таблица 2)	0—8
---	-----

ХКЕ: приложени хуманни крайни етапи, независимо от наличието или липсата на други клинични признаци.

Примери за подходящи интервенции в отговор на общите клинични резултати

Действия, които трябва да бъдат предприети	Общ резултат
Увеличена честота на наблюдение; обмислете предоставянето на допълнителни течности/грижи	≥ 4
Преглед на напредъка с ветеринарен специалист	5—15
Хуманни крайни етапи	≥ 16

Забележа: Крайните резултати са взети от таблиците за клиничните резултати, попълнени съгласно системите за оценяване по скала в таблица 1 и 2. Например животно със загуба на телесно тегло 12 %, което е доказателство за неподдржане на добър външен вид и отичане в двата задни глезена, ще има общ резултат 5.

Ретроспективна оценка:

36 плъха бяха имунизирани с говежди колаген тип II в непълнен адювант на Freund (FIA). Всички животни развиха артрит: резултатите за артрит на лапичките бяха 6 до Д 10. При всички животни се наблюдаваше загуба на телесно тегло от 5 до 10 %. При измерване на диаметъра на ставите бе установено, че има значителна промяна спрямо първоначалните данни. Бяха проведени ежедневни наблюдения, които обхващаха неподдржане на добър външен вид, нежелание за движение, апатия, вокализация по време на манипулациите (по време на наблюдението и при смяна на клетката), понижен прием на храна и периоди на неподвижност.

- 12 животни бяха използвани в третирана с физиологичен разтвор група. Най-високите резултати за артрит на лапичките бяха между 6 и 8 за всички измервания (Д 13, Д 16, Д 20 и Д 24). Измерванията на общия диаметър на ставите също показаха значително увеличение спрямо базовите данни за всеки времеви момент. Клиничните резултати варираха между 4 и 8, със загуба на телесното тегло между 5 % и 15 % с изключение на едно животно, при което загубата на телесното тегло достигна 21 % през Д 17 и бе умъртвено по хуманен начин.

Ретроспективна оценка: ТЕЖКА

- 12 животни бяха третирани с ЛЕКАРСТВО А при **ниска** доза. До Д16 при всички животни резултатите за артрит на лапичките не се различаваха от тези на групата, третирана с физиологичен разтвор. През Д 20 едно от животните имаше резултат за лапичките 8, а резултатите на другите бяха от 6 до 7.

През Д 24 пет животни показаха известно понижение на резултатите за артрит на лапичките (5 до 7). Клиничните признаци за тези пет животни показаха известно подобрене, загубата на телесно тегло бе все още понижена с от 5 % до 10 %; подвижността им в клетката също остана понижена.

Другите седем животни не показаха намалени артритни и клинични признаци в сравнение с групата, третирана с физиологичен разтвор.

Ретроспективна оценка: ТЕЖКА

- 12 животни бяха третирани с ЛЕКАРСТВО А при **висока** доза. През Д13 резултатите за артрит на лапичките бяха между 4 и 6; диаметърът на ставите също не показва значително увеличение. Клиничните признаци включваха неподдържане на добър външен вид и загуба на телесно тегло < 10 %. През Д 16 резултатите за артрит на лапичките се понижиха до 4 и беше отчетено значително намаление на диаметъра на ставите. Телесното тегло се стабилизира през Д 16. При някои животни все още се наблюдаваше нежелание за движение. След Д 20 отичането на ставите бе понижено между 2 и 4. В клетката започна да се наблюдава нормално поведение. Телесното тегло бе възстановено до равнищата отпреди процедурата.

Ретроспективна оценка: ТЕЖКА

Забележка: До края на изследването в третата група от дванайсет животни тестовият агент „ЛЕКАРСТВО А”, прилаган във висока доза, се оказва ефективен за понижаване на действителната тежест до „умерена“. Тъй като моделът обаче изисква преди началото на

лечението всички животни напълно да са развили артрит, като това е време, през което животните са показали клинични признаци, съвместими с „тежка” степен на класификация, действителната класификация на тежестта за тези животни се запазва **тежка**.

Тъй като този проект включва тежки процедури, след проведено обсъждане с органа за хуманно отношение към животните, ветеринарния техник и определения ветеринарен лекар, ползвателите извършват редовни текущи прегледи на тежестта, за да се гарантира, че принципът на заместване, намаляване и облекчаване се прилага непрекъснато.

Илюстративни примери за процеса на определяне на тежестта

Модел 4 — Инсулт

Последна актуализация: 05/02/2013

Общ контекст

Инсултът се определя като загуба или промяна на нормалната телесна функция, което е в резултат на недостатъчен приток на кръв до определена част от мозъка. Въпреки вече постигнатото по-добро разбиране на патофизиологията на васкуларното увреждане на мозъка ефективното лечение на инсулта продължава да бъде важна неудовлетворена медицинска потребност, като извършването на научна дейност продължава, с цел да се открият подходящи превантивни и терапевтични мерки.

При пациенти могат да бъдат наблюдавани три различни вида инсулт: исхемичен, интрацеребрален кръвоизлив и субарахноидален кръвоизлив, но повечето от съществуващите към момента животински модели се основават на исхемичния тип. Поради самото си естество моделите на инсулт представляват предизвикателство от гледна точка на хуманното отношение към животните. Доброто взаимодействие и комуникация между всички лица, участващи в научноизследователските процедури (ветеринарни лекари, научни изследователи, ветеринарни техници и персонала, грижещ се за животните), са от решаващо значение, за да се гарантира, че е налице необходимият баланс между реализирането на валиден модел в тази научноизследователска област и свеждането до минимум на страданието на животните.

Инсултът се индуцира при гризачи рутинно чрез временна или постоянна оклузия на срединната мозъчна артерия (оклузия на срединна мозъчна артерия; модел на ОСМА. Този модел на ОСМА има за цел да се възпроизведе по експериментален начин фокалната мозъчна исхемия, която настъпва при инсулт, и е широко използван за изследване на механизмите на увреждане с оглед на определянето на потенциалните цели и за тестване на предполагаеми невропротективни агенти. Идентифицирани са разлики в щамовете при мишки и плъхове, както и в комплексното и значително влияние на възрастта, пола и коморбидните състояния като диабет, хипертензия и атеросклероза. Докато при предклиничните изследвания за инсулт често пъти се използват здрави мъжки млади гризачи, влиянието на фактори, като например описаните по-горе, може да бъде изследвано при използване на модели с коморбидни състояния (напр. спонтанно-хипертензивни плъхове, стрептозотозин (STZ)-индуциран диабет при плъхове). При случаите с

коморбидни състояния може да е необходимо по-внимателно наблюдение на клиничните признаци и по-ранни хуманни крайни етапи (ХКЕ).

При стандартен вид изследване животните са обучени да изпълняват определени тестове за поведенчески реакции преди процедурата за ОСМА. По време на терапевтичния период, установен съгласно механизма на действие на лекарството и целта на изследването, на животните се дават тестови съединения. Анализът на резултатите следва да включва информация за размера на инфаркта, процента на смъртност, честотата на усложненията (напр. субарахноидален кръвоизлив), заедно с функционална и неврологична оценка с цел наблюдение на напредъка. Доказано е, че серия изображения от магнитнорезонансната образна диагностика са мощен инструмент за получаване на информация относно промяната при размера на инфаркта в рамките на определен период, но също така могат да предоставят допълнителна информация относно кръвния поток или метаболитното състояние. Могат да бъдат включени и хистологични, биохимични и молекулярни крайни етапи.

