



(51) МПК

A61K 31/541 (2006.01)

A61K 31/5513 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/20 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/541 (2025.01); A61K 31/5513 (2025.01); A61K 47/18 (2025.01); A61K 47/20 (2025.01); A61P 43/00 (2025.01)

(21)(22) Заявка: 2024128792, 27.09.2024

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.09.2024Дата регистрации:
18.03.2025

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.09.2024

(45) Опубликовано: 18.03.2025 Бюл. № 8

Адрес для переписки:

344003, г. Ростов-на-Дону, пл. Гагарина, 1,
ДГТУ, отдел интеллектуальной собственности,
Лобова Екатерина Викторовна

(72) Автор(ы):

Шебеко Сергей Константинович (RU),
Лукбанова Екатерина Алексеевна (RU),
Ермаков Алексей Михайлович (RU),
Фомина Анна Сергеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Донской государственный
технический университет" (ДГТУ) (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2009104301 А, 09.02.2009. RU
2480204 С1, 27.04.2013. CN 115463085 А,
13.12.2022. US 2005163718 А1, 28.07.2005.
РЫБАКОВА А.В. и др. Методы эвтаназии
лабораторных животных в соответствии с
Европейской Директивой 2010 / 63 /
Международный вестник ветеринарии. - 2015.
- N 2. - стр. 96-107. МАКАРОВА М.Н. и др.
Эвтаназия лабораторных животных / (см.
прод.)

(54) Способ гуманной эвтаназии лабораторных животных в эксперименте

(57) Реферат:

Изобретение относится к ветеринарии, а именно к ветеринарной фармакологии и токсикологии. У лабораторных животных производят индукцию общей анестезии при помощи комбинации из водного раствора ксилазина, тилетамина, золазепам, и бисдиметилсульфата бисдиметиламиноэтилового эфира янтарной кислоты, смешанных в равных частях. Комбинацию препаратов вводят в дозе 40 мг/кг по сумме действующих веществ

внутримышечно. Способ позволяет осуществить гуманную эвтаназию лабораторных животных в эксперименте, благодаря однократному введению раствора композиции препаратов, сочетающих болеутоляющее, анксиолитическое, седативное и миорелаксирующее действие, что в свою очередь дает возможность снизить время от этапа введения раствора до наступления бессознательного состояния с последующим наступлением смерти. 1 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

Консультант GLP-Planet Мнение фармацевтической отрасли. - Санкт-Петербург: Акционерное общество "Научно-производственное объединение "ДОМ ФАРМАЦИИ", 2023. - стр. 247-351. КНОКНЛОВА О.Н. et al., Comparative Study of the Aftereffect of CO2 Inhalation or Tiletamine-Zolazepam-Xylazine Anesthesia on

Laboratory Outbred Rats and Mice // Biomedicines. - 2022. - Vol. 10 (2). - p. 1-11. CLARKSON J.M. et al. A review of methods used to kill laboratory rodents: issues and opportunities. Laboratory Animals. 2022; 56 (5): p. 419-436. DOMINGUEZ O.A. et al. Rat Grimace Scale as a Method to Evaluate Animal Welfare, Nociception, and Quality of the Euthanasia Method of Wistar Rats. Animals 2023, 13, 3161. p. 1-16.

R U 2 8 3 6 5 5 2 C 1

R U 2 8 3 6 5 5 2 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 31/541 (2006.01)

A61K 31/5513 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/20 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 31/541 (2025.01); A61K 31/5513 (2025.01); A61K 47/18 (2025.01); A61K 47/20 (2025.01); A61P 43/00 (2025.01)

(21)(22) Application: 2024128792, 27.09.2024

(24) Effective date for property rights:
27.09.2024

Registration date:
18.03.2025

Priority:

(22) Date of filing: 27.09.2024

(45) Date of publication: 18.03.2025 Bull. № 8

Mail address:

344003, g. Rostov-na-Donu, pl. Gagarina, 1, DGTU,
otdel intellektualnoj sobstvennosti, Lobova
Ekaterina Viktorovna

(72) Inventor(s):

Shebeko Sergei Konstantinovich (RU),
Lukbanova Ekaterina Alekseevna (RU),
Ermakov Aleksei Mikhailovich (RU),
Fomina Anna Sergeevna (RU)

(73) Proprietor(s):

federalnoe gosudarstvennoe biudzhetnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia «Donskoi gosudarstvennyi
tekhnicheskii universitet» (DGTU) (RU)

(54) METHOD FOR HUMANE EUTHANASIA OF LABORATORY ANIMALS IN EXPERIMENT

(57) Abstract:

FIELD: veterinary science.

