МЕТОДЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 57.084.1
doi: 10.31140/vestnikib.2016.3(197).3

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ НАДЛЕЖАЩЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ (НЛП, GLP) ПРИ ОБУСТРОЙСТВЕ ВИВАРИЕВ И ОРГАНИЗАЦИИ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

О.В. Раскова1, А.И. Кичигин2
1 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар
2 Сыктывкарский государственный университет им. П. Сорокина, Сыктывкар
E-mail: raskosha@ib.komusc.ru

Аннотация. В статье рассмотрены основные требования GLP (Good Laboratory Practice) к обустройству и проектированию вивариев, содержанию животных, а также к организации работы испытательных центров.

Ключевые слова: принципы надлежащей лабораторной практики, GLP, обустройство вивариев, требования к содержанию животных, испытательный центр, научные исследования

Принципы надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice, GLP) – это международная система правил и требований к лабораториям, которые принимаются изучением воздействия новых химических веществ на окружающую среду и здоровье человека (ГОСТ 33044-2014). Главная цель GLP состоит в том, чтобы обеспечить получение надежных результатов путем реализации системы качества организацииического процесса и условий, при которых планируются, проводятся и контролируются неклинические исследования безопасности продукта, документируются и архивируются данные и составляются отчеты (Добротная... 2009).

В настоящее время эти правила и требования применяются во многих странах мира как обязательный стандарт качества при проведении клинических исследований, что позволяет обеспечить стандартизацию исследований и взаимное признание полученных результатов. Начало этому было положено в 1976 г., когда агентство по лекарствам и пищевым продуктам Министерства здравоохранения и социальных служб США (Food and Drug Administration, FDA) или USFDA предложило разработать единые правила надлежащей лабораторной практики. Поводом послужила серия скандалов, связанных с фальсификацией результатов лабораторных испытаний фармакологическими компаниями. Уже в 1979 г. GLP ста- ла обязательным требованием для фармацевтических лабораторий на территории США. В 1981 г. Организация экономического сотрудничества и развития (ОЭСР, Organisation for Economic Coopera- tion and Development, OECD) также сформулировала международные принципы GLP, выполнение которых является обязательным для лабораторий всех стран-участниц этой организации. Таким образом, на сегодняшний день существуют две основные системы GLP, незначительно отличающиеся друг от друга – принята в США система GLP FDA и система GLP OECD.
2014 г. процесс вступления Российской Федерации в ОЭСР приостановлен, деятельность по стандартизации лабораторий по требованиям GLP продолжает развиваться. С 1 августа 2015 г. введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», в котором в отличие от предыдущего (ГОСТ 53434-2009) приводится пояснения для пользователей в части назначения и применения принципов GLP.

На сегодняшний день в России нет обязательного требования по проведению доклинических исследований именно в лабораториях, аккредитованных по стандартам GLP, однако, реализуется курс на то, чтобы как можно больше лабораторий имели этот статус. Одной из первых в России сертификат GLP получила лаборатория биологических испытаний (ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Руководитель этой лаборатории А. Мурашев считает, что исследования можно качественно выполнять и не по стандарту GLP, но если они выполнены по стандарту, то потенциальные результаты могут приниматься на всех странах ОЭСР, а это реальный выход на международный рынок (Курская, 2014).

Проанализировал доступную нам литературу по этой теме и приняли участие в работе семинара «Доклинические исследования. Современные тенденции и проблемы. GLP в вирави». которая проводила фирма ООО «Фармбиолайн» (30 марта 2016, г. Москва), мы также пришли к заключению, что при создании современного виравиа, а с учетом исследований, которые планируется проводить на его базе, то и в целом испытательного центра, необходимо руководствоваться основными принципами лабораторной практики, основанными на международных стандартах. В данной статье представлены некоторые требования к обустройству виравиа и организации исследовательской работы по принципам GLP. Следует отметить, что это лишь попытка разобраться в многообразии правил, норм и методических указаний, которые необходимо соблюдать в случае, если виравия претендует на соответствие этим стандартам. Ряд не менее важных вопросов остался за рамками этой публикации, некоторые из них освещены в статьях и книгах, авторами которых пройден сложный путь становления и обустройства GLP-лабораторий, в состав которых входят виравия или питомцы (Murashev, 2006; Мощкин, 2008).

