

КРОЛІ ЯК БІОЛОГІЧНА МОДЕЛЬ ДЛЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ (огляд літератури)

О.М. Ткачук, Т.В. Ткачук

Державне підприємство «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України», м. Київ, Україна

РЕЗЮМЕ. Мета роботи. Провести аналіз та узагальнити дані сучасної літератури щодо використання кролів для лабораторних експериментальних досліджень та обґрунтувати перспектив їхнього подальшого залучення.

Матеріали та методи. У роботі застосовані аналітичні методи: збір наукової інформації за проблемою, аналіз літературних даних бібліотек PubMed та наукове узагальнення одержаних результатів.

Результати та висновки. Обґрунтовано принципи щодо перспектив подальшого використання кролів для проведення лабораторних експериментальних досліджень. Завдяки певним досягненням науки вже розроблено та впроваджено етичні альтернативні наукові методи тестування без залучення живих істот. Саме вони і допомагають отримати більш достовірні результати. Якщо в деяких наукових дослідженнях кролів вже не використовують, то щодо інших напрямків – навпаки з кожним роком зростає необхідність залучення цих ссавців для експериментів. І цьому є аргументоване пояснення. На даний час немає альтернативи використанню кролів для виробництва антитіл, рекомбінантних білків. Тестування на лабораторних тваринах – кращий метод виявлення таких явищ, як рак і вроджені дефекти. Генетично модифіковані кролі – це нова перспектива для наукового пошуку. З розвитком нових технологій редагування геному, особливо CRISPR/Cas9 та його модифікацій, постала можливість з високою ефективністю одержувати набагато більшу кількість трансгенних тварин з точно заданими генетичними модифікаціями для розв'язання найрізноманітніших задач. Використання тварин в експериментах є критично важливим для деяких напрямків наукових досліджень, адже складність будови організму не може бути продубльована в культурі клітин або за допомогою комп'ютерних моделей.

Ключові слова: кролі, утримання, тестування на тваринах, здоров'я людини.

Вступ. Дослідження на експериментальних тваринах – це найнадійніший спосіб виявлення важливих токсичних властивостей хімічних речовин для оцінки ризиків для здоров'я людини і довкілля. Навіщо потрібно використовувати лабораторних тварин? Люди та інші живі істоти – рослини, тварини, гриби і бактерії – складні організми. Всі живі організми складаються з хімічних речовин, а хімічні реакції задіюють всі життєві процеси, які набагато складніші за просто суму окремих реакцій. При введенні до організму лабораторної тварини досліджуваної речовини відбувається її взаємодія з багатьма органами і тканинами. Часто-густо трапляється, що впливаючи на один процес, можна викликати несподівані реакції інших. Інколи буває доречним розділити дослідження на частини і з'ясувати, як введена речовина впливає на кожен процес. Експериментатор може виявити різні зміни, які відбуваються, коли досліджувана речовина зустрічається з живою клітиною, і зробити відповідні наукові висновки або дати певні рекомендації.

Мета роботи. Провести аналіз та узагальнення даних сучасної літератури щодо використання кролів для лабораторних експериментальних досліджень та обґрунтування перспектив їхнього подальшого використання.

Матеріали та методи. У роботі застосовані аналітичні методи: збір наукової інформації за проблемою, аналіз літературних даних бібліотек PubMed та наукове узагальнення одержаних результатів.

Використання тварин в експериментах є конче важливим, адже складність будови живого організму не може бути продубльована в культурі клітин або за допомогою комп'ютерних моделей. Так, нескладно вивчити механізм метаболізму досліджуваної речовини, що може змінювати будову речовини. «Доза робить речовину отрутою» як на рівні окремого органу, так і організму. А нам необхідно вмти аналізувати не тільки те, як діє хімічна речовина, а й співвідношення між дозою, введеною тварині, та дозою, доставленою в різні органи і тканини тіла.

