

С. В. Васильева, Л. Ю. Карпенко, О. А. Душенина

Поиск оптимальных способов забора крови у лабораторных крыс в условиях хронического опыта

Аннотация.

Цель: выявление оптимальных способов взятия крови у крыс в рамках хронического опыта.

Материалы и методы. Были проведены две серии исследований, в первой из них проводилась сравнительная оценка диаметра иглы для венепункции. Во второй серии определялся объём крови, получаемой с антикоагулянтом и без него. Эксперимент проводился на крысах самцах линии Wistar, в качестве материалов использовали иглы-бабочки с гибким катетером различных размеров – 23G, 24G и 25G, шприц объёмом 2 мл и гепарин, разведённый с физиологическим раствором в соотношении 1:10 (500 ЕД/мл).

Результаты. В научном эксперименте установлено, что оптимальным размером иглы-бабочки для забора крови у лабораторных крыс является G-24 (диаметр иглы 0,55 мм). Иглы с меньшим диаметром не подходят для забора крови, так как в их просвете образуется кровяной сгусток, что существенно уменьшает объём отбираемой крови. Катетеры-бабочки с большим диаметром иглы (диаметр иглы 0,6 мм) создают эффект тампонады сосуда. Результаты второй серии опытов свидетельствуют о значительном увеличении объёма получаемой крови с применением антикоагулянта нежелезы без него. Это подтверждается в межгрупповом сравнении количества крови, полученного у крыс первой группы (с применением антикоагулянта) на 46,5 % превышает показатель второй группы (без использования антикоагулянта) ($P < 0,05$).

Заключение. Проведённые исследования свидетельствуют о том, что при заборе крови у крыс из хвостовой вены оптимальным размером иглы-бабочки являлся 24G. Применение раствора гепарина в концентрации 500 ЕД/мл позволяло получить от крыс объём крови на 46,5 % выше, чем без применения антикоагулянта. Использование на практике данного метода (шприца и катетера-бабочки размером G-24 совместно с антикоагулянтом) актуализирует многократный забор крови в хроническом эксперименте, уменьшает трудоёмкость процесса взятия крови и минимизирует травматизацию лабораторных животных.

Ключевые слова: кровь; гепарин; катетер-бабочка; крысы; венепункция; хвост; вены; пробирка; инъекционный шприц; антикоагулянт.

Авторы:

Васильева Светлана Владимировна — кандидат ветеринарных наук; e-mail: svvet@mail.ru;

Карпенко Лариса Юрьевна — доктор биологических наук, профессор; e-mail: l.u.karpenko@mail.ru;

Душенина Ольга Александровна — кандидат биологических наук; e-mail: olgranchenkova@yandex.ru;

Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины; 196084, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5.

Введение. Проведение доклинических исследований в экспериментах по изучению влияния различных препаратов, кормовых добавок на организм животных немислимо без использования лабораторных животных [1].

В российском законодательстве в полной мере освещены правила и нормы, охватывающие способы размещения и устройства помещений и их санитарное содержание, а также требования к условиям труда работников [2-4]. Однако сегодня учитываются подходы международного научного сообщества в отношении правовой базы, регулирующей статус лабораторных животных, что подразумевает гуманное к ним отношение.

Основные положения данной концепции уже сформулированы в рамках Страсбургской Конвенции от 18 марта 1986 года “О защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях”. Позднее в Евросоюзе была принята Директива об охране животных, используемых в научных целях (вступила в силу 01.01.2013 г.) [3]. Несмотря на отсутствие в Российском законодательстве аналогичных нормативно-правовых актов, регулирующих и регламентирующих этические нормы обращения с лабораторными животными, с профессиональной и морально-этической точки зрения целесообразно максимально гуманизировать

общие подходы к работе с ними [5].