Согласно Руководству по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицине исследований (Руководство...), 2010), правила GLP определяют технологию проведения доклинических испытаний, связанных с определе-
– операционную с предоперационной для экспериментальных работ, требующих особых условий;
– помещения хранения чистого (обеззараженного) инвентаря для ухода за животными (клеток, поилок, посуды для кормов, оборудования);
– помещение манипуляционной для изучения обменных процессов, взятия проб для анализа;
– помещения для хранения и приготовления кормов для животных;
– диагностический кабинет;
– помещение или оборудованная выделенная зона для испытуемых образцов (биологические материалы) и образцов сравнения.

В составе «грязных» помещений предусматривают:
– помещения изолаторов, предназначенные для содержания подошвенных по инфекционным заболеваниям животных или больных животных;
– помещение (или отделение) для мойки и дезинфекции оборудования и инвентаря;
– холодильное помещение или холодильная камера для сбора и хранения трупов животных, отходов;
– помещения для персонала вивария (душевая, туалет и гардеробная).

Помещения для содержания лабораторных животных оборудуют принудительной приточно-вытяжной вентиляцией, при этом устройство вентиляции должно исключать перетекание воздушных масс из «грязных» зон в «чистые» (Руководство..., 1996). В виварии обязательно наличие холодного и горячего водоснабжения с водой соответствующего качества (СанПин 2.1.4.1074-01) и системы канализации, которая должна быть раздельной для отвода хозяйственно-бытовых стоков (от туалетов, душевых) и технологических стоков (от инженерно-технологического оборудования, трапов, моечного оборудования) (СП 2.2.1.3218-14).

Оборудование, находящееся в виварии и в целом в испытательном центре, необходимо эксплуатировать надлежащим образом, подвергать чистке, проверке и калибровке (о чем следует вести записи) для подтверждения того, что были обеспечены все контролируемые условия. Оборудование должно соответствовать государственным стандартам или требованиям GLP (ГОСТ 33044-2014).

Все вещества и реагенты следует маркировать надлежащим образом с указанием наименования, концентрации, срока годности и условий хранения. В соответствии с принципами GLP, касающимися тестируемых и стандартных объектов, должны быть соблюдены условия хранения и обращения с веществами для обеспечения их идентичности, стабильности, правильности подготовки доз для введения в тест-систему (Приписки..., 2012). Для предотвращения загрязнения в испытательном центре должны быть отдельные помещения для работы и хранения испытуемых и стандартных (контрольных) объектов (ГОСТ 33044-2014).

Требования к содержанию животных. В общем своде нормативных актов, составляющих системы OLP FDA и OLP OECD, можно выделить три основных документа, регламентирующих содержание животных и использование их в экспериментах:


Постоянно возрастают требования к качеству лабораторных животных. Ежедневный уход за животными (санитарная обработка помещения и оборудования, раздача кормов, смена подстилки) должен осуществлять квалифицированный персонал. Лабораторным животным в питомнике и виварии должны быть обеспечены:
– полноценное кормление и уход;
– поддержание нормального состояния здоровья;
– содержание в соответствующих для каждого вида нормативных условиях;
− возможность удовлетворения физиологических и ведомственных потребностей;
− ежедневный контроль условий содержания;
− быстрое устранение недостатков и факторов, могущих повлечь за собой стресс и страдания животных (Руководство..., 2010).