Однією з найбільш поширених лабораторних моделей для досліджень є кролі. Кролів одомашнили в шостому столітті, розводили протягом багатьох років не лише для отримання м'яса та хутра, вони також є популярними декоративними домашніми тваринами. Британська рада по кролях визнала 76 різних порід кролів, але для наукових цілей в основному використовуються наступні породи: новозеландський білий, каліфорнійський і фламандський гігант, американський голландець.

Найчастіше використовується у лабораторних дослідженнях новозеландський білий кролик (NZW) з масою тіла від 2 кг до 5 кг, виведений у 1920-х роках. Ця порода не така агресивна за своєю природою і має менше проблем зі здоров'ям порівняно з іншими. Вони маленькі і, як правило, слухняні, з ними легше проводити маніпуляції, дешеві в утриманні та прекрасно розмножуються, мають короткі життєві цикли (вагітність, період лактації та статевого дозрівання) [6, 19].

Кролям для утримання потрібна нижча температура, ніж для більшості інших лабораторних ссавців – оптимальною є температура між 16°–21° за Цельсієм. Кратність обміну повітря у приміщенні, де утримуються тварини, становить 10–15 об'ємів за годину. Рекомендований світловий день для кролів від 12 до 14 годин. Дорослих тварин слід утримувати в індивідуальних сітчастих клітках (0,90 Ч 0,60 Ч 0,45 м), розташованих на висоті не менше 0,8 см від підлоги, щоб екскременти могли випадати у збірні лотки [21].

У лабораторних умовах рекомендовано безперервне харчування протягом дня, корм надається *ad libitum*, зазвичай у вигляді гранул. Раціон дорослого кролика може складатися або із свіжого сіна, води і свіжих овочів, або готових до споживання гранул. Воду слід міняти щодня, вона має бути доступна цілодобово. Оскільки тіло кролів на 58% складається з води, їм потрібно випивати не менше 120 мл/кг води на день. Кількість рідини, що виводиться – до 50–75 мл/кг щодня. Через велику кількість сечі, що виділяється, піддони-вловлювачі необхідно часто чистити (стандартно міняти двічі на тиждень). Якщо води буде недостатньо, кролі будуть споживати менше корму; після трьох днів

без води вони практично перестають їсти. Ознаки зневоднення можна виявити за станом шкіри та хутра. За кролями необхідно ретельно доглядати, має бути щоденний графік спостереження, навіть у вихідні та святкові дні. Це стандарт [5, 10].

Новоприбулих кролів рекомендується помістити на карантин – мінімум на два тижні з щоденним спостереженням, а також обстежити на найбільш поширенні захворювання. Кролі легко заражаються псороптозом (вушною коростою), збудником якого є кліщі *Psoroptes cuniculi*. Інфекція здатна пошкодити мозок, органи нюху та зору. Карантин також сприяє адаптації до навколишнього середовища і розпорядку дня у приміщенні для тварин [7]. У цілому кролі боязкі та неагресивні, товаришують між собою, хоча самці можуть битися один з одним після досягнення зрілості. Тварини можуть гратися як з їжею і водою, так із обладнанням, тому їх необхідно контролювати, аби переконатися, що основні їхні потреби задовольняються. З кролями, як правило, легко працювати, але фахівцям потрібна спеціальна підготовка. Вони зазвичай енергійно штовхають задніми лапами, коли їх виймають з клітки або утримують її. Якщо їх неправильно тримати є небезпека, що вони можуть зламати собі хребет.

Перед проведенням маніпуляцій на тваринах необхідно переконатися, що поверхня, на яку буде поміщено кроля для проведення будь-яких маніпуляцій чи процедур, не є слизькою: найкраще підійдуть гумові килимки [21]. Щоденний контакт з людьми знижує стрес у кролів під час роботи. Завжди слід вдягати захисні рукавички. Ці тварини можуть нервувати і завдавати сильних укусів або подряпин своїми потужними задніми лапами. Не можна брати кролів за вуха через високу ймовірність вивиху шийних хребців. Брати їх слід однією рукою за велику складку шкіри на лопатках, іншою рукою підтримувати під задні лапи. Досвідчений технічний персонал або дослідник з часом буде інтуїтивно відчувати як поводитися з кролями. Деякі тварини інстинктивно стають активними у вашій присутності, але коли вони не відчують, що за ними спостерігають, їх поведінка може бути більш очевидною для виявлення проблем. Слід швидко оцінити