В практике доклинических исследований весьма востребованными модельными животными являются крысы [6]. Это связано с их относительно небольшим размером, высокой адаптационной устойчивостью, неприхотливостью в содержании, быстрым размножением, отличной коммуникацией с человеком. Существенным недостатком в их использовании является неудобство взятия крови для анализа в условиях хронического опыта, особенно, если необходим относительно большой объём крови [7]. Поэтому применяемый в рамках острого опыта терминальный способ забора крови, основанный на декапитации животного, в хроническом опыте не приемлем.

При анализе различных щадящих способов взятия крови можно найти ряд недостатков, так или иначе влияющих на достоверность результатов как данной пробы, так и полученной впоследствии. Так, некоторые способы выполнимы только с применением общего наркоза — пункция сердца или ретроорбитального синуса, а также забор из яремной вены [8]. Методы, включающие рассечение тканей (надрез кончика уха, десны или лапы, отсечение кончика хвоста) приводят к травматизации тканей, что может отсрочено повлиять на последующие результаты в ретроспективе в виду развития воспалительного процесса. Кроме того, возможности дальнейшего использования животных будут снижены. Наиболее оптимальным способом взятия крови является венепункция иглой без применения средств анестезии и наркоза при надёжной фиксации животного [9]. У лабораторных крыс доступны для венепункции латеральная вена сафена, а также каудальная хвостовая вена.

Учитывая большую трудность в фиксации лабораторной крысы при взятии крови из вены сафена без применения средств седации ввиду возможности резкого сопротивления животного с использованием мышц-флексоров и экстензоров тазовой конечности, нами был выбран метод венепункции из каудальной хвостовой вены [10].

Цель исследований — выявление оптимальных способов взятия крови у крыс в рамках хронического опыта.

Материалы и методы. Для выполнения поставленной задачи были поэтапно проведены две серии исследований, в первой из них проводилась сравнительная оценка диаметра иглы для венепункции. Во второй серии определялся объём крови, получаемой с антикоагулянтом и без него.

В первой серии эксперимента было задействовано 15 самцов крыс линии Wistar, из которых сформировали 3 группы по 5 особей.

Возраст крыс — 3 месяца, масса 209-232 г. Перед взятием крови хвост животного погружали в ёмкость с тёплой водой (35-40°C) на 2-3 минуты. Затем хвост вытирали сухой салфеткой, перетягивали тонким резиновым жгутом у основания и фиксировали путём оборачивания тела животного в плотную ткань. Место инъекции обрабатывали этиловым спиртом и проводили венепункцию.

Крысам первой, второй и третьей группы использовали иглу-бабочку (устройство для вливания в малые вены SFM®) с гибким катетером различных размеров — 23G, 24G и 25G (параметры игл представлены в табл. 1), соответственно, а также шприц объёмом 2 мл.

Во второй серии опыта исследования были направлены на сравнение объёмов получаемой

Таблица 1. Параметры применяемых в эксперименте устройств для вливания в малые вены

Параметры	Маркировка иглы-бабочки		
	23G	24G	25G
Длина иглы, мм	19	19	19
Диаметр иглы, мм	0,6	0,55	0,4
Длина катетера, мм	190	190	190

Таблица 2. Результаты исследования количества крови с применением игл для венепункции различных размеров

№ животного	Объём крови, мкл		
	1 группа	2 группа	3 группа
1	0	420	260
2	0	1180	450
3	420	1220	510
4	310	680	620
5	340	970	380
Среднее по группе, (M±m)	214,0±89,2	894,0±152,4	444,0±60,5

крови с антикоагулянтом и без него. В качестве антикоагулянта был выбран гепарин, разведённый с физиологическим раствором в соотношении 1:10 (500 ЕД/мл), использовали иглы-бабочки G24 и шприцы на 2 мл. Группой контроля были крысы второй группы первой серии опыта. В подопытную группу по принципу аналогов отобрали 5 крыс, у которых брали кровь с использованием раствора гепарина, используя технологию, описанную выше. К шприцу подсоединяли иглу-бабочку и насыщали около 1 мл раствора антикоагулянта, затем полностью выпускали раствор из системы, при этом небольшое его количество оставалось на стенках шприца и трубки в виде конденсата. Измерение объёма каждой пробы крови проводили методом аликвотирования с применением автоматических дозаторов переменного объёма «Biohit».