Има различни тестове за поведенчески реакции, които могат да се прилагат към моделите на инсулт. Най-опростеният от тестовете включва системи за неврологично оценяване по скала, които оценяват общия неврологичен статус, както и тестове за наместване на крайници, използвани за измерване на двигателните рефлексии. Те обикновено се използват за оценка на животните през акутната фаза след инсулта. При дългосрочните проучвания могат да бъдат използвани по-комплексни тестове за оценка на сензорната и двигателната функция (напр. тест с двустранна лепенка, ходене по греда, въртяща се пръчка или стълбище) и когнитивните функции, като например паметта (напр. тестове за пасивно избягване или оценка на стратегиите за учене).

Добра практика е да се провеждат група тестове за поведенчески реакции, включително по един за всяка фаза (акутна и дългосрочна), така че да се събере изчерпателна информация относно въздействието върху сензорната, двигателната и когнитивната функция. Тези тестове трябва да бъдат подбрани много внимателно, за да се улови всяко въздействие на предполагаемите терапевтични стратегии. Тук не е включено подробно описание на тези тестове за поведенчески реакции, включително графици за обучение, но за цялостен преглед и обсъждане на тяхната употреба вижте Schaag et al. (2010).

Използвана литература

- Braeuninger S and Kleinschnitz C. Recent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2009 Nov; 1:8.

- Freret T and Bouet V. Improvements of the Stroke Model Guidelines – Animal body weight and long-term functional concerns. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2009; 2(2): 28-31
- Graham SM et al. Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care. *Comparative Medicine*, 2004 Oct; 54(5): 486-496
- Yanamoto H et al. Evaluation of MCAo stroke models in normotensive rats: standardized neocortical infarction by the 3VO technique. *ExpNeurol*, 2003 Aug; 182(2):261-74
- Liu S et al. Rodent stroke model guidelines for preclinical stroke trials (1st edition). *Journal of experimental stroke and translational medicine*, 2009 Jan 1;2(2):2-27.
- Schaar KL et al. Functional assessments in the rodent stroke model. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2010; 2: 13; open access at <http://www.etsmjournal.com/content/2/1/13>
- Virley et al. A temporal MRI assessment of neuropathology after transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlations with behaviour. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000;20: 563-582.

Изследване

Ефикасност на нов терапевтичен агент върху модел на интралуминална оклузия на срединна мозъчна артерия (ОСМА) чрез въвеждане на нишки при плъхове

При този пример 40 млади мъжки плъха от вида Sprague-Dawley (300—350 g) ще бъдат подложени на постоянна ОСМА, като се използва техника с интралуминален филамент при обща анестезия. Плъховете ще бъдат разделени на случаен принцип (n=10/група), за да получат или носител (10ml/kg), или нов тестови агент (съединение А) при 1, 3 или 10 mg/kg, които се вливат интравенозно в опашната вена около 1 час след началото, 30 мин. след ОСМА. Последващите дози (носител или съединение А при 1, 3 или 10 mg/kg) ще бъдат прилагани интраперитонеално на 6-ия и на 24-ия час след ОСМА. Първоначално плъховете ще бъдат настанени по двойки в клетки с твърдо подово покритие, с дълбока постеля и материал за гнездене. По време на предварителната подготовка храненето ще бъде ограничено, с цел да се улесни изпълнението на теста със стълбището, който е задача за мотивиране на апетита. На животните ще им бъде давана храна *ad libitum* от 6-ия час преди операцията до 6-ия ден след ОСМА, за да се подобри следоперативното тегло и възстановяването.

Функционалният резултат ще бъде оценяван ежедневно, като се използва система за неврологично оценяване по скала (скала на Bederson; вж. Schaar et al. 2010) и тестове за поведенчески реакции (тестове с двустранна лепенка и ходене по греда). Тестът със

стълбичка също ще се провежда всеки ден от 7-ия ден след ОСМА, за да се осигури достатъчно време за следоперативно възстановяване, преди отново да се въведе ограничение за хранене. Не се очаква нито един от тестовете за поведенчески реакции да предизвика значителен дистрес. Магнитнорезонансната образна диагностика (MRI) ще бъде приложена на анестезирани плъхове на ден 1, 7, 14 и 28, за да се оцени обема на лезиите. Всички животни ще бъдат умъртвени на 28-ия ден след ОСМА.

Първоначална прогнозна оценка и разглеждане на конкретни облекчения и хуманни крайни етапи

Какви действия спрямо животните са обхванати в настоящото изследване?	Какво ще изпитат животните? Колко страдание би могло да им бъде причинено? Какво би могло да доведе до влошаване?	Как страданието ще бъде сведено до минимум?	
	Неблагоприятни въздействия	Методология и интервенции	Крайни етапи
Предоперативна подготовка за тестове за поведенчески реакции за период от 2—3 седмици: тест с двустранна лепенка (за контралатерален неглект), ходене по греда (за координация на задни крайници) и тест със стълбище (за умение за достигане с предните лапички)	Преди животните да са привикнали към тестовете, е възможно да изпитат минимален стрес/да бъдат неспокойни, тъй като тестването включва преместване на животните в нови помещения/места	Постепенно привикване към апаратурата за изпитване Спокойствие, щадящо отношение по време на манипулациите	Отстраняване от сесията, ако се наблюдават признаци за дистрес Животни, които не постигнат базовия резултат в рамките на предварително зададения срок, ще бъдат изключени от

			изследването
Ограничаване на храненето (85—90 % от теглото при свободно хранене, предоперативно и от 7-ия ден след ОСМА за по-лесно изпълнение на теста със стълбището	Слабо усещане за глад, възможно разстройване и безпокойство	Загубата на телесното тегло да не надвишава 10 %, в противен случай ще бъде прекратено ограничаването на храненето	Ако се наблюдават поведенчески проблеми, дължащи се на липсата на прием на храна, животните ще бъдат отстранени от изследването
Под обща анестезия, временна (90 мин) оклузия на срединна мозъчна артерия (СМА) с интралуминално използване на нишки, които се въвеждат през общата каротидна артерия	Болка и дискомфорт, свързани с операцията Възможни неочаквани хирургични усложнения, напр. субарахноидален кръвоизлив, ипсилатерално увреждане на ретината, образуване на интралуминални тромби, мозъчен оток, свързан с хипоталамуса, с последваща хипертермия или временна мускулна некроза. Те могат да се проявят по много различни	Използване на подходящи анестетици с минимална степен на отхвърляне, заедно с подходящи аналгетици (т.е. ефикасни, дори и с минимални невропротективни свойства) Добре обучен хирург, използващ подходяща асептична хирургична техника (с редовни прегледи на успеваемостта) Поддържане на хомеостаза	Животните ще бъдат умъртвени по хуманен начин, ако възникне някой от следните проблеми— <ul style="list-style-type: none"> • Значителни технически проблеми, появили се по време на операцията • Липса на пълно възстановяване след анестезията • Признаци за неочаквани