поставу – сутулість вказує на дискомфорт або біль, вади хутряного покриву також можуть свідчити про поганий догляд або його відсутність і часто є ознакою хворої тварини. Слід звернути увагу також на скупчення вовняних грудок у шлунку. Необхідно стежити за тим, щоб вся вода у пляшках знаходилася приблизно на однаковому рівні: це може вказувати на витік води з пляшки, або на кроля, який не п'є належним чином. Так само огляд піддонів може свідчити про кількість сечі, а також фекалій у конкретної тварини. Якщо кролі знаходяться у дротяних клітках, а не на твердій підлозі, їхні лапи необхідно регулярно обстежувати щодо захворювання скакальних суглобів (виразковий пододерматит), кігті також слід вчасно підстригати [18].

Найвідомішим методом тестування токсичності на тваринах є тест Дрейза (англ. Draize Test) – розроблений у 1944 році токсикологами FDA Джоном Дрейзом і Джейкобом Спайнсом. Він спочатку використовувався для тестування косметики. Процедура включає в себе нанесення 0,5 мл або 0,5 г досліджуваної речовини на слизову оболонку ока або шкіру знерухомленої притомної тварини, потім змивання речовини через певний час і фіксацію наслідків. За тваринами спостерігають протягом 14 діб для відстеження ознак ураження тканин. Тест зазвичай проводиться на кролях-альбіносах, хоча використовуються й інші види тварин, у тому числі собаки. Якщо тест викликає незворотне пошкодження очей або шкіри, тварин піддають евтаназії. Якщо продукт не викликає незворотних ушкоджень, тварини можуть бути використані для наступного тесту [3, 20].

Луї Пастер використовував кролів для розробки своєї вакцини проти сказу. Медицина не знала жодного засобу боротьби зі сказом. Було добре відомо, якщо вкусить сказаний вовк, собака або інша хвора тварина і людина захворіє, то порятунку немає, травмований загине в тяжких муках. Пастер знайшов спосіб послаблювати вірус сказу, він зробив вакцину на основі висушеного спинного мозку від інфікованого сказом кроля [17].

Для медичної продукції, такої як вакцини, ліки та медичні пристрої, кролів використовують для перевірки пірогенності (здатності продукту викликати лихоманку)

[8]. Також на кролях досліджують фарм-препарати, зокрема подразнюючу дію при інтравагінальному введенні тестової субстанції [11].

Крім того, через високу швидкість розмноження, кролів також використовують для тестування ембріотоксичності та тератогенності тестових субстанцій, з'ясовуючи шкоду, яку продукт може завдати вагітній самиці або плоду, що розвивається.

Кролі – найменша і найдешевша лабораторна тварина, в якій можна отримати серійні зразки сперми для морфологічної, біохімічної оцінки, а також фертильності. Самиця кроля має передбачуваний репродуктивний цикл і може бути штучно запліднена відомою кількістю сперми під час тестування на фертильність. Ці лабораторні тварини є надзвичайно цінною моделлю для вивчення впливу хімічних речовин або інших подразників на чоловічу репродуктивну систему [15]. Кролі також використовуються у фундаментальних і біомедичних дослідженнях як моделі, на яких вивчають захворювання очей, шкіри, серця та імунної системи, астми, муковісцидозу і діабету. У літературі описані дані, що за допомогою дослідів на кролях вдалося дослідити механізми, які беруть участь у виробництві інсуліну при діабеті [1]. Ще одне поширене використання кролів – процедура вироблення поліклональних антитіл, які широко використовуються для різних дослідницьких і діагностичних цілей [24]. Кролі є стандартною моделлю в дослідженнях пародонту. Також кролі є частиною різноманітних досліджень, таких як вимірювання впливу паратиреоїдного гормону на остеointegraцію при остеопорозі [16]. Вони також використовувалися в дослідженнях з артерології та загоєнні сухожилів [9].

