



# Виведення тварин з експерименту. Забір крові, приготування та зберігання біологічного матеріалу

*НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ТРЕНІНГОВИЙ ЦЕНТР МЕДИКО-БІОЛОГІЧНИХ  
ДОСЛІДЖЕНЬ НАВЧАЛЬНО-НАУКОВОГО ІНСТИТУТУ ПРИКЛАДНОЇ  
ФАРМАЦІЇ*

# ВИВЕДЕННЯ ТВАРИН З ЕКСПЕРИМЕНТУ

- ▶ При проведенні доклінічних досліджень евтаназія лабораторних тварин проводиться в двох випадках: якщо під час експерименту тварина відчуває хронічний стрес та при завершенні дослідження
- ▶ Відповідно до принципів гуманної експериментальної практики (1959) і Директивою ЄС 2010/63 / EU необхідно звести до мінімуму страждання тварин, в тому числі такі стани як страх і занепокоєння



# ВИВЕДЕННЯ ТВАРИН З ЕКСПЕРИМЕНТУ

**ЗГІДНО принципів евтаназії тварин AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animal** описані такі ознаки впливу стресу

- ▶ як: вокалізація під час обробки або хворобливих процедур, пов'язана зі стресом, вокалізація пов'язана з надлишковим тиском, що виникає при фіксації.
- ▶ слиновиділення, сечовипускання, дефекації, евакуація вмісту параанальних залоз, тахікардія, пітливість і рефлексорні скорочення скелетних м'язів викликають тремтіння і тремор та інші м'язові спазми можуть виник в несвідомому, а також свідомому стані тварин

# ВИВЕДЕННЯ ТВАРИН З ЕКСПЕРИМЕНТУ

- ▶ Страх може викликати знерухомлення у деяких видів тварин, таких як кролики. В данному випадку цю нерухомість не слід інтерпретувати, як втрату свідомості.
- ▶ Вокалізація, агресивна поведінка, і секреція певних запахів заляканої тварини можуть викликати неспокій і стрес у інших тварин.
- ▶ У зв'язку з цим, небажано присутність інших тварин при виконанні евтаназії, необхідно забезпечити шумові і візуальні бар'єри.

# ВИВЕДЕННЯ ТВАРИН З ЕКСПЕРИМЕНТУ

- ▶ При виборі методу евтаназії необхідно враховувати, що дані методи повинні приводити до швидкої втрати свідомості, і в подальшому супроводжуватися зупинкою серця і дихання, остаточною втратою функції мозку, а також бути надійними, легко здійсненними і незворотними

# МЕТОДИ ЕВТАНАЗІЇ

В оцінці методів евтаназії використовуються наступні критерії:

- ▶ здатність викликати втрату свідомості і смерть без спричинення болю, страждань, занепокоєння;
- ▶ час, необхідний для втрати свідомості;
- ▶ надійність;
- ▶ безпеку для персоналу
- ▶ незворотність;
- ▶ сумісність з дизайном дослідження;
- ▶ можливість подальшої оцінки, експертизи або використання тканин;
- ▶ потенційна можливість у людини зловживання препаратами для наркоза і евтаназії;
- ▶ сумісність з видом, віком і станом здоров'я;
- ▶ наявність спеціального обладнання.

# МЕТОДИ ЕВТАНАЗІЇ

- ▶ **Методи евтаназії поділяють на:**
- ▶ **1 -допустимі - ті, які дозволяють провести евтаназію гуманно;**
- ▶ **2 – умовно-допустимі методи - методи, при яких через можливість помилки оператора або проблем з безпекою складно провести гуманну евтаназію або методи погано себе зарекомендували;**
- ▶ **3 - неприпустимі методи - методи, негуманного ставлення до тварин при будь-яких умовах, або при яких існує великий ризик для здоров'я людини.**

# МЕТОДИ ЕВТАНАЗІЇ

## Фізичні методи

- ▶ **часто використовуються в поєднанні з забором обсягу циркулюючої крові для подальшого дослідження. Ці методи є недорогими, гуманними і безболісними, якщо виконані належним чином, і виключають негативний вплив фармацевтичних препаратів на структури органів і тканин і тим самим полегшують інтерпретацію результатів. Крім того, тварини відчувають менше страху і тривоги при використанні фізичних методів, але це вимагає обов'язкової підготовки персоналу і більш прямий зв'язку з тваринами, які повинні будуть вбиті. Даний аспект може несприятливо впливати на персонал.-**





# МЕТОДИ ЕВТАНАЗІЇ

- ▶ CO<sub>2</sub>-бокс для евтаназії призначений для гуманного виведення з експерименту лабораторних тварин. Бокс забезпечений системою, яка контролює і регулює час експозиції гризунів в атмосфері CO<sub>2</sub>. Програмування умов дозволяє змінювати співвідношення газів (вуглекислого газу і кисню), регулювати повітряні потоки і час витримування.
- ▶ Можлива робота з різними газами. CO<sub>2</sub> бокс евтаназії задовольняє всім відомим рекомендаціям і положенням закону про евтаназію дрібних гризунів.