Прием животных в виварии производят из специализированных питомников, благополучных по инфекционным заболеваниям, при наличии на каждую партию животных ветеринарных свидетельств об отсутствии заболеваний, опасных для человека и животных (СП 2.2.1.3218-14). Все вновь поступившие в виварий животные должны быть осмотрены ветеринарным врачом и изолированы в помещениях для карантин. Для мышей, крыс, хомяков, морских свинок карантинный период составляет 5-15 дней (Руководство..., 2010).


Полнокровность корма, сбалансированность всех его компонентов является важнейшим условием, обеспечивающим здоровье животного, поддержание неспецифической резистентности его организма на высоком уровне. Корм для животных должен быть ветеринарным, неконтaminированным, сбалансированным по питательному составу, не содержать токсичных агентов (ГОСТ-Р 50258-92). Гранулированный комбикорм следует хранить в сухих, чистых, хорошо проветриваемых, не зараженных амбарными вредителями и инсектиными грызуными складских помещениях, не имеющих посторонних запахов, при температуре +5 °С и влажности 50-60 % (Руководство..., 2010). Заболевший свободный доступ животных к воде, которая может быть из водопровода (СанПиН 2.1.4.1074-01).

В качестве подстилки для крыс и мышей рекомендуется использовать опилки, стружки или мелкую щепу (длина 5-20 мм, толщина 1-2 мм) из экологически чистой древесины лиственных пород. Не допускается использовать подстилки из химически обработанной древесины, а также из древесины хвойных пород. Подстилку автоматизируют на поддонах при режиме 118 °С в течение 30 мин. Контактную подстилку в клетках, где содержатся крысы и мыши, меняют с периодичностью один раз в семь дней. Чистую подстилку рассыпают в клетки из расчета 0,5 л на 500 см² (Руководство..., 2010).

Утилизация отходов. Обработка и удаление отходов должны быть выполнены таким образом, чтобы не подвергать опасности животных и персонал при проведении исследований и не исказить их результаты. Для этого требуется обеспечить соответствующие условия для сбора, хранения и вывода отходов, а также процедуру их дезактивации и транспортировки (ФЗ № 89 от 24.06.1998; ГОСТ 33044-2014). Виварий должен быть обеспечен специальным оборудованием для дезинфекции клеток, инвентаря, а также условиями для сбора, хранения, удаления (утратизации) отходов и трупов животных (СП 2.2.1.3218-14).

Гуманное отношение к животным является основной целью принципов GLP. При планировании экспериментов на животных исследователь обязан руководствоваться принципами «трех R» (replacement – замена болезненных для животных опытах; reduction – уменьшение числа опытов с животными; refinement – улучшение методики с целью об-
лекчения страданий подопытных животных) (Руководство..., 2010). Комиссия по биоэтике может на основании СОП (стандартные операционные процедуры), выполняемых в лаборатории, контролировать и оценивать работу исследователей при проведении экспериментов. Всё действия, которые могут причинить боль лабораторным животным (операции, тотальное обескровливание), проводят с использованием наркотизирующих средств. Если по условиям эксперимента противопоказано применение анестезии, то все вышеуказанные действия необходимо проводить в максимально короткий срок (Руководство..., 1996).

Стандартизация лабораторных животных. Получение надежных и воспроизводимых результатов экспериментов на лабораторных животных можно достигнуть лишь при соблюдении стандартности всех его слагаемых и условий проведения. В этом смысле лабораторное животное является наиболее узким звеном в эксперименте (Каркищенко, 2005). Состояние лабораторного животного зависит от воздействия многочисленных экзогенных и эндогенных факторов, влияние которых не всегда бывает ясным и регистрируемым. Среди них следует отметить, прежде всего, наследственные особенности животных (генетические факторы), а также факторы биологической природы — вирусные, бактериальные инфекции и паразитарные инвазии, которые могут не вызывать клинически ясную картину заболевания. Поэтому для получения надежных и воспроизводимых результатов разработана стандартизация лабораторных животных по генетическому и микробиологическому статусу (Руководство..., 2010). Выбор животных определяется целью эксперимента. Так, при оценке токсикологического действия веществ, определения фармакологической активности удобно использовать конвекционных животных — чаще всего линейных (инбредных), для которых характерна генетическая однородность. Кроме того, в последнее время для производства вакцин, испытания новых фармакологических средств используют SPF (безмикробные) животных, для разведения и содержания которых требуется соблюдение более сложных условий (наличие барьерной системы).