Кролі породи ватанабе (Watanabe) страждають від смертельно високого рівня холестерину у крові (гіперхолістеринемія) через генетичний дефект. Цих кролів використовують в якості моделі, аби поліпшити лікування дітей з цим захворюванням і для загальних досліджень високого рівня холестерину в організмі. Також на кролях досліджували механізми розчинення бляшок на стінках артерій [25]. Дослідження на кролях у дев'ятнадцятому сторіччі зіграло вирішальну роль у відкритті ферменту атропінестерази [13].

Кролі – відмінна модельна система для моделювання реакції тканин людини на випромінювання хірургічних лазерів. Сучасна медицина має багато прикладів використання лазерних технологій, зокрема операції на очах. Безперечно цьому передували науковий пошук, а моделями були кролі. Історично склалося, що кролів використовують для диференціювання *Mycobacterium tuberculosis* від *Mycobacterium bovis*. При моделюванні захворювання на туберкульоз у кролів розвивається хвороба, яка схожа за ознаками на туберкульоз у людей (гранульоми з казеозним некрозом). Для моделювання дії вірусу імунодефіциту людини було створено трансгенних кролів, в яких експресовано ген CD4 людини [2]. Використання моделей трансгенних кролів для з'ясування механізмів, що беруть участь у патогенезі захворювання – нова галузь, яка представляє великий інтерес. Трансгенні кролі зі зміненою експресією певних генів були створені в 1996 році. Duverger et al. [4] виростили New Zealand white rabbits з людським *apoA-1* в печінці, на яких досліджували вплив підвищеної експресії *apoA-1* на схильність до атеросклерозу. В останні роки з використанням технології CRISPR/Cas9 генетично модифіковані кролі були використані в дослідженнях захворювань людини: починаючи від Х-зчепленої гіпофосфатемії, м'язової дистрофії [22] та гіпертрофії [14] до дегенерації сітківки [12] та атеросклерозу [23].

Результати та висновки. Наука давно зробила крок вперед і на даний час розроблено та впроваджено етичні альтернативні наукові методи тестування без використання тварин, що дозволяють отримати більш достовірні результати. При тестуванні косметичних засобів замість тестування на кролях використовують альтернативні методи, такі як дослідження на культурі клітин, штучній шкірі, випробування на добровольцях. Понад 20 років тому був запропонований альтернативний ЛАЛ-тест для визначення наявності в ліках пірогенних

домішок, до цього часу для тесту на пірогенність широко використовувались кролі.

Але якщо в деяких напрямках наукових досліджень кролів перестали взагалі використовувати, то в інших – навпаки, з кожним роком їхня кількість стрімко збільшується. Пошук термінів «кролі» та «експериментальна модель» призвів до того, що було знайдено 34 837 статей з журналів, опублікованих у період з 1951 по 2020 рік, з них понад 10 000 – за останнє десятиліття. На даний час немає альтернативи використання кролів для виробництва антитіл. Це найменша тварина, яку можна використовувати для виробництва рекомбінантних білків у його молоці або сироватці як в експериментальних, так і в комерційних масштабах. Тестування на лабораторних тваринах – кращий метод виявлення таких наслідків, як рак і вроджені дефекти.

Генетично модифіковані кролі – нові перспективи, які відкриваються в наукових дослідженнях. З розвитком нових технологій редагування геному, особливо CRISPR/Cas9 і його модифікацій, стало можливим з високою ефективністю отримувати все більшу кількість трансгенних тварин з точно заданими генетичними модифікаціями для вирішення найрізноманітніших задач. Геноміка та протеоміка кролів швидко розвиваються. Було створено багато трансгенних кролів, охарактеризовано та є доступними для дослідників. Моделі трансгенних кроликів для вивчення генетики конкретних захворювань продовжують розширювати наші знання про ці процеси у людей.

Враховуючи вимоги біоетичного комітету (3R правила), сучасні науковці намагаються використовувати мінімальну кількість якісних стандартизованих лабораторних тварин в експериментальних дослідженнях. Завдання, які ми маємо виконати, мета, до якої прагнемо як науковці достатньо масштабні. Тому науковий пошук, який ми проводимо, не можна реалізувати лише за допомогою комп'ютерного моделювання та *in vitro* методів.