Результаты и обсуждение. Проведение первой серии исследований дало следующие результаты (табл. 2).

При попытке забора крови у двух животных первой группы кровь не поступала в гибкий катетер, хотя после удаления иглы наблюдалось венозное кровотечение, что свидетельствует о проведённой пункции. Однако при большом диаметре иглы возможен тесный контакт её сечения с поверхностью эндотелия, что создаёт эффект тампонады. Исследование показало, что толщина иглы 23G оказалась сопоставимой по диаметру хвостовой вены исследуемых крыс и поэтому не подходит для венепункции. С помощью более тонких игл (24G и 25G) получилось отобрать кровь у всех крыс, но наибольшее количество биоматериала получено у животных второй группы.

Таким образом, диаметр иглы 0,55 мм по результатам исследования является оптимальным, что соответствует размеру 24G. Более тонкие иглы, по-видимому, подвержены образованию кровавого сгустка в просвете, что существенно уменьшает объём отбираемой крови.

Результаты проведённого эксперимента свидетельствуют о значительном увеличении объёма получаемой крови с применением антикоагулянта. Так, при межгрупповом сравнении количество полученной у крыс группы 1 крови на 46,5% превышает показатель группы 2 ($P < 0,05$).

Заключение. На основании проведённых исследований можно сделать следующие выводы:

1. При проведении хронических опытов на лабораторных крысах возможно многократное взятие крови из хвостовой вены с применением шприца и иглы-бабочки размера 24G или 25G.
2. При сравнительном исследовании систем для взятия крови у крыс определён оптимальный размер иглы-бабочки — 24G, позволяющий отобрать наибольший объём крови.
3. Использование антикоагулянта — раствора гепарина в концентрации 500 ЕД/мл для предварительного промывания шприца и катетера-бабочки позволяет получить от крыс объём крови на 46,5 % выше, чем без применения антикоагулянта.
4. Применение шприца и иглы-бабочки для взятия крови у крыс из хвостовой вены не вызывает травматизацию животных и позволяет проводить данную процедуру многократно в рамках хронического опыта.

Учитывая тот факт, что гепаринизированная кровь может использоваться не только для гематологического анализа, но и для биохимического, эндокринологического и иммунологического исследования при условии отделения плазмы, можно использовать данный метод забора крови при проведении экспериментов с обширным перечнем исследуемых показателей. Описанный в данной статье эксперимент может послужить для оптимизации научно-исследовательской работы в вивариях при выполнении различных доклинических исследований, полученные результаты могут быть использованы для постановки экспериментов в рамках диссертационных работ.

Таблица 3. Результаты исследования количества крови, полученной с применением антикоагулянта и без него

№ п/п	Объём полученной крови, мкл	
	Группа 1	Группа 2
1	1350	420
2	1280	1180
3	1370	1220
4	930	680
5	1620	970
Среднее по группе ($M \pm m$)	1310,0 $\pm$ 111,0	894,0 $\pm$ 152,4