В эколого-биологических исследованиях, проводимых сотрудниками Института биологии Коми НЦ УрО РАН, используют животных (полевки-экономки, рыжие полевки, пашеные полевки), отловленных в природных условиях. Следует отметить, что при работе с дикими животными необходимо выполнять ряд требований (СП 1.3.2322-08 и ГОСТ 31885 2012) и рекомендаций (Практическое..., 2004). Стандартизации по микробиологическому статусу данные животные не подлежат.

Требования к персоналу и организации экспериментов на лабораторных животных. Федерация европейских научных ассоциаций по лабораторным животным (FELASA) выделяет четыре категории лиц, имеющих отношение к экспериментам на животных (которые не являются взаимосвязанными): категория A — лица, осуществляющие уход за животными; категория B — лица, проводящие эксперименты на животных; категория C — лица, ответственные за руководство экспериментами на животных; категория D — специалисты в области науки о лабораторных животных.

До начала каждого исследования должен быть разработан план в письменном виде (ГОСТ 33044-2014). План должен содержать полную информацию об исследовании, используемом и стандартном оборудовании, методах испытаний, обоснование выбора тест-систем, уровней доз и/или концентраций, частоте и продолжительности введения образца и др. Все методы, процедуры, манипуляции, выполняемые сотрудниками в испытательном центре, должны быть описаны в письменных утвержденных руководством документах (СОП), предназначенных для гарантии качества и полноты данных, полученных в процессе исследования. Персонал, занятый в экспериментах, должен знать и владеть СОП, необходимыми для работы. Все отклонения от СОП следует документировать и рассматривать их влияние на качество получаемых результатов. Неукоснительное соблюдение СОП помогает избежать ошибок, обучать персонал, корректировать существующую практику, ускорять процедуры, устанавливать правила документации получаемых данных (Принципы..., 2012). По окончании каждого исследования должен быть подготовлен заключительный отчет с полной информацией об исследовании.
Согласно стандартам GLP, квалификация каждого сотрудника должна быть подтверждена документально. Должны быть четко определены обязанности и ответственность персонала, кроме того, необходимо проводить своевременное как внутреннее, так и внешнее повышение квалификации сотрудников. В ГОСТ 33044-2014 подробно описаны требования к руководителю испытательного центра, основной задачей которого является контроль и организация слаженной работы всех составляющих центра – от обеспечения потребности в помещениях, оборудовании и материалах до организации валидации и контроля архивных данных. Ключевое место в организации исследований по стандартам GLP принадлежит службе обеспечения качества. Специалисты этой службы не должны принимать участие в проводимых ими исследованиях и иметь подозрительные, специальные знания и опыт на уровне, необходимом для выполнения своих обязанностей, но должны быть знакомы с СОП. Круг обязанностей персонала по обеспечению качества широк (ГОСТ 33044-2014), главными задачами сотрудников этой службы являются проверка плана исследования и соответствия самого выполненного исследования на всех его этапах принципам GLP. Кроме того, специалисты службы оценивают доступность планов исследования и СОП персоналу, вовлеченному в проведение исследования, осуществляют различные инспекционные проверки в соответствии с графиком, который составляется аудитором после проверки плана исследования и ознакомления с расписанием процедур. Все документы службы обеспечения качества подлежат архивированию (Принципы..., 2012).