ЛІТЕРАТУРА

- Bellón JM, Rodríguez M, Pérez-Köhler B, Pérez-López P, Pascual G. The New Zealand White Rabbit as a model for preclinical studies addressing tissue repair at the level of the abdominal wall. *Tissue Eng Part C Methods*. 2017;23:863–80.
- Bosze ZS, Houdebine LM. Application of rabbits in biomedical research: a review. *World Rabbit Sci*. 2006;14:1–14.
- Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol Exp Ther*. 1944;82:377–90.

4. Daniel Morton. The Use of Rabbits in Male Reproductive Toxicology. Environmental Health Perspectives. 1988;77:5–9.
5. Duverger N, Kruth H, Emmanuel F, Caillaud JM, Viglietta C, Castro G, et al. Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-1 transgenic rabbits. Circulation. 1996;94:713–17.
6. Fisher PG. Standards of care in the 21st century: the rabbit. J Exot Pet Med. 2010;19:22–35.
7. Franco NH. Animal experiments in biomedical research: a historical perspective. Animals. 2013;3:238–73.
8. Harkness JE, Wagner JE. The biology and medicine of rabbits and rodents (2nd Ed.). Lea & Febiger. 1983.
9. Джерело доступу: https://www.toxicology.org/pubs/docs/air/AIR_Final.pdf
10. Hui JH, Chan SW, Li J, et al. Intra-articular delivery of chondroitin sulfate for the treatment of joint defects in rabbit model. J Mol Histol. 2007;38:483–489.
11. Hunt CE, Harrington DD, Weisbroth SH, Flatt RE, Kraus AL. Nutrition and nutritional diseases of the rabbit. In: The Biology of the Laboratory Rabbit. New York Academic Press: NY;1974,403–33.
12. Джерело доступу: ISO 10993 – 10: 2002.
13. Kondo M, Sakai T, Komeima K, Kurimoto Y, Ueno S, Nishizawa Y, et al. Generation of a transgenic rabbit model of retinal degeneration. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2009;50:1371–7. doi: 10.1167/iops.08-2863
14. Llebenberg SP, Linn JM. Seasonal and sexual influences on rabbit atropinesterase. Lab Anim. 1980;14:297–300.
15. Lv Q, Yuan L, Deng J, Chen M, Wang Y, Zeng J, et al. Efficient generation of myostatin gene mutated rabbit by CRISPR/Cas9. Sci. Rep. 2016;6:25029. doi: 10.1038/srep25029.
16. Oki Y, Doi K, Makihara Y, Kobatake R, Kubo T, Tsuga K. Effects of continual intermittent administration of parathyroid hormone on implant stability in the presence of osteoporosis: an in vivo study using resonance frequency analysis in a rabbit model. J Appl Oral Sci. 2017;25:498–505.
17. Pasteur L. Méthode pour prévenir la rage après morsure. C. R. T. 1885;101:765–72.
18. Refinements in rabbit husbandry. SECOND REPORT OF THE BVA/AFW/FRAME/RSPCA/UFOW JOINT WORKING GROUP ON REFINEMENT. Laboratory Animals 1993;27:301–29.
19. Sayers I. Approach to preventive health care and welfare in rabbits. In Pract. 2010;32:190–8.
20. Sharpe R. The Draize test-motivations for change. Fd Chem Toxicol 1985;23:139–43.
21. Suckow Mark A, Brammer David W, Rush Howard G, Chrisp Clarence E. "Biology and Diseases of Rabbits." Chapter 9 in Laboratory Animal Medicine, 2nd Edition. James G. Fox, et al, editors. New-York: Academic Press; 2002.
22. Sui T, Xu L, Lau YS, Liu D, Liu T, Gao Y, et al. Development of muscular dystrophy in a CRISPR-engineered mutant rabbit model with frame-disrupting ANO5 mutations. Cell Death Dis. 2018;9:609.
23. Wang Y, Niimi M, Nishijima K, Waqar AB, Yu Y, Koike T, et al. Human apolipoprotein A-II protects against diet-induced atherosclerosis in transgenic rabbits. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2013;33:224–31. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300445
24. Weber J, Peng H, Rader C. From rabbit antibody repertoires to rabbit monoclonal antibodies. Exp. Mol. Med. 2017;49:305. doi: 10.1038/emm.2017.23
25. Yanni AE. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. Lab Anim. 2004;38:246–56.