	<p>начини, напр. внезапен колапс, парализа, силно изразено накланяне на главата, припадъци</p> <p>Апатия и потенциални последици от анестезията върху физиологичните променливи (напр. хипотермия, хипотензия, хипоксия)</p> <p>Слаб прием на храна в резултат от пониженото ниво на съзнание, нарушена дъвкателна способност и слаба подвижност, обикновено през първите 48 часа след ОСМА</p> <p>Степен на опорно-двигателния дефицит,</p>	<p>по време на анестезията</p> <p>Използване на стандартизирани моноvlakна и хирургична техника за намаляване на изменчивостта и усложненията, произтичащи от обширни лезии</p> <p>Интензивни следоперативни грижи за първите 3—5 дни, включително използване на външни източници на топлина</p> <p>Редовни проверки на телесното тегло; ежедневно наблюдение и грижи за раните</p> <p>Осигуряване на леснодотъпна храна и вода по време на</p>	<p>хирургични усложнения</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ако загубата на телесното тегло на животното надвишава с 20 % теглото преди операцията, въпреки допълнителното хранене и/или ехидратация или ако останат неподвижни за повече от 24 часа
--	--	---	---

	която може да причини стрес и/или безсилие	възстановителния период или допълнителна храна (каша, течност) и помощ при хранене, ако е необходимо; рехидратация (напр. чрез инжектиране на физиологичен разтвор), ако е необходимо	
Тестове за поведенчески реакции (тест с двустранна лепенка и тест с ходене по греда) провеждани ежедневно от ден 1 до ден 28 след ОСМА; тест със стълбище, изпълняван ежедневно от ден 7 след ОСМА	Животните могат да приемат задачите за стресиращи, ако двигателните им способности са изложени на риск	Устройство за наблюдение за поведенчески показатели на тревожност или дистрес. Животните ще бъдат наблюдавани текущо време от опитен персонал	Обикновено максималното време (прекъсване) за изпълнение на зададената задача е определено и се дава краен резултат
Подкожно/интравенозно/интраперитонеално прилагане на нов терапевтичен агент преди и/или след операцията (профилактично/терапевтично)	Краткотраен дискомфорт, свързан с начина на прилагане. Не се очакват нежелани ефекти при равнищата на прилаганата доза	Прилагане съгласно използваните добри практики, по възможно най-безболезнен/причиняващ най-малко дистрес начин, и възможни техники в съответствие с научните цели. Животните ще бъдат внимателно наблюдавани за	Животните ще бъдат умъртвени по хуманен начин, ако се наблюдават каквито и да е тежки странични ефекти вследствие на новите терапевтични агенти

		нежелани въздействия на тестваните вещества	
Надлъжен ЯМР под упойка през 1-ви, 7-ми, 14-ти и 28-и ден след ОСМА.	Повтаряща се анестезия Апатия и потенциални последици от анестезията върху физиологичните променливи (напр. хипотермия, хипотензия, хипоксия)	Използване на подходящи анестетици с минимална степен на отхвърляне Поддържане на хомеостаза по време на анестезията, включително течна терапия преди или по време на анестезията, ако възникнат проблеми с дехидратация, и затопляне за поддържане на нормотермия	Животни, които не са се възстановили напълно след анестезията, ще бъдат евтаназирани Животните ще бъдат умъртвени по хуманен начин, ако след възстановяване не може да се поддържа хомеостазата

Анализ

Този модел се определя като ТЕЖЪК поради включената хирургична процедура, неблагоприятните (но обикновено преходни) въздействия на ОСМА, компрометиращи хуманното отношение към животното, както и възможността за значителни периперативни усложнения. Негативното въздействие върху хуманното отношение към животните обаче може да бъде намалено чрез интензивни следоперативни грижи в рамките на поне първите 48 часа и внимателно наблюдение на последващата фаза, като се предприемат незабавни действия, ако има някакъв проблем. От експериментална гледна точка вниманието, отделено за облекчаване и стандартизация на всяка една процедура, може да доведе до понижена честота на усложненията и изменчивостта и следователно до по-добро качество на данните и намаляване на броя на използваните животни.

Подходящата прогнозна класификация на тежестта е ТЕЖКА

Може ли тежестта да бъде УМЕРЕНА?

Въпреки че прогнозната тежест на този модел винаги ще бъде ТЕЖКА поради описаните по-горе причини, честотата на тежките последици може да бъде намалена при изпълнение от опитни оператори, заедно с експертен ветеринарен надзор и грижи за животните, както и със съгласувани ранни интервенции, ако възникнат усложнения. В някои случаи потенциално е възможно да бъде разрешена УМЕРЕНА тежест, но само когато това става въз основа на всеки отделен случай на отделни изследователски групи, които имат доказан опит с този конкретен модел и е известно, че могат да използват модела, без да причинят повече от умерено страдание.

Клинично наблюдение

Животните се наблюдават много внимателно по време на следоперативния период. При необходимост са предвидени и аналгезия и локална поддържаща терапия.

В края на този пример е включен пример за комбинирана система за неврологично/клинично оценяване по скала, която се използва, за да се подпомогне наблюдението на клиничното състояние на животните по време на процедурата.

Резултати

Всички животни, с изключение на едно от групата, третирана с носителя, се възстановиха след операцията, без да има неочаквани усложнения, в резултат на осигурената интензивна периоперативна подкрепа.

- Всички 10 животни, третирани с носителя, показаха най-ниския неврологичен резултат по време на изследването, заедно със слабо представяне на тестове за поведенчески реакции в сравнение с тези на третираните животни. Клиничният резултат бе подобен на този на третираните животните непосредствено (първите 48 ч.) след ОСМА, след което бяха наблюдавани различия сред животните в групата, третирана с носителя:
 - 1/10 трябваше да бъдат евтаназирани на втория ден от следоперативния период поради загуба на телесно тегло >20 % (въпреки допълнителното хранене и рехидратация)

Оценка: ТЕЖКА

- 6/10 развиха умерен неврологичен дефицит, но показаха минимално подобрение на клиничния резултат в течение на времето
Оценка: ТЕЖКА
 - 3/10 животни развиха умерен неврологичен дефицит и показаха постепенно намаляване на клиничния резултат в течение на времето, вероятно в резултат на тяхната способност да компенсират и да се адаптират към дългосрочен неврологичен дефицит
Оценка: УМЕРЕНА
- Всичките 20 животни, третирани със съединение А при по-ниски дози (1 и 3 mg/kg), показаха подобрение при неврологичното оценяване по скала след 48 ч. след ОСМА, заедно с подобрение при клиничното оценяване по скала.
Оценка: УМЕРЕНА
 - Всичките 10 животни, третирани със съединение А при най-високи дози (10 mg/ kg), показаха подобрение при неврологичното оценяване, сравнено с групата, третирана с носителя след 24-ия час след ОСМА, само минимална (5 %) загуба на телесното тегло 24 часа след операцията и значително подобрение на клиничния резултат след 48 ч. след ОСМА.
Оценка: УМЕРЕНА

Оценка на действителната тежест

При 7 животни се счита за **ТЕЖКА**; при 33 животни се счита за **УМЕРЕНА**

Система за оценяване по скала

Оценката на тежестта се извършва чрез комбинация от общи клинични наблюдения (телесно тегло, външен вид, поведение, жизнена среда в клетката), заедно със специфична за процедурата неврологична оценка. Скалата на Bederson представлява обща неврологична оценка, която е разработена за измерване на неврологични увреждания след инсулт. Използва се скала за класификация от 0 до 3, като 0=нормално, а 3=най-високата степен на немощ. Тестовете включват флексия на преден крайник, устойчивост на страничен натиск и поведение при въртене в кръг.