# МЕТОДИ ЕВТАНАЗІЇ

- ▶ **Фізичні методи включають в себе застосування вогнепальної зброї, цервікальну дислокацію, декапітація, смерть від електричного струму, мікроволнове опромінення, компресію грудної клітини, знекровлення, оглушення, руйнування спинного мозку.**
- ▶ **За даними багатьох авторів застосування таких методів евтаназії, як декапітація і цервікальна дислокація підходять для вивчення органів черевної порожнини, без надання впливу на структури.**

# МЕТОДИ ЕВТАНАЗІЇ

## ***Цервікальна дислокація***

**При евтаназії мишей і щурів, великий і вказівний пальці поміщаються з обох сторін шиї біля основи черепа або накладають металевий обмежувач біля основи черепа. Іншою рукою роблять ривок за основу хвоста або задніх кінцівок, виробляючи відрив хребта від черепа**

**При даному методі досягається досить швидка втрата свідомості, тканини організму хімічно не забруднюються. Вимагає технічних навичок для гарантії втрати свідомості.**

# МЕТОДИ ЕВТАНАЗІЇ

## ***Передозування інгаляційними анестетиками***

**(ефір, галотан, метоксіф-луран, ізофлуран, севофлурану, десфлюран, енфлюран) широко використовуються для евтаназії в даний час**

**Евтаназія із застосуванням інгаляційних засобів може зайняти деякий час, необхідний для досягнення певної концентрації препарату в легенях. В більшості випадків, при високій концентрації препарату втрата свідомості відбувається швидше, і евтаназія є більш гуманною.**

# МЕТОДИ ЕВТАНАЗІЇ

## ***Використання ін'єкційних препаратів –***

- ▶ **найшвидший, надійний і оптимальний метод евтаназії, тому що не викликає хворобливості або страху у тваринного. Агресивним, наляканим тваринам перед введенням препарату для евтаназії необхідно вводити седативні препарати або нейролептики. Якщо внутрішньовенне введення провести складно або неможливо, допустимо внутрібрюшінное введення.**

# МЕТОДИ ЕВТАНАЗІЇ

## ***Додаткові методи***

- ▶ Оглушення і руйнування спинного мозку при правильному застосуванні призводять до втрати свідомості, але не гарантують загибель. Тому ці методи повинні використовуватися тільки спільно з іншими процедурами (введення фармакологічних препаратів, знекровлення або обезголовлювання).
- ▶ Знекровлення використовується для гарантування загибелі тварин після оглушення або перебувають без свідомості і не може використовуватися як монометод.

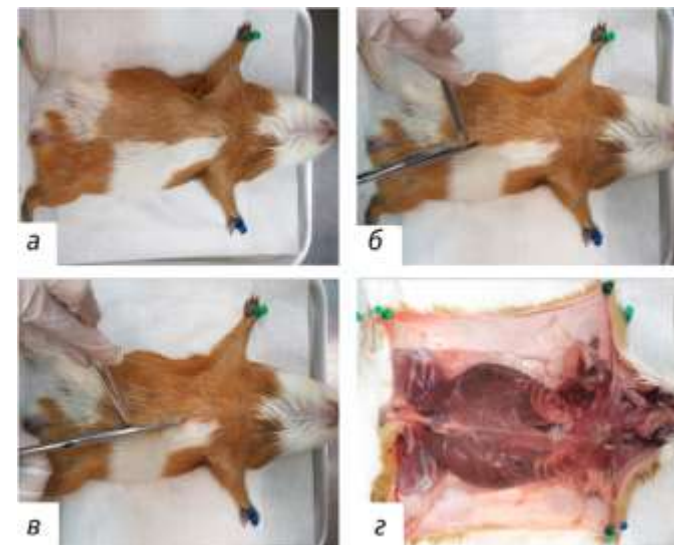
# Виведення тварини з експерименту

## ***Підтвердження смерті***

- ▶ Після евтаназії смерть повинна бути обов'язково підтверджена. Тварина в глибокому наркозі після введення препарату може здаватися мертвою, але, в кінцевому рахунку, може повернутися до життя.
- ▶ Смерть повинна бути підтверджена до утилізації останків тварини. Поєднання таких критеріїв є найбільш надійним в підтвердженні смерті:
  - ▶ відсутність пульсу;
  - ▶ дихання;
  - ▶ відсутність рогівкового рефлексу;
  - ▶ неможливість почути дихання і серцебиття за допомогою фонендоскопу;
  - ▶ синюшність слизових оболонок.