Для каждого конкретного эксперимента назначается руководитель, которым может быть научный сотрудник или иной специалист, имеющий необходимый уровень образования, соответствующую квалификацию и опыт работы. Руководитель исследования осуществляет общее руководство, несет персональную ответственность за выполнение испытания и итоговый отчет (Обязанности..., 2009). Перед началом исследования руководитель должен ознакомить с планом персонал и службу по обеспечению качества с целью оценки соответствия плана принципам GLP. Кроме того, руководитель несет ответственность за своевременное архивирование всех документов и материалов исследования (план, первичные материалы, отчеты) (ГОСТ 33044-2014).

Персонал, выполняющий исследование, должен знать и соблюдать требования правил GLP, план эксперимента и СОП, своевременно и точно вести сбор первичных данных и нести ответственность за достоверность представленной ими информации, соблюдать правила техники безопасности.

Ветеринарная помощь. В виварии в обязательном порядке должно быть предусмотрено оказание ветеринарной помощи (включая выходные и праздничные дни) и ежедневный осмотр животных (Руководство..., 2010).

В соответствии с требованиями GLP в исследовательском центре необходимо наличие архива, в котором должны быть созданы все условия для безопасного и качественного хранения архивных материалов (планов исследования, первичных данных, СОП, заключительных отчетов и образцов, записи всех инспекций и т.д.) (ГОСТ 33044-2014). Ответственность за архив несет архивариус, который разрабатывает системы индексации, процедуры поиска, учета и выдачи архивных материалов.

Особое внимание следует обратить на процедуру прохождения инспекций, необходимых для получения и поддержания статуса соответствия принципам GLP. Национальные и межгосударственные стандарты по надлежащей лабораторной практике, гармонизированные с документами ОЭСР, подробно представлены в работе (Зайцева, 2014).

В заключение отметим, что, несомненно, внедрение в экспериментальные научные исследования принципов GLP, в частности, требований к обустройству вивария, оборудованию, содержанию и гуманному обращению с животными, является важным и нужным на пути признания полученных данных, в том числе и на международном уровне. Однако при всей привлекательности GLP-лабораторий отрицательным моментом является то, что лаборатории, которые создаются в России, получают очень дорогими и, соответственно, стоимость научных исследований, которые могут проводиться в таких лабораториях, существенно возрастает. При принятии единого решения об аккредитации лаборатории по стандартам GLP нужно учитывать конечную цель деятельности лаборатории. Если это доклинические исследования лекарственных средств, косметической продукции, ветеринарных препаратов, пищевых и кормовых добавок, а также химических веществ промышленного назначения с целью коммерческой реализации продукции, тогда соблюдение всех стандартов должно быть строго обязательным. В случае, когда в лаборатории проводится научно-исследовательская работа и часть экспериментов имеет «поисковый» характер (новые подходы, средства, методы, объекты), аккредитация по стандартам GLP не всегда должна быть обязательным условием.

ЛИТЕРАТУРА
ВЕСТНИК ИБ КОМИ НЦ УРО РАН 2016 № 3

Обязательства руководителя исследования при проведении испытаний безопасности химических веществ, биотехнологических и нанотехнологических продуктов в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики / Т. Ю. Жармухамедова, О. Н. Хохлова, Т. А. Гуськова, Д. И. Ржевский, А. Н. Мурашев // Токсикологический вестник. — 2009. — № 5. — С. 2-4.
СП 1.3.2322-08. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. — Режим доступа: http://docs.cntd.ru/document/902091086.
Murashev, A. N. Application of GLPs in Russia Federation for testing of anti-infections medical products. OECD / A. N. Murashev // Russia Fede-
ration workshop on Biosecurity of microbial resourc-

BASIC PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE (GLP) IN THE REGENERATION OF THE VIVARIUM AND RESEARCH

O.V. Raskosha1, A.I. Kichigin1

1 Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar
2 Syktyvkar State University named after P. Sorokin, Syktyvkar

Abstract. The article deals with the basic requirements of GLP (Good Laboratory Practice) to arrangement and design of vivariums, content of animals, as well as to organization of the test centers.

Key words: Principles of GLP, the requirements for the keeping of animals, improvement vivarium, test center, rocarch