Степен 0: няма наблюдаван дефицит

Степен 1: флексия на преден крайник

Степен 2: намалена устойчивост на страничен натиск (и флексия на преден крайник) без въртене в кръг

Степен 3: същото поведение както при степен 2, с въртене в кръг

ХКЕ: хуманен краен етап

	Резултат
Външен вид	
5—10 % загуба на тегло	1
11—15 % загуба на тегло	2
16—20 % загуба на тегло	3
20 % + загуба на тегло	ХКЕ
Леко рошава козина	1
Лека пилоерекция	2
Значителна пилоерекция	3
Поведение	
Леко нарушен вървеж	1
Значително нарушен вървеж	2

Действия	
Резултат 1	Преглед на честотата на наблюдение
4	Осигуряване на допълнителна помощ, напр. допълнителни течности и течна каша
5	Преглед на напредъка с ветеринарен лекар
12	Прилагане на хуманен краен етап

Значителни проблеми с движението	3
Неподвижност >24 ч.	ХКЕ
Напрегнатост и нервност по време на манипулациите	2
Значителен дистрес по време на манипулациите, напр. треперене, вокализация, агресивност	3
Жизнена среда	
Недостатъчно добре оформено гнездо	1
Едва разпознаваемо гнездо	2
Няма гнездо	3
Неврологично оценяване	
Флексия на преден крайник	1
Понижена устойчивост на страничен натиск (и флексия на преден крайник) без въртене в кръг	2
Същото поведение както при степен 2, с въртене в кръг	3

Действия — Имайте предвид, че тъй като усложненията от хирургични намеси се проявяват обикновено през периода на непосредствено следоперативно възстановяване, строгото наблюдение и експертната щадяща оценка са от съществено значение през първите 24 часа, за да се гарантира, че неблагоприятните въздействия са установени и са предприети действия за справянето с тях, както и че животните се умъртвяват по хуманен начин, ако страданието им надхвърля категоризирането му като тежко.

Пример за отделна таблица за наблюдението (дни 0—4)

Ден	0	1	2	3	4
<u>Външен вид</u>					
Телесно тегло (g) (резултат)	320 (0)	292 (1)	285 (2)	287 (1)	292 (1)
<u>Състояние на козината</u>					
Рошава козина/пилоерекция	1	1	0	1	0
<u>Поведение</u>					
Вървеж	3	2	2	2	1
Поведение по време на манипулациите	0	0	2	0	0
<u>Жизнена среда</u>					
Състояние на гнездото	3	2	1	0	0
<u>Специфично за процедурата неврологично оценяване</u>	2	2	1	1	1

Общ резултат	9	8	8	5	3
Обем на лезиите (оценка при ЯМР)*		11 %			
<u>Други наблюдения</u>	Възстановява се безпроблемно от операцията, без усложнения Дозиране на 30 мин. и 6 ч.	Движи се около клетката и се опитва да си направи гнездо	Тестове за поведенчески реакции, тревожност в началото, но всички са завършени, гнездото е по-добре оформено	Козината не е толкова добре поддържана днес, но нормално тегло и добре оформено гнездо	Приключени тестове за поведенчески реакции, по-малка тревожност и значително подобрен вървеж

* „обем на лезиите“ (оценка с използване на ЯМР) е добавен за изследователите, за да го включат в края на изследването. Тези данни могат да бъдат съпоставени с клиничните наблюдения и тези върху поведението, с цел да се гарантира по-нататъшно усъвършенстване на наблюдението, грижите за животните и процедурите.

Илюстративни примери за процеса на определяне на тежестта Модел 5 — Производство на поликлонални антитела при зайци

Последна актуализация: 05/02/2013

Общ контекст

Основната цел на производството на антитела в лабораторни животни е да се получат антисеруми с висок титър и висок афинитет за използване в експериментални или диагностични тестове.

Модерната биология и биохимия разчитат на наличието на много специфични антитела, които да използват в разнообразни техники, напр. имунохистохимия, ензимосвързани имуносорбентни анализи, имунопреципитация и имуноблотинг. По този начин произвеждането на голямо количество специфични антитела, насочени към протеини или пептиди, представляващи интерес, е от съществено значение за успеха на много основни и приложни научноизследователски програми.

В този пример ще бъде използван заек с цел производство на антитела срещу къси пептиди, които се считат за важни за регулиране на клетъчното деление, като част от научноизследователска програма, включваща биохимични изследвания на деленето на клетките на бозайниците.

Използвана литература

- Canadian Council on Animal Care guidelines on; antibody production (2002). Download at http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Antibody_production.pdf
- EFPIA/ECVAM (Diehl K-H et al.) (2001) A good practice guide to the administration of substances and the removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* **21**: 15-23
- JWGR (2001) Refining procedures for the administration of substances. *Laboratory Animals***35**: 1-41
- Keating SCJ, Thomas AA, Flecknell PA & Leach MC (2012) Evaluation of EMLA cream for preventing pain during tattooing of rabbits: changes in physiological, behavioural and facial expression responses. *PLOS ONE***7(9)**: e44437 (open access, <http://www.plosone.org>)

- Leenars M, Hendriksen CFM (2005) Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendation. *ILAR Journal* **46**:269-279
- Stills HF (2005) Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR Journal* **46**:280-293
- UFAW/RSPCA (2008) *Refining Rabbit Care: A Resource for Those Working With Rabbits in Research*. Southwater, UK: RSPCA (free download at <http://www.rspca.org.uk/researchrabbits>)

Изследване

Въз основа на предишен опит бе установено, че един заек може да осигури достатъчно материал за всеки пептид, представляващ интерес. Заекът ще бъде настанен за подово отглеждане в клетка в стабилна група от съвместими зайци (също използвани за производство на антитела), като ще му се осигури достатъчно място за облагородяване на жизнената среда, движение и нормално социално поведение (UFAW/RSPCA 2008). Животното ще бъде имунизирано с комбинация от антиген/адювант. На предварително определени времеви етапи ще бъде направен анализ на малки по обем кръвни проби, за да се определи дали имунизацията е била успешна. Когато бъде получен подходящият титър антитела, животното ще бъде подложено на обезкървяване при дълбока анестезия, без възстановяване, за да бъдат събрани антителата в кръвта.

Извършването на манипулацията със зайците може да бъде стресираща, поради което следва да се изпълнява единствено от компетентен и проявяващ щадящо отношение персонал. Поведението на зайците може да бъде трудно за тълкуване, поради което е добра практика да се познава литературата, свързана с поведението на зайците и хуманното отношение към тях. Например в най-новата литература се посочва, че при определени обстоятелства зайците могат да правят „физиономии, изразяващи болезненост“ (Keating et al. 2012), като възможността това да се използва като инструмент за оценка на хуманното отношение към животните следва да бъде разгледана за всеки отделен случай.

Поради слабата имуногенност на късите пептидни вериги ще бъде необходимо те да се прилагат в комбинация с адювант. Преди е бил използван пълният адювант на Freund (FCA), но в момента има синтетични адюванти, които също са ефективни за тази процедура и предизвикват минимално дразнение.