Литература

1. Сорокина А. В. Опыт проведения клинко-лабораторных исследований в доклинической оценке безопасности лекарств (часть 2: биохимические и патоморфологические исследования) / А. В. Сорокина, С. В. Алексеева, Н. В. Еремина, А. Д. Дурнев // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. — 2019. — Т. 9. — № 4. — С. 272-279. doi 10.30895/1991-2919-2019-9-4-272-279.
2. СанПиН 3.3686-21. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней: издание официальное: утвержден главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 28.01.2021; введен 01.09.2021. — Москва: ДЕАН, 2021. — 1092 с.
3. ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур (Переиздание) : межгос. Стандарт: изд. Офици.: дата введения 2016-07-01. — Москва: Стандартинформ, 2019. — 13 с.
4. Бондарева Е. Д. Нормативно-правовое регулирование деятельности питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев) / Е. Д. Бондарева, М. Н. Макарова, М. А. Ковалева [и др.] // Лабораторные животные для научных исследований. — 2018. — № 4. — С. 100-115. doi 10.29296/2618723X-2018-04-08.
5. Клиническая лабораторная диагностика: Учебник в двух томах / А. В. Бугров, В. В. Долгов, С. П. Казаков [и др.]. — Москва: ООО «Лабдиаг», 2017. — 464 с. — ISBN 978-5-7249-2608-9.
6. Васильев, А. Н. Качественные доклинические исследования - необходимый этап разработки и внедрения в клиническую практику новых лекарственных препаратов / А. Н. Васильев // Антибиотики и химиотерапия. — 2012. — Т. 57. — № 1-2. — С. 41-49.
7. Дьякон А. В. Метод забора крови у животных / А. В. Дьякон, И. С. Хрыкина, А. А. Хегай [и др.] // Межд. журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2013. — № 11-2. — С. 84-85.
8. Taraskin A. Blood biochemical markers in Saanen goats depending on month of pregnancy / A. Taraskin, A. Bakhta, L. Karpenko [et al.] // FASEB Journal. — 2021. — Vol. 35. — No S1. — P. 05198. doi 10.1096/fasebj.2021.35. S 1.05198.
9. Патент № 2719912 С1 России, МПК G09B 23/28. Способ забора крови у крыс из периферических вен хвоста: № 2019121113: заявл. 03.07.2019; опубл. 23.04.2020 / П. Д. Тимкин, М. Е. Кропотова, Н. И. Петренко; заявитель ФГБОУ ВО "Амурская государственная медицинская академия" Министерства здравоохранения России.
10. Карпенко, Л. Ю. Особенности показателей белой крови при хроническом респираторном синдроме крыс / Л. Ю. Карпенко, А. И. Козицына, П. А. Полистовская // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. — 2021. — № 1. — С. 120-122. doi 10.17238/issn2072-6023.2021.1.120.

Vasilyeva S., Karpenko L., Dushenina O.

Search for optimal methods of blood sampling from laboratory rats under conditions of chronic experiment

Abstract.

Purpose: to identify the optimal ways of taking blood from rats in the framework of a chronic experiment.

Materials and methods. Two series of studies were conducted, in the first of which a comparative assessment of the diameter of the venipuncture needle was carried out. In the second series, the volume of blood received with and without anticoagulant was determined. The experiment was carried out on male Wistar rats, using butterfly needles with a flexible catheter of various sizes - 23G, 24G and 25G, a 2 ml syringe and heparin diluted with saline in a ratio of 1:10 (500 IU/ml).

Results. In a scientific experiment, it was found that the optimal size of the butterfly needle for blood sampling in laboratory rats is G-24 (needle diameter 0.55 mm). Needles with a smaller diameter are not suitable

for blood sampling, as a blood clot forms in their lumen, which significantly reduces the volume of blood taken. Butterfly catheters with a large needle diameter (needle diameter 0.6 mm) create the effect of vessel tamponade. The results of the second series of experiments indicate a significant increase in the volume of blood received with the use of an anticoagulant than without it. This is confirmed in the intergroup comparison of the amount of blood obtained in rats of the first group (with the use of anticoagulant) by 46.5 % higher than in the second group (without the use of anticoagulant) ($P < 0.05$).