SUBSTANCE: invention refers to veterinary science, namely to veterinary pharmacology and toxicology. In laboratory animals, general anaesthesia is induced using a combination of an aqueous solution of xylazine, tiletamine, zolazepam, and bis-dimethylsulphate of bis-dimethylaminoethyl ether of succinic acid, mixed in equal parts. Combination of preparations is administered in dose of 40 mg/kg in total amount of active substances intramuscularly.

EFFECT: method makes it possible to carry out humane euthanasia of laboratory animals in experiment, due to single introduction of a solution of a composition of preparations, combining analgesic, anxiolytic, sedative and muscle relaxant action, which in turn makes it possible to reduce the time from the stage of administering the solution to the onset of unconsciousness with subsequent onset of death.

1 cl, 1 tbl, 1 ex

Изобретение относится к ветеринарии, медицине и фармации, а также экспериментальной фармакологии с токсикологией, и касается проведения гуманной эвтаназии лабораторных животных в эксперименте. Использование изобретения позволяет обеспечить гуманный вывод из экспериментов лабораторных животных

5 благодаря комплексному действию на основании гипнотического, диссоциативного, седативного, болеутоляющего и миорелаксирующего эффектов ксилазина, тилетамина, золазепама и бисдиметилсульфата бисдиметиламиноэтилового эфира янтарной кислоты, а также снижению общего времени наступления глубокого наркоза и, как следствие, биологической смерти.

10 Согласно Правилам надлежащей лабораторной практики и положениям Хельсинской декларации исследования с использованием лабораторных животных представляют собой неотъемлемую часть биомедицинских исследований, результатом которых являются данные о фундаментальных процессах в живых организмах и свойствах новых

15 фармацевтических субстанций (Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. – Washington : The National Academies Press, 2011.). Несмотря на стремление научного сообщества к переводу исследований в условиях *in vivo* на *in vitro*, в настоящее время остается значительным число используемых лабораторных животных: в 2019 году количество использующихся в экспериментах лабораторных животных в мире

20 оценивалось в 192,1 млн. голов в год (European Commission. Summary Report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union and Norway in 2018. – Brussels; European Commission, 2021). При этом, в соответствии с правилами гуманного обращения с животными, в случаях, когда они испытывают стресс, страдания и серьезные сдвиги в гомеостазе, в обязательном порядке проводится процедура эвтаназии (AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition. –

25 Schaumburg, IL: AVMA, 2020). При этом общепринятыми требованиями к эвтаназии являются: отсутствие боли, страха и стресса, быстрая потеря сознания с последующей смертью, надежность и необратимость (Shearer J.K., Griffin D., Cotton S.E. Humane Euthanasia and Carcass Disposal. Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract. – 2018. – Vol. 34(2). – P. 355-374.). Совершенствование сочетаний и дозировок препаратов для эвтаназии с

30 различными механизмами действия позволят снизить боль и стресс у лабораторных животных при их умерщвлении.

Внутримышечный путь введения является наиболее удобным при индукции эвтаназии животных в экспериментальных исследованиях. На сегодняшний день в Российской Федерации арсенал подобных препаратов, которые не подлежат особому учету и могут

35 быть свободно применены для эвтаназии лабораторных животных, сильно ограничен.

Известен способ эвтаназии лабораторных грызунов при помощи внутримышечного введения препаратов ксилазина («Рометар», «Ксила», «Ксиланит») и фармацевтической композиции тилетамина с золазепамом (препараты «Золетил», «Телазол», «Везотил»). Данный способ позволяет снизить боль и стресс в процессе умерщвления животного,

40 а также оказывает незначительное влияние на клинико-биохимические показатели сыворотки крови. Недостатком данного способа является необходимость введения ксилазина в качестве премедикации и тилетамина с золазепамом в виде двух отдельных инъекций, что создает дополнительный стресс животным и усложняет процедуру. Еще

45 одним недостатком данного способа эвтаназии является относительно медленное действие препаратов: хирургическая стадия наркоза наступает спустя 6 минут после введения препаратов (Comparative Study of the Aftereffect of CO₂ Inhalation or Tiletamine-Zolazepam-Xylazine Anesthesia on Laboratory Outbred Rats and Mice / O.N. Khokhlova, N.A. Borozdina, E.S. Sadovnikova et al. // Biomedicines. – 2022. – Vol. 10(2). – Art. ID 512.). С

учетом того, что инъекционные анестетики рекомендованы к применению для эвтаназии в дозах в три раза превышающих дозы для проведения общей анестезии (тилетамин/золазепам 20-40 мг/кг в/м + ксилазин 5-10 мг/кг в/м), для проведения эвтаназии при внутримышечном введении данную комбинацию целесообразно использовать в следующих дозах: тилетамин с золазепамом – 60-120 мг/кг, ксилазин – 15-30 мг/кг (Руководство по работе с лабораторными животными для сотрудников ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова Минздрава России, занятых проведением доклинических испытаний. – Москва: ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова, 2015. – 42 с.).