Първоначална прогнозна оценка и разглеждане на специфични облекчения и хуманни крайни етапи

Какви действия спрямо животните са обхванати в настоящото изследване?	Какво ще изпитат животните? Колко страдание би могло да им бъде причинено? Какво би могло да доведе до влошаване?	Как страданието ще бъде сведено до минимум?	
	Неблагоприятни въздействия	Методология и интервенции	Крайни етапи
Имунизация с антиген и адювант; три подкожни инжекции на 8-ми, 22-ри и 37-ми ден	<p>Дискомфорт след инжектирането.</p> <p>В резултат на прилагане на адюванта могат да се образуват неболезнени бучки</p> <p>Възможност (рядко) за улцерация на мястото на инжектиране</p>	<p>Обемът, формулировката и честотата на инжектиране ще бъдат в съответствие с насоките за най-добри практики (напр. EFPIA/ECVAM или JWGR), обикновено не повече от четири места и 0,25 ml за всяко място</p> <p>Всяка появила се рана ще бъде третирана незабавно от ветеринарен лекар по най-подходящия начин</p>	<p>Животното ще бъде умъртвено по хуманен начин, ако има каквито и да било признаци за продължителен дискомфорт, болка или дистрес (напр. продължително внимание към местата на инжектиране или бучките) или ако се образуват рани, които не заздравяват</p>
Вземане на кръвни проби за оценка на антителата (до пет пъти)	<p>Улавяне, манипулации и ограничение, които могат да бъдат стресиращи.</p> <p>Лек дискомфорт, свързан с</p>	<p>Пробите ще бъдат вземани от повърхностната (ушна) вена</p> <p>Малко количество кръв (<5 ml), само за проверка на титъра на</p>	<p>Ако в резултат на процедурата животното е прекалено стресирано, вземането на проби трябва да бъде отложено</p>

	убождането с игла. Нисък риск от образуване на кръвоизлив или хематом	антителата. Притиснете мястото за вземане на пробата	до възвръщане на нормалното за животното поведение
Обезкървяване под обща анестезия	Лек дискомфорт и възможна непоносимост към агента при въвеждане в анестезия	Използван е анестетик с минимална степен на отхвърляне	Животното ще остане под анестезия до смъртта си

Анализ

В резултат на облекченията при отглеждането и грижите, добрата практика за прилагане и вземане на пробите и избора на адювант с минимално дразнение се очаква единствено лека степен на тежест.

Подходящата прогнозна класификация на тежестта е ЛЕКА.

Може ли процедурата да бъде допълнително облекчена?

Възможността за използване на адювант с минимално дразнение и анестетици с по-малка степен на отхвърляне трябва редовно да се преразглежда, като се прави преглед на литературата и въпросът се обсъжда с колеги. За по-нататъшно намаляване на стреса може да бъде създадена програма за приучаване на млади зайци към манипулациите (UFAW/RSPCA, 2008).

Клинични наблюдения

Тъй като при това изследване се очакват единствено слаби неблагоприятни въздействия, се използва система за основно наблюдение, т.е. животните се проверяват ежедневно и наблюденията са записани, но се счита, че е необходима таблица за структуриран тип запис.

В края на този пример е даден илюстративен пример за таблицата за наблюдението.

Оценка на действителната тежест

Беше отчетено моментно леко отичане на едно от местата на инжектиране, но за това не се изискваше лечение. За кратко време заекът показва известно внимание към мястото на инжектиране, но се счита, че това е признак единствено на лек дискомфорт. Не се наблюдава „физиономия, изразяваща болезненост“.

Не са наблюдавани неблагоприятни въздействия, дължащи се на самото вземане на кръв от ушната вена.

Действителната тежест, която се счита за подходяща за това животно, е **ЛЕКА**.

Примерна таблица за наблюдението

Производство на антитела при зайци — Таблица за процедурите и наблюдението		
Дата	Телесно тегло (kg)	Коментари
01/03	3,5	Предварително кървене — 5 ml ушна вена ; няма отбелязани неблагоприятни въздействия
02/03		Няма установени аномалии (НУА)
06/03		НУА
07/03		НУА
08/03	3,6	Имунизиран — 0,25 ml x 2 места s/c, слабо внимание към местата (поддържане на козината) за няколко минути, след това нормално поведение

09/03		НУА
10/03		НУА
11/03		НУА
12/03		Слабо и меко неболезнено отичане на лявата страна
13/03		Все още се наблюдава отичане на лявата страна без влошаване
14/03		Отичането на лявата страна все още е налице, но не е болезнено при палпиране
15/03	3,6	Отокът е изчезнал, всичко е в норма

21/03		НУА
22/03	3,6	Имунизиран — 0,25 ml x 2 места s/c, кратко внимание към местата

28/09		НУА
29/03	3,7	НУА
30/03		Тестово кървене — 2 ml ушна вена, без неблагоприятни въздействия

05/04		НУА
06/04	3,6	Имунизиран — 0,25 ml x 2 места

14/04	3,6	НУА
15/04		Тестово кървене — 2 ml ушна вена, без неблагоприятни въздействия

26/04		НУА
27/04	3,6	Обезкървен под обща анестезия, няма неблагоприятни въздействия

Следва да се съхранява потвърждение, че животното е било проверявано поне ежедневно — напр. като индивидуални данни за животното (както е показано по-горе) или като данни за помещението.

Илюстративни примери за процеса на определяне на тежестта

Модел 6 — Производство и отглеждане на генетично изменени (ГИ) животни

Последна актуализация: 05/02/2013

1. Общ контекст

Използването на генетично изменени (ГИ) животни в научни изследвания е допринесло за разбирането на функцията на гените и съответните им протеини. Различните фенотипове могат да оказват различно въздействие върху хуманното отношение към животните, а някои могат да причинят болка, страдание или дистрес. Въпреки че някои фенотипове и резултати са предсказуеми, при създаването на генетично изменени линии могат да се проявят много непредсказуеми или вторични белези, така че невинаги е възможно да се предскаже точно тежестта. На практика при много генетично изменени линии фенотипът не е засегнат и могат да бъдат създадени протоколи за оценка, за да се гарантира, че ще бъдат открити всички неблагоприятни фенотипове. Друг вариант е очакваният фенотип често пъти да бъде свързан с непредвидими вторични фенотипове, които се проявяват по различно време и могат да бъдат засегнати от различни фактори на околната среда.

Когато се прави оценка на действителната вреда за животните, следва да бъдат взети предвид множество фактори, например вида на мутацията, генотипа, фенотипа и стратегията за развъждане (напр. избягване на вредни хомозиготни фенотипове чрез чифтосване на хетерозиготни видове с диви видове), заедно с естеството на всички допълнителни научни или животновъдни процедури и възможното въздействие на всички тях. Систематичните и подходящите навременни наблюдения както по време на прогресията на колонията, така и по време на експерименталната фаза на колонията са необходими за ефективното оценяване на хуманното отношение към животните.

Новите линии трябва да бъдат наблюдавани внимателно и да се подлагат на стандартна оценка за хуманно отношение към животните. Всички линии следва да се оценяват индивидуално от подходящо обучен и компетентен персонал по време на нарастването и отглеждането на колонията, както и следва да бъде събрана и докладвана информация относно специално наблюдавани неблагоприятни въздействия. Всички включени научни процедури следва да се прилагат от лицензиран персонал, който заедно с

персонала, грижещ се за животните, трябва и да наблюдава и записва всички въздействия върху животните. Следва да бъдат определени и бъдещи хуманни крайни етапи в връзка с параметри като загуба на тегло, състояние на организма и поведение, показващо безпокойство, заедно със специфичните характеристики на развитието. Нито едно животно не следва да остане живо, ако границата на очакваната тежест бъде превишена, освен ако това не е резултат на непреодолим научен интерес, а дори и тогава това е възможно единствено с разрешение от компетентния орган.