Conclusion. The conducted studies indicate that when taking blood from the tail vein of rats, the optimal size of the butterfly needle was 24G. Also, the use of a heparin solution at a concentration of 500 U / ml made it possible to obtain a blood volume from rats that was 46.5 % higher than without the use of an anticoagulant. The use of this method in practice (a syringe and a G-24 butterfly catheter together with an anticoagulant) actualizes multiple blood sampling in a chronic experiment, reduces the laboriousness of the blood sampling process and minimizes trauma to laboratory animals

Keywords: blood; heparin; butterfly catheter; rats; venipuncture; tail; veins; test tube; injection syringe; anticoagulant.

Authors:

Vasilyeva S. — PhD (Vet. Sci.); e-mail: svvet@mail.ru;

Karpenko L. — Dr. Habil (Biol. Sci); Professor, e-mail: l.u.karpenko@mail.ru;

Dushenina O. — PhD (Biol. Sci.); e-mail: olgpanchenkova@yandex.ru;

St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, 196084, St. Petersburg, st. Chernigovskaya, 5.

References

1. Sorokina A. V. Experience in clinical and laboratory tests in the preclinical assessment of the safety of drugs (part 2: biochemical and pathomorphological studies) / A. V. Sorokin, S. V. Alekseeva, N.V. Eremin, A. D. Durnev // Vedomosti of the Scientific Center for Expertise of Medical Application. Regulatory research and examination of medicines. — 2019. — Vol. 9. — № 4. — P. 272-279. doi 10.30895/1991-2919-2019-4-272-279.
2. Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases: Official publication: approved by the chief state sanitary doctor of the Russian Federation on 01.28.2021: Introduced 01.09.2021. — Moscow: Dean, 2021. — 1092 p.
3. Guide to maintain and care for laboratory animals. Rules for the equipment of premises and organization of procedures (reprint): Intersgos. Standard: ed. Official: Date of introduction 2016-07-01. — Moscow: Standinform, 2019. — 13 p.
4. Bondareva E. D. The regulatory regulation of the activities of nurseries and experimental-biological clinics (Vivarias) / E. D. Bondareva, M. N. Makarova, M. A. Kovaleva [et al.] // Laboratory animals for scientific scientific research. — 2018. — № 4. — P. 100-115. doi 10.29296/2618723x-2018-04-08.
5. Clinical laboratory diagnostics: a textbook in two volumes / A. V. Bugrov, V. V. Dolgov, S. P. Kazakov [et al.]. — Moscow: LLC Labdiag, 2017. — 464 p. — ISBN 978-5-7249-2608-9.
6. Vasiliev A. N. High -quality preclinical research - the necessary stage in the development and introduction of new drugs into the clinical practice of / A. N. Vasiliev // Antibiotics and chemotherapy. — 2012. — Vol. 57. — № 1-2. — P. 41-49.
7. Deacon A. V. Method of blood fence in animals / A. V. Deacon, I. S. Khrykin, A. A. Hyegai [et al.] // International Journal of Applied and Fundamental Research. — 2013. — №11-2. — P. 84-85.
8. Taraskin A. Blood biochemical markers in Saanen goats depending on month of pregnancy / A. Taraskin, A. Bakhta, L. Karpenko [et al.] // FASEB Journal. — 2021. — Vol. 35. — No S1. — P. 05198. doi 10.1096/fasebj.2021.35. S 1.05198.
9. Patent No. 2719912 C1 Russia, MPC G09B 23/28. The method of blood fence in rats from the peripheral veins of the tail: No. 2019121113: declared. 07/03/2019: publ. 04/23/2020 / P. D. Timkin, M. E. Kropotova, N. I. Petrenko; The applicant of the Amur State Med. Academy” of the Ministry of Health of the Russia.
10. Karpenko, L. Yu. Features of white blood in the chronic respiratory syndrome of rats / L. Yu. Karpenko, A. I. Kozitsyn, P. A. Polystovskaya // Issues of regulatory regulation in veterinary medicine. — 2021. — №. 1. — P. 120-122. doi 10.17238/ISSN2072-6023.2021.1.120.