Известен способ эвтаназии животных при помощи бисдиметилсульфата бисдиметиламиноэтилового эфира янтарной кислоты – ББЭЯК (препарат «Адилин-супер»). Данный препарат представляет собой курареподобный деполаризующий миорелаксант, использующийся для бескровной эвтаназии животных с целью предотвращения особо опасных инфекционных заболеваний (Методические рекомендации по применению препарата «Адилин-супер» для бескровного умерщвления животных / Р. М. Асланов, К. Х. Папуниди, Э. И. Семенов. – Казань, 2018. – 24 с.). Существенным недостатком данного способа эвтаназии является то, бисдиметилсульфат бисдиметиламиноэтилового эфира янтарной кислоты парализует мышцы, в том числе и дыхательные, не угнетая при этом функцию ЦНС. Таким образом, у животных наблюдается обездвиживание с последующей острой дыхательной недостаточностью и стресс на фоне сохранения сознания (Харкевич Д.А. Фармакология: Учебник. М.: ГЭОТАРМедиа, 2017. – 760 с.; Гуманна ли эвтаназия с применением препарата «Адилин-супер» и других миорелаксантов в монорежиме? / И.М. Донник и др. // Ветеринария. – 2019. – №. 12. – С. 3-7.). Согласно ряду документов и методических пособий, использование для эвтаназии миорелаксантов без предварительной анестезии является негуманным (ГОСТ 33215 – 2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур. – М.: Стандартинформ, 2016. – 13 с.; Couto M., Cates C. Laboratory Guidelines for Animal Care. Methods Mol. Biol. – 2019. – Vol. 1920. – P. 407-430.).

Остальные инъекционные средства, которые используются в мировой практике для эвтаназии животных (кетамин, барбитураты, эмбутрамид, комбинации на их основе и прочие), не доступны для отечественных ученых, поскольку или относятся к спискам особого учета или не представлены на фармацевтическом рынке.

Задачей является разработка способа гуманной эвтаназии лабораторных животных в эксперименте, обеспечивающего однократное введение раствора композиции препаратов, сочетающих болеутоляющее, анксиолитическое, седативное и миорелаксирующее действие и обеспечивающих быстрое наступление бессознательного состояния с последующим наступлением смерти.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является снижение времени от этапа введения раствора до наступления бессознательного состояния с последующим наступлением смерти.

Технический результат достигается тем, что осуществляют индукцию общей анестезии при помощи комбинации ксилазина и тилетамина с золазепамом, вводимых внутримышечно, причем используют водный раствор ксилазина, тилетамина, золазепамы и бисдиметилсульфата бисдиметиламиноэтилового эфира янтарной кислоты в равных частях и дозе 40 мг/кг по сумме действующих веществ, вводимый внутримышечно.

При таком подходе процедура эвтаназии осуществляется гуманным образом при предварительном отключении сознания животных, без мучений, стресса и боли, является надежной и необратимой (со стопроцентным показателем летальности) и легко

воспроизводится путем однократной внутримышечной инъекции. При этом расход комбинированного препарата тилетамина с золазепамом, который является наиболее дорогим компонентом летальной смеси, минимален.

Способ осуществляют следующим образом.

- 5 В мерной колбе на 25 мл смешивают лиофилизированный порошок, содержащий по 250 мг тилетамина и золазепамы, с 12,5 мл раствора ксилазина с концентрацией 20 мг/мл, далее в нее добавляют 250 мг субстанции бисдиметилсульфата бисдиметиламиноэтилового эфира янтарной кислоты и доводят до метки водой для инъекций. Смесь тщательно перемешивают до полного растворения. В результате
10 получают 25 мл раствора, содержащего по 250 мг ксилазина, тилетамина, золазепамы и бисдиметилсульфата бисдиметиламиноэтилового эфира янтарной кислоты. Полученный раствор вводят животным в дозе 1,0 мл/кг (40 мг/кг) однократно внутримышечно. Факт наступления хирургической стадии наркоза определяют по отсутствию pedalного, мигательного и хвостового рефлексов. Наступление смерти
15 констатируется на основании формирования изоэлектрической формы электроэнцефалограммы (ЭЭГ), что свидетельствует о гибели мозга, прекращения дыхания и сердечной деятельности.