Характерът, синхронизирането и продължителността на наблюденията ще зависят от редица фактори, различни от приложената мутация. Например генетичният фон и условията на околната среда, при които животните се отглеждат, могат значително да променят проявата на фенотипа. Тези конкретни фактори следва да бъдат отбелязани точно, за да се направят по-добри сравнения между съоръженията и наблюдението на генетично изменените животни като цяло. Животът на всяка линия в определено съоръжение също следва да бъде взет под внимание, тъй като при някои фенотипове се наблюдава късна проява и поради това те ще бъдат наблюдавани единствено ако животните се задържат за по-дълъг период от време.

Използвана литература

RSPCA GA Passport Working Group (2010) *GA Passports: The Key to Consistent Animal Care*. Southwater, UK: RSPCA (download at <http://www.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals/implementing3rs/gapassport>)

Wells DJ et al (2006) *Assessing the welfare of genetically altered mice* *Laboratory Animals* **40(2)**: 111-114 (download at <http://www.nc3rs.org.uk/downloaddoc.asp?id=356&page=231&skin=0>)

2 Примери

Трите примера в раздели 2.1—2.3 по-долу показват как може да бъде оценена тежестта при генетично изменени мишки, включително се прави преглед на нови етапи в развитието, влияние на процедурите и развитие на колонията. Всеки пример е с акцент върху принципите за оценяване на тежестта вместо да се вземат предвид всички възможни сценарии по време на развитието на колонията.

Създаването на всеки модел ще следва стандартизирани процедури, които изискват хирургична подготовка на вазектомирани расови мъжки екземпляри, манипулиране на ембриони и тяхното имплантиране по хирургичен път в псевдобременни женски. Предполага се наличие на добра практика във връзка с асептиката, овладяването на болката и компетентността на хирурга.

Потвърдението за наличието в родоначалника или в поколението от зародишната линия ще бъде установено от тъканни проби, получени като вторичен продукт на идентификацията (прорез на ухото) или при по-малко инвазивен метод, който осигурява достатъчно тъкан за извършване на оценка на генотипа. Стратегията за определяне на фенотипа за всяка линия ще зависи от гена, изследваното пространство и очакваните въздействия. Оценката на тежестта ще се определя от серия стандартизирани наблюдения.

2.1 Модел на генетично изменена мишка — ген $A^{tm1a(\text{Funding})\text{Lab}}$

2.1.1 Общ контекст

Беше създадена колония мишки с нова мутация в ген A , която бе насочена към клетъчна линия от ембрионални стволови клетки с произход от C57BL/6N с неизвестен фенотипен потенциал. Този модел бе поддържан въз основа на определен произход (C57BL/6N). След като бе установено прехвърлянето на зародишната линия на G1 мишки, бе проведена и основна скринингова оценка на хуманното отношение с използването на 30 малки от 3 до 5 котила от независими чифтосвания. Поколението бе наблюдавано през основните етапи от развитието на колониията — при раждането, на 14-ия ден след раждането (във връзка с идентифицирането на малките и възстановяването на тъкан за определяне на генотипа) и при отбиването. Въз основа на схемата за оценка на хуманното отношение към генетично изменените животни (Wells et al. 2006) бе разработена подходяща таблица за резултатите. Наблюденията на малките бяха извършени от ветеринарни техници в самите клетки, заедно с отговорниците за колониите, които наблюдават съотношенията на генотипа. След като стана възможно да бъдат отбити, мишките бяха настанени по групи в клетки с отделна вентилация, съдържащи материал за постилане, гнездене и облагородяване на жизнената среда, в зависимост от нуждите. Ветеринарните техници извършиха оценка в самите клетките по време на ежедневната им работа с мишките до достигане на полова зрялост на мишките. По-дългосрочни оценки на неблагоприятни въздействия върху хуманното отношение към животните, свързани с

възрастта, бяха наблюдавани и записани при животни източници и при източници за бъдещо развъждане. Всички наблюдения бяха сравнени с основния щам и бе оценена тяхната приложимост.

2.1.2 Прогнозна оценка

Какви действия спрямо животните са обхванати в настоящото изследване?	Какво ще изпитат животните? Колко страдание би могло да им бъде причинено? Какво би могло да доведе до влошаване?	Как страданието ще бъде сведено до минимум?	
	Неблагоприятни въздействия	Методология и интервенции	Крайни етапи
Базови ефекти на генетичните изменения	<p>Генетичните модификации могат да доведат до клинично неблагоприятни въздействия</p> <p>В случаите, когато те са непредсказуеми, всеки признак, че животните с мутация са се отклонили от нормалните физически или поведенчески параметри (т.е. тези, за които се знае, че се наблюдават при фенотипове, свързани с генетичния произход, и/или контролни видове диви животни) може да се обозначи като проблем във връзка с хуманното</p>	<p>Текущ мониторинг в клетката</p> <p>Оценка на хуманното отношение при определени времеви етапи от развитието; раждане, отбиване и полова зрялост</p> <p>В зависимост от естеството на всяко едно от неблагоприятните въздействия ще бъдат приложени подходящи фактори за облекчаване, когато е възможно, напр. промяна на</p>	<p>Животните ще бъдат умъртвени, ако тежестта надвишава умерената</p>

	отношение към животните	стратегии за развъждане или облекчаване на отглеждането (напр. по-голямо количество материал за гнездене, за да се подпомогне нарушената терморегулация)	
Вземане на тъканни проби за определяне на генотипа	<p>Възможна болка и/или дистрес, причинени от методология за вземане на тъканни проби, напр. продупчване/прорязване на ухото или „заостряне“ на опашката.</p> <p>Биопсията от опашката се използва обикновено когато се изисква по-голямо количество ДНК, но може да предизвика както краткотрайна, така и дълготрайна болка (последната поради формиране на неврома)</p>	<p>При определяне на отделни животни с използване на прорези на ухото добра практика е тъканта от ухото да се използва за определяне на генотипа, когато е възможно</p> <p>За „заостряне“ на опашката трябва да се вземат минимални количества от опашката (имайте предвид, че многократното вземане на проби е крайно нежелателно), когато е подходящо, следва да се използват анестезия и аналгезия, а прекомерното кървене трябва да бъде овладяно незабавно</p>	<p>Не се прилагат, тъй като процедурата следва да бъде едно „изключение“ и е малко вероятно да се причинят болка или дистрес до равнище, при което ще е необходимо животните да бъдат умъртвени по хуманен начин</p>

		Развитието на по-малко инвазивни техники следва да се наблюдава, да се оценява на локално равнище и да се прилага, когато това е възможно	
Определяне на фенотип	Стрес, предизвикан от манипулации или прилагане на фенотипен анализ, напр. стрес от поставяне в непозната среда, прилагане на експериментални съединения за предизвикване на реакция, инфекциозен мониторинг, анестезия и ограничаване за образна диагностика и т.н.	Обучаване на персонал, който да извършва определянето на фенотипа в рамките на компетентни, щадящи и стандартизирани манипулации и наблюдения Използване на анестезия по време на образната диагностика или болезнени процедури. Структуриране на фенотипни тестове, за да се премине от най-малко инвазивните (напр. наблюдение на поведението в открити пространства) към най-инвазивните (напр. процедури, изискващи анестезия)	Когато мутацията предизвика тежка реакция към фенотипния анализ, ще бъдат достигнати хуманните крайни етапи и животните ще бъдат умъртвени по хуманен начин

Генът, който е обект на изследването, е нов мутант, който обаче е с неизвестни неблагоприятни въздействия. Опитът при такъв вид установяване показва, че при по-голямата част от подобни на този модели обикновено се проявява лек фенотип. Въпреки това

понякога даден модел ще прояви неочаквано умерени клинични признаци и следователно въз основа на това този пример може прогнозно да бъде класифициран като УМЕРЕН.