# Виведення тварини з експерименту

- ▶ Жоден із цих ознак в поодинці НЕ підтверджує смерть. У сумнівних випадках, перевірка смерті може бути доповнена чрескожною серцевою пунцією після втрати свідомості в тварини.
- ▶ Відсутність руху голки і шприца після введення в серце (попередньо перевіривши правильне розташування) вказує на відсутність серцевих скорочень і підтверджує смерть.





# Методи отримання біологічних рідин у лабораторних тварин

- ▶ **Отримання крові з кінчика хвоста**
- ▶ **Методика роботи**
- ▶ На операційному столику зафіксувати на спині наркотизованого щура. Розігріти хвіст тварини шляхом занурення його в теплу (+350С) воду. Приготувати меланжер і ножиці. Витягнути хвіст з води, насухо витерти чистою ганчірочкою і обробити спиртом. Взяти ножиці і відсікти 5-10 мм кінчика хвоста. Стиснути основу хвоста двома пальцями і таким чином провести по шкірі хвоста до його кінчика. Краплю, що з'явилася, швидко набрати в меланжер до потрібної відмітки.
- ▶ *Примітка.* Звішування хвоста за край столу обов'язкова умова для всіх пунктів даної роботи. У зв'язку з цим, кров в меланжер повинна поступати самопливом, а наявність бульбашок повітря в капілярній частці меланжера неприпустимо.

# Методи отримання біологічних рідин у лабораторних тварин

- ▶ **Ознайомлення з методикою отримання крові з серця**
- ▶ **Методика роботи**
- ▶ Щуру дають ефірний наркоз. Наркотизованого щура фіксують до операційного столу на спину. Вистригають вовну в області серця і дезинфікують шкіру. Пальпаторно визначають місце верхівкового поштовху серця. Надягають голку на шприць і вводять її в крапку, яка лежить на 10 мм краніальніше від встановленого верхівкового поштовху і на 1-2 мм латеральніше від лівого краю грудини. Вводять голку перпендикулярно площині грудної клітки одночасно витягуючи поршень шприца на себе.
- ▶ При появі крові в шприці зупинити просування голки і набрати 3-5 мл крові.

# Методи отримання біологічних рідин у лабораторних тварин

## ► Приклад узяття крові у кролика



### **Анастезія**

Кролик знеболюється, шляхом внутрішньовенної ін'єкції тіопентала в краєву вену вуха

# Методи отримання біологічних рідин у лабораторних тварин



## **Тестування рефлексів**

Кролик має бути в хірургічній анестезії перш, ніж починати брати кров з серця. Це можна оцінити, перевіривши міжпальцевої рефлекс використавши хірургічні щипці.

# Методи отримання біологічних рідин у лабораторних тварин



## **Пункція серця**

Кролик поміщається в спинне лежаче положення. Ділянка пункції - рівень з точкою ліктя. Необхідно уникати непотрібного руху голки шприця. Цього краще всього можна досягти тримаючись за пластмасову частину шприця і одночасної фіксації руки на грудях тварини.

# Методи отримання біологічних рідин у лабораторних тварин



## **Узяття крові**

Кров набирають повільно і м'яко. Не можна витягувати голку і намагатися проколоти серце удруге, оскільки це може привести до значного витоку крові в грудну клітку. Якщо кровотік слабкий, положення наконечника голки має бути ретельно відрегульоване, поки кров не почне текти нормально знову.

# Методи отримання біологічних рідин у лабораторних тварин

- ▶ **Ознайомлення з методикою отримання крові при декапітації тварин**
- ▶ **Методика роботи**
- ▶ Готується центрифужна пробірка з встромленою в неї воронкою. Наркотизованого щура з попереднього досліда беруть в ліву руку, а в праву "кравцеві" ножиці. Одним рухом проводять декапітацію тварини та збирають витікаючу кров в пробірку.



# Методи отримання біологічних рідин у лабораторних тварин

- ▶ Отримання крові у кролика з кровоносної судини вуха



## **Фіксація**

Зафіксувати тварину і ввести заспокійливий засіб, типа Асергомazine або Fluanisone, які викликають розширення периферійних кровоносних судин.