Предложенный способ эвтаназии иллюстрируется следующими примерами, но не ограничивается ими.

- 20 Рассмотрим пример применения способа.

Предложенный способ эвтаназии был апробирован на 2-х группах крыс линии Wistar массой 350-500 г по 15 особей в каждой. В первой группе эвтаназию животных осуществляли предложенным методом, путем внутримышечной инъекции комбинации ксилазина, тилетамина, золазепамы и бисдиметилсульфата бисдиметиламиноэтилового
25 эфира янтарной кислоты в равных частях в дозе 40 мг/кг. Во второй группе животные получали внутримышечно комбинацию ксилазина, тилетамина и золазепамы в равных частях и дозе 90 мг/кг, которая в 3 раза превышает дозу, рекомендованную для общей анестезии. В ходе исследования оценивали летальность животных, время до угнетения сознания, остановки дыхания и остановки сердца. Нежелательные явления при
30 осуществлении эвтаназии (вокализация, дисфория, агональное дыхание, урикации, дефекации, мышечная активность, осложнения вследствие инъекции) оценивали полуколичественным методом по 1 балу за каждый выявленный вид явлений (от 0 до 7 баллов). Результаты исследования представлены в таблице 1.

- 35 Таблица 1 – Характеристика процедуры эвтаназии, индуцированной предложенным способом

Исследуемый показатель		1-я группа (n=15)*	2-я группа (n=12)*
40 Время от момента индукции эвтаназии до	угнетения сознания, с	124±7	88±6*
	остановки дыхания, с	158±8	444±28*
	остановки сердца, с	322±17	535±33*
Полуколичественная оценка нежелательных реакций, баллы		3,0 (2,0÷3,5)	5,0 (4,0÷6,0)*
Летальность, %		100	80*

Примечания

- * - количество животных, погибших в результате эвтаназии;
45 ** - отличия достоверны относительно животных 1-й группы ($p < 0,05$).

Полученные результаты свидетельствуют, что предложенный способ эвтаназии имеет очевидные преимущества в сравнении с рекомендованным. Так, несмотря на большее время угнетения сознания (в среднем 88 с против 124 с), он характеризовался

в 1,7 раза более высокой скоростью наступления смерти животных и прекращения деятельности сердечно-сосудистой системы ($p < 0,05$). Вследствие наличия в составе миорелаксанта дыхание останавливалась еще быстрее – в среднем за 158 с против 444 с ($p < 0,05$). При этом состояние полного угнетения сознания, которое характеризовалось отсутствием pedalного, мигательного и хвостового рефлексов, наблюдалось раньше признаков угнетения дыхания. Вследствие этого предложенный метод эвтаназии характеризовался меньшей степенью нежелательных явлений, о чем говорит достоверно более низкий показатель балльной оценки (3,0 балла против 5,0). Уровень летальности при осуществлении эвтаназии данным способом составил 100%, что было достоверно выше, чем при использовании простой комбинации ксилазина, тилетамина и золазепам.

Таким образом, предложенный способ эвтаназии лабораторных животных является быстрым, надежным, эффективным, сопровождается минимальными нежелательными явлениями и соответствует критериям гуманности. Техничко-экономическая эффективность данного способа заключается в том, что он позволяет обеспечить гуманную эвтаназию лабораторных животных в эксперименте благодаря однократному внутримышечному введению раствора смеси ксилазина, тилетамина, золазепам и бисдиметилсульфата бисдиметиламиноэтилового эфира янтарной кислоты, оказывающих седативное, гипнотическое, болеутоляющее, анксиолитическое и миорелаксирующее действие, а также снижение времени от этапа введения раствора до наступление бессознательного состояния с последующим наступлением смерти.

(57) Формула изобретения

Способ проведения гуманной эвтаназии лабораторных животных в эксперименте, включающий индукцию общей анестезии при помощи комбинации ксилазина и тилетамина с золазепамом, вводимых внутримышечно, отличающийся тем, что используют водный раствор ксилазина, тилетамина, золазепам и бисдиметилсульфата бисдиметиламиноэтилового эфира янтарной кислоты в равных частях и дозе 40 мг/кг по сумме действующих веществ, вводимый внутримышечно.