2.1.3 Резултати

Първоначална оценка при новородени животни (при раждане):

Цвят на малките (само за новородени)	Нормален
Дейност на малките (само за новородени)	Нормална
Милиуми (само за новородени)	Налице
Котило	Всички малки отговарят на основните параметри по отношение на размера на котилото, хомогенността на котилото, растежа и развитието на малките

Следните показатели бяха наблюдавани на 14-ия ден след раждането и след отбиването:

Цялостен външен вид	Всички малки са „морфологично“ нормални Не се наблюдават показания за малформации
Размер, форма и растеж	Нормален растеж съгласно стандартната крива за растежа за основния щам
Състояние на козината	Нормално
Поведение — стойка, вървеж, дейност и взаимодействия с околната среда	Нормално поведение и взаимодействие между всички обитатели на клетката; не се наблюдава хиперактивност или агресия
Клинични признаци	Няма открити
Относителен размер	Нормален в сравнение с основния
Брой	Процента на смъртност преди отбиването е нормален спрямо основния

Клинични наблюдения

Всички наблюдения и съотношения по отношение на новородените малки при отбиване бяха сметени за нормални във връзка с генетичния произход от (C57BL/6N) с хомозиготни, хетерозиготни и диви видове мишки, родени при нормално Менделово съотношение.

На четириседмична възраст хомозиготни и диви видове контролни мишки (7+7) бяха подложени на серия от наблюдения и леки процедурни тестове, напр. SHIRPA, дисморфология, открито поле, кръвна клинична химия, DEXA и Faxitron изображения около 16-та седмица. В края на този експеримент анализът на фенотипа показва намаляване на клирънса на глюкозата при хомозиготни мишки след интраперитонеален глюкозотолерантен тест (ipGTT). Въпреки че по време на теста клирънса на глюкозата бе намален, след процедурата всички животни се върнаха към тяхното основно състояние и не бяха отчетени по-нататъшни неблагоприятни въздействия.

2.1.4 Анализ на резултатите

Оценка на действителната тежест

След създаването ѝ при отглеждането и нарастването на колонията са използвани хетерозиготни мишки и котила от див вид. При нито една от мишките, използвани за развъждане и отглеждане, не са наблюдавани вредни фенотипове, така че се счита, че не са проявени неблагоприятни ефекти. Тъй като не се очаква вреден фенотип, тази линия би могла да бъде направена хомозиготна и да се отглежда без разрешение за проекта.

Горепосоченото чифтосване на хетерозиготни с хетерозиготни мишки, води до появата на хомозиготни мишки. Група от тези мишки бе използвана за стандартна проверка на образуване на фенотип, състояща се от поредица от леки протоколи, включително вкарване на игла за вземане на кръвни проби при глюкозотолерантен тест. При извършване на тестовете бе осъществен и контрол на дивите видове. Кумулативното въздействие върху мишките би следвало да бъде леко в резултат на вземането на кръвни проби и последващите процедури за определяне на фенотипа, за разлика от общото въздействие на генетичните изменения.

Обобщение

Развъждане и отглеждане — няма неблагоприятни въздействия

Хомозиготни мишки + контролни мишки — ЛЕКО — по силата на скрининговите тестове (а не на въздействието на генетичните изменения)

Като обобщението може да се счита, че ГИ мишки имат безвреден фенотип. Развъждането на установени линии не изисква разрешение за проекта съгласно Директивата.

2.2 Модел на генетично изменена мишка — *Tg(ген B)^{Labcode}*

2.2.1 Общ контекст

Колония от мишки, които имат мутация, свръхекспресираща трансген, ще бъде създадена като модел за изследване на форма на рак. Линията ще бъде създадена с произход от C57BL/6N. Проявата и темповете на развитие на тумора обаче не могат да бъдат определени и ще се изисква оценка като част от характеристиката на модела. След като бъдат установени основните линии, ще бъде извършена основна скринингова оценка на хуманното отношение, както е описано в раздел 2.1. Най-полезната линия ще бъде подобрена за изследване на този тип левкемия.

2.2.2 Прогнозна оценка

Какви действия спрямо животните са обхванати в настоящото изследване?	Какво ще изпитат животните? Колко страдание би могло да им бъде причинено? Какво би могло да доведе до влошаване?	Как страданието ще бъде сведено до минимум?	
	Неблагоприятни въздействия	Методология и интервенции	Крайни етапи
Оценка и характеристика на развитието на тумора	Загубата на тегло и състоянието ще напредват с развитието на рака	Интервенциите ще се основават на ежедневни наблюдения, като се използват критерии като загуба на тегло, загуба на кондиция, летаргия и т.н.	Източници и животни, използвани за развъждане, показващи клинични признаци, които не са в съответствие с експерименталните процедури, като например загуба на тегло над 15 %, лошо състояние на козината, летаргия, ще бъдат умъртвявани по хуманен начин
	Подкожните отоци могат да предизвикат дискомфорт, да засегнат нормалното поведение, стойка или движение	Ежедневни наблюдения и мониторинг на общото здравословно състояние и нарастване на тумора	Животните ще бъдат умъртвени по хуманен начин, ако туморът се възпали или окаже влияние върху нормалното поведение, стойка или движение, или надвиши 1,2 cm в диаметър Животни, показващи признаци за

	Животните могат да бъдат податливи на заболявания, причинени от нарушаване на имунната система		развиващите се съпътстващи заболявания, ще бъдат умъртвявани по хуманен начин
--	--	--	---

Изследваният модел ще бъде подложен на мутация, за да се създаде прогнозирано генетично заболяване. Настъпването на заболяването не може да бъде лесно прогнозирано, но клиничните признаци могат да бъдат определени предварително, за да позволят настъпването да бъде характеризирани. Веднъж характеризирани, моделът ще трябва да бъде поддържан, за да се позволи използването му по време на последващи експериментални изследвания относно възможните видове лечение на този вид рак, подложен на изследване. Въз основа на това този пример ще бъде класифициран като УМЕРЕН.

2.2.3 Резултати

Оценките на хуманното отношение към животните бяха извършени съгласно раздел 2.2 по-горе. Не бяха открити аномалии в основните етапи на развитие, установен бе растеж до достигане на полова зрялост. Колонията бе увеличена с източници и животни за бъдещо развъждане, чифтосани на десетседмична възраст, за да се поддържа колонията и да се създават нови експериментални животни. През цялото това време животните бяха под наблюдение и бе отбелязано, че има развитие на тумора на възраст 18 седмици при 60 % от животните, носители на мутацията. Клиничното развитие на болестта бе между 4 и 6 седмици, като на този етап животните трябваше да бъдат евтаназирани.

2.2.4 Анализ на резултатите

Оценка на действителната тежест

При 60 % от животните, които са носители на мутацията, беше наблюдавано развитие на тумори от възраст 18 седмици. Съгласно стратегията за развъждане животните се чифтосваха след навършване на 10-седмична възраст. Възможността за развитие на тумори при размножаващи се двойки бе сметена за достатъчна, за да се промени развъждането и отглеждането. Поради това двойките за

размножаване бяха чифтосани от 6-седмична възраст, а двойки, отделени от 12-седмична възраст с отглеждани за разплод мъжки, бяха умъртвявани. Източниците и женските животни за разплод бяха наблюдавани ежедневно, за да се открият ранни признаци за развитие на тумора. Животни, които не бяха използвани или необходими, се умъртвяваха по хуманен начин преди настъпването на който и да е от клиничните признаци.