КРОЛИКИ КАК БИОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

(обзор литературы)

А.Н. Ткачук, Т.В. Ткачук.

Государственное предприятие «Научный центр превентивной токсикологии, пищевой и химической безопасности имени академика Л.И. Медведя Министерство здравоохранения Украины», г. Киев, Украина

РЕЗЮМЕ. Цель работы. Провести анализ и обобщение данных современной литературы по использованию кроликов для лабораторных экспериментальных исследований и обоснования перспектив их дальнейшего использования.

Материалы и методы. В работе применены аналитические методы: сбор научной информации по проблеме, анализ литературных данных библиотек PubMed и научное обобщение полученных результатов.

Результаты и выводы. Обоснованы принципы относительно перспектив дальнейшего использования кроликов для проведения лабораторных экспериментальных исследований. Наука давно шагнула вперед, и в настоящее время разработаны и внедрены этические альтернативные научные методы тестирования, позволяющие получить более достоверные результаты. В одних направлениях научных исследований кроликов перестали вообще использовать, то в других — наоборот с каждым годом их использование стремительно увеличивается. В настоящее время нет альтернативы использования кроликов для производства антител, рекомбинантных белков. Тестирование на лабораторных животных — лучший метод выявления таких последствий как рак и врожденные дефекты. Генетически модифицированные кролики — новые перспективы, которые открываются в научных исследованиях. С развитием новых технологий редактирования генома, особенно CRISPR/Cas9 и его модификаций, стало возможным с высокой эффективностью получать все большее количество трансгенных животных с точно заданными генетическими модификациями для решения самых разнообразных задач. Использование животных в экспериментах является критически важным для некоторых направлений научных исследований, поскольку такая сложность строения организма не может быть продублирована в культуре клеток или с помощью компьютерных моделей.

Ключевые слова: кролики, содержание, тестирование на животных, здоровье человека.

RABBIT AS A BIOLOGICAL MODEL FOR EXPERIMENTAL RESEARCH

(literature review)

O. Tkachuk, T. Tkachuk

LI Medved's Research Centre of Preventive Toxicology,
Food and Chemical Safety, Ministry of Health, Ukraine (State Enterprise), Kyiv, Ukraine

ABSTRACT. Objective. To analyze and generalize the data of modern literature on the use of rabbits for laboratory experimental studies and substantiate the prospects for their further use.

Materials and Methods. Analytical methods were used in the work: collection of scientific information on the problem, analysis of published data from PubMed libraries and scientific generalization of the results.

Results and Conclusions. Principles have been substantiated regarding the prospects for the further use of rabbits for laboratory experimental studies. Science has advanced long ago, and ethical alternative scientific testing methods have now been developed and implemented to provide more reliable results. But if in some areas of scientific research, rabbits have ceased to be used altogether, then in other areas, on the contrary, the use of rabbits is rapidly increasing every year. Currently, there is no alternative to using rabbits for the production of antibodies, recombinant proteins. Testing in laboratory animals is the best method for detecting consequences such as cancer and birth defects. Genetically modified rabbits - new perspectives opening up in scientific research. With the development of new technologies for genome editing, especially CRISPR/Cas9 and its modifications, it has become possible to obtain with high efficiency an increasing number of transgenic animals with precisely specified genetic modifications for solving a wide variety of problems. The use of animals in experiments is critical for some areas of scientific research, since this complexity of the structure of the organism cannot be duplicated in cell culture or using computer models.

Key Words: rabbits, maintenance, testing on animals, human health.

Надійшла до редакції 17/03/2021