# Методи отримання біологічних рідин у лабораторних тварин



## Гоління

Голять ділянку шкіри вуха кролика, використовуючи широке лезо скальпеля. Необхідно уникати пошкодження шкіри, підтримуючи вуха знизу вказівним пальцем

# Методи отримання біологічних рідин у лабораторних тварин



## **Дезинфекція**

Ділянка вуха має бути продезинфікована перед проколом

# Методи отримання біологічних рідин у лабораторних тварин



## Артерія

Центральну артерію зазвичай легко проколоти по всій її довжини. Прокол потрібно робити як можна дистальніше, так, щоб пізніше можна було у разі потреби взяти наступні зразки крові.

# Методи отримання біологічних рідин у лабораторних тварин



## Пункція артерії

При заборі крові голка має бути зафіксована, її тримають твердо великим пальцем, щоб уникнути випадкового вилучення, якщо тварина почне рухатися

# Методи отримання біологічних рідин у лабораторних тварин



Пробірка для узяття крові може бути вставлена перед або після проникнення голки в артерію



# Методи отримання біологічних рідин у лабораторних тварин



## **Узяття крові**

Невелике обертання або рух кінчика голки може допомогти узяттю крові. Пробірка має бути нижче чим артерія, для кращого кровотоку

# Методи отримання біологічних рідин у лабораторних тварин



## **Завершення кровотечі**

Пробірка має бути видалена перед вилученням голки.  
Придавити місце проколу ватою і видалити голку

# Методи отримання біологічних рідин у лабораторних тварин



## **Зупинка крові**

Потримати вату протягом декількох хвилин, використовуючи велику скріпку для паперів, яка має бути злегка розширена, щоб уникнути непотрібного здавлення на вухо



# Методи отримання біологічних рідин у лабораторних тварин



## Методика отримання крові зі стегнової вени у миші

### Обладнання

Обладнання, яке потрібне для процедури (зліва направо): обмежуюча туба, лезо скальпеля, голка шприця, туба для збору крові і вата



### Фіксація миші

Миша фіксують в пластмасовій трубці з повітряними отворами в кінці

# Методи отримання біологічних рідин у лабораторних тварин



## Гоління

Лапка голиться у напрямку зростання волосся лезом скальпеля, поки не стане видна вена.



## Вена

Вену тепер добре видно.

# Методи отримання біологічних рідин у лабораторних тварин



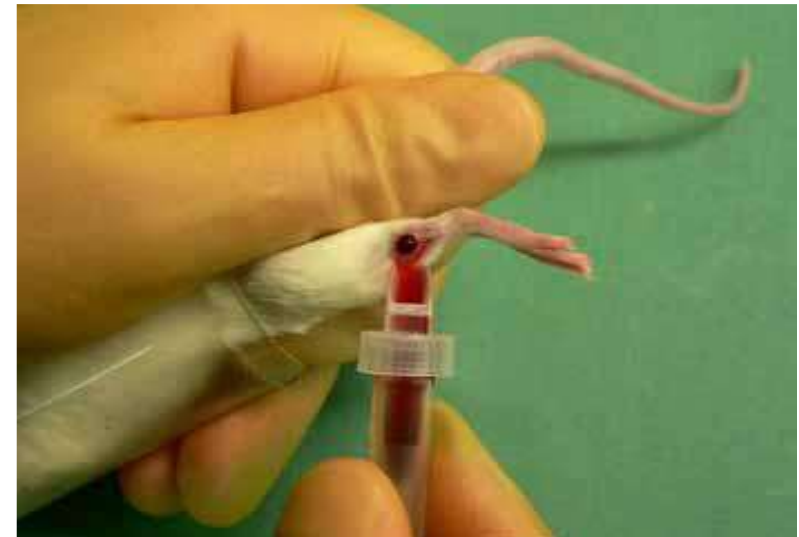
## Прокол

Вена проколюється голкою під кутом 90 до шкіри



## Кровотеча

Відразу після проколу з'являється крапля крові.



## Отримання крові

Кров збирається в тубу для мікрогематокрита.

# ТЕСТУВАННЯ

- ▶ **Внутрішньовенні ін'єкції здійснюють у бокову вену хвоста тонкої голкою:**
- ▶ А. Кроликам;
- ▶ Б. Собакам;
- ▶ В. Щурам;
- ▶ Г. Птахам.



В. Щурам

# ТЕСТУВАННЯ

- ▶ У мишей кров зручно брати:
- ▶ А. Із яремної вени;
- ▶ Б. Із стегнової вени;
- ▶ В. Із кінчика хвоста;
- ▶ Г. Пункцією серця



Б. Із стегнової  
вени



Дякую за увагу!

**Дякую за увагу!**



**Будьте здорові!**