Обобщение

Животни под 18-седмична възраст — без неблагоприятни въздействия.

Животни на възраст от 18 седмици, развиващи тумори — ЛЕКА поради ранните клинични крайни етапи

Животни на възраст от 18 седмици, развиващи тумори, и потомци за използване — ЛЕКА или УМЕРЕНА в зависимост от прилагането на клиничните крайни етапи.

2.3 Модел на генетично изменена мишка — ген $C^{tm1a(Funding)Lab}$

2.3.1 Общ контекст

За тестване на поведението и паметта бе създадена колония мишки с мутация в ген C , насочена към линия от ембрионални стволови клетки, които са с произход от C57BL/6N с известен фенотипен потенциал. Този модел бе поддържан въз основа на определен произход (C57BL/6N). След като бе установено прехвърлянето на зародишната линия на G1 мишки, бе проведена и основна скринингова оценка на хуманното отношение.

2.3.2 Прогнозна оценка

Както бе отбелязано в раздел 2.1, изследваният ген е нов мутант. Намерението е моделът да се използва при бъдещи изследвания на поведението, като се тества ефикасността на нови фармацевтични съединения. Опитът при такъв вид установяване показва, че голяма част от подобни на този модели обикновено проявяват лек фенотип. Понякога в модела обаче ще се проявяват неочаквани клинични признаци и следователно въз основа на това този пример може прогнозно да бъде класифициран като УМЕРЕН.

2.3.3 Резултати

Всички наблюдения и съотношения бяха сметени за нормални във връзка с генетичния произход (C57BL/6N) на модела с хомозиготни, хетерозиготни и диви видове мишки, родени при нормално Менделово съотношение.

Когато хомозиготните и дивите видове контролни мишки достигнаха 4-седмична възраст, бяха подложени на серия от наблюдения и бяха тествани, за да се оцени способността им за учене и паметта. Тези тестове бяха проведени в периода около 10-ата седмица. В края на този фенотипен анализ не се наблюдаваха вредни фенотипи. След това моделът бе използван за тестване на ефикасността на нови фармацевтични съединения.

Развъждането на хетерозиготни мишки доведе до появата на здрави хомозиготни животни, които показват репродуктивна способност, подобна на тази на основния щам. Поради това за намаляване на броя на животните бе използвана стратегия за развъждане чрез хомозиготни чифтосвания. За разлика от първоначалното чифтосване, при което хомозиготни мишки се получават от чифтосване на хетерозиготни с хетерозиготни, новата група хомозиготни животни е произлязла от чифтосването на хомозиготни родители, които видимо са по-дребни и не са успели да достигнат нормалния за тях размер и тегло в сравнение с техните братя и сестри.

Въпреки че първоначално линията бе предназначена за модел на поведение и памет, бяха проведени допълнителни анализи на тъкани и кръв, получени от тези животни. По време на анализа на резултатите от биохимичния анализ на кръвта и последващия преглед на литературата бе установено, че ген *C* се явява важен транспортиращ протеин, който се свързва с витамин B12. Премахването на ген *C* води до прекъсване в извънклетъчния транспортен механизъм, което води до нарушение в синтеза на ДНК и метаболизма на мазнини и протеини. Ефектът от тази мутация не би бил видим при мишки, родени от хетерозиготни женски, тъй като майчиният източник на витамин B12 се прехвърля в утробата чрез плацентата до развиващия се зародиш. Следователно първоначалните мутанти за този ген имат достатъчно съхранен B12, което им позволява да оцелеят и да се развият до 16-седмична възраст, което гарантира нормално развъждане и плодовитост в сравнение с основния щам.

2.3.4 Анализ на резултатите

Оценка на действителната тежест

Този пример показва, че отглеждането на колонията може да има дълбок и често пъти неочакван ефект върху мишките. Въз основа на наличната по-рано информация и резултатите от първичното развъждане и определяне на фенотипа тази колония би се проявила като незабележима. Логично е отглеждането на колония при стратегия за хомозиготно чифтосване нормално да гарантира, че е създаден минималният брой животни, което е желателно, за да се сведе до минимум използването на животни. Без разрешение за проекта е възможно в линии, поддържани преди като нормални животни, да възникнат непредвидени вредни фенотипи. В резултат на неблагоприятните въздействия върху хуманното отношение към животните в този пример вероятно ще е необходимо този модел да бъде върнат в рамките на разрешението за проекта, ако се прилага този вид схема на развъждане.

Обобщение

Развъждане и отглеждане на хетерозиготни двойки — няма неблагоприятни въздействия

Развъждане и отглеждане на хомозиготни двойки — УМЕРЕНА тежест за потомците на това поколение поради по-дребния размер и неспособността на пораснат.

Пример 2.3 — Подчертава нуждата от прехвърляне на точни и полезни данни за хуманното отношение между институтите, когато могат да се проявят вредни фенотипи, например под формата на „паспорт на мишка“ⁱ.

ⁱ RSPCA GA Passport Working Group (2010) *GA Passports: The Key to Consistent Animal Care*. Southwater, UK: RSPCA (download at <http://www.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals/implementing3rs/gapassport>)

ЗА КОНТАКТ С ПРЕДСТАВИТЕЛИ НА ЕС

ЛИЧНО

В целия Европейския съюз съществуват стотици информационни центрове „Europe Direct“. Адресът на най-близкия до Вас център ще намерите на уебсайта https://europa.eu/european-union/contact_bg

ПО ТЕЛЕФОНА ИЛИ ПО ЕЛЕКТРОННА ПОЩА

Europe Direct е служба, която отговаря на въпроси за Европейския съюз. Можете да се свържете с тази служба:

- чрез безплатния телефонен номер **00 800 6 7 8 9 10 11** (някои оператори може да таксуват обаждането),
- или стационарен телефонен номер **+32 22999696**, или
- по електронна поща чрез формуляра на разположение на адрес https://europa.eu/european-union/contact_bg

ЗА ДА НАМЕРИТЕ ИНФОРМАЦИЯ ЗА ЕС

ОНЛАЙН

Информация за Европейския съюз на всички официални езици на ЕС е на разположение на уебсайта Europa на адрес https://europa.eu/european-union/index_bg.

ПУБЛИКАЦИИ НА ЕС

Можете да изтеглите или да поръчате безплатни и платени публикации на адрес <https://publications.europa.eu/bg/publications>. Редица безплатни публикации може да бъдат получени от службата Europe Direct или от Вашия местен информационен център (вж. https://europa.eu/european-union/contact_bg).

ПРАВО НА ЕС И ДОКУМЕНТИ ПО ТЕМАТА

За достъп до правна информация от ЕС, включително цялото право на ЕС от 1952 г. насам на всички официални езици, посетете уебсайта EUR-Lex на адрес: <http://eur-lex.europa.eu>

СВОБОДНО ДОСТЪПНИ ДАННИ ОТ ЕС

Порталът на ЕС за свободно достъпни данни (<http://data.europa.eu/euodp/bg>) предоставя достъп до набори от данни от ЕС. Данните могат да бъдат изтеглени и използвани повторно безплатно, както за търговски, така и за нетърговски цели.

