

Базовые экспериментальные манипуляции с грызунами

ВЭК ООО «НИИ Митоинженерии МГУ»

Сотрудник отдела обеспечения качества, в.н.с., к.б.н.
Белопольская Мария Владимировна

Общие положения

- ❑ Все манипуляции – после карантина
- ❑ Перед выполнением манипуляций с животными необходимо надеть средства индивидуальной защиты: халат, шапочку, маску, перчатки.
- ❑ Частое и бережное обращение с лабораторными грызунами приучают их не бояться манипуляций.
- ❑ Мышей нужно брать из клетки за хвост на расстоянии 1-2 см от туловища животного.
- ❑ Крыс всегда берут за туловище. Животных весом более 500 г придерживают рукой снизу



Хендлинг

Проведение хендлинга до начала экспериментальных процедур:

- ✓ **Минимизирует стресс у животных, вызванный взаимодействиями с человеком**
- ✓ **Снижает риск укусов у персонала**
- ✓ **Способствует снижению variability экспериментальных данных.**



Оптимально процесс приучения к рукам проводить у молодых животных, через некоторое время после привоза из питомника, в период адаптации.

Минимальный хендлинг должен осуществляться лаборантами при пересадке животных.

Для выполнения поведенческих исследований рекомендован предварительный хендлинг в течение 5 дней, одним человеком.

До того, как брать крыс или мышей в руки, вы должны дать им возможность осознать ваше присутствие, особенно, если животное спит. Это снизит стресс и позволит избежать укусов.

Хендлинг

Грызунов нужно удерживать твердой рукой, но осторожно.

1 этап – приучение к рукам

- Сложите руки чашечкой
- Перенесите крыс в маленькую клетку (Т2)
- Положите руку в клетку, позвольте крысам внимательно ее исследовать в течение нескольких минут.
- Делайте это ежедневно
- Через 1-2 дня крысы спокойно позволят приподнять себя на ладони на несколько сантиметров над полом.



Хендлинг

2 этап

- Для того, чтобы взять крысу в руки, необходимо вначале аккуратно взять ее, поместив большой и указательный палец вокруг груди.
- Если вы боитесь быть укушенным, положите большой палец под челюсть, но не давите на горло крысе! Приподнимите животное над полом.
- Для более надежной фиксации можете закрепить хвост между третьим и четвертым пальцами
- Поддерживайте нижние лапы животного другой рукой или дайте животному опереться задними лапами о рукав вашего халата, не позволяя им висеть в воздухе.
- Можете посадить крысу на рукав халата, придерживая ее другой рукой, погладить, позволить ей исследовать вашу руку



Фиксация.

Общие положения

- Исследователь должен фиксировать животное так, чтобы максимально уменьшить дискомфорт или травмирование.
- Продолжительность фиксации должна быть минимальной, необходимой для выполнения задач исследования.



Фиксация крыс

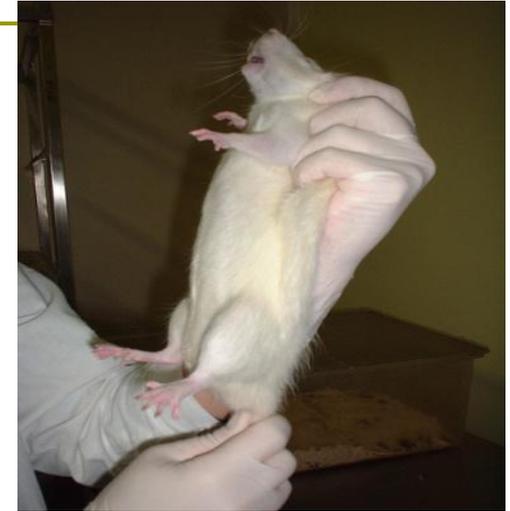
В зависимости от задач можно фиксировать крысу любым из следующих способов:

- Фиксация крысы за кожу спины.

Для фиксации за кожу спины необходимо собрать продольную складку кожи, начинающуюся с шеи и заканчивающуюся на пояснице. Эту складку удерживают сомкнутыми четырьмя пальцами (2-5) с одной стороны и большим пальцем и основанием ладони с другой. При правильной фиксации подвижность головы ограничена.

- Фиксация крысы по бокам грудной клетки.

При фиксации крысы за грудную клетку указательным и средним пальцами фиксируют шею под нижней челюстью, сомкнутыми безымянным пальцем и мизинцем – левую переднюю лапу, а большим пальцем – правую переднюю лапу. Лапы должны быть перекрещены на груди крысы. Другой рукой животное фиксируется за хвост.



Фиксация мышей

- **Фиксацию мышей** осуществляют за складку кожи на шее и холке мыши на ровной поверхности. Далее мышь держат на весу одной рукой. Хвост мыши при этом удерживают сомкнутыми безымянным пальцем и мизинцем и основанием ладони.



Фиксация мышей на ровной поверхности.



Фиксация мышей на весу.

Для перфорации ушных раковин складка кожи на спине мыши захватывается таким образом, чтобы уши были легко доступны

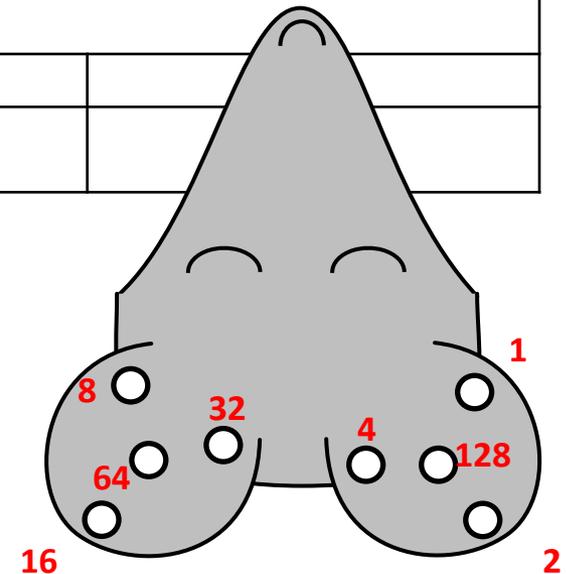


Идентификация животных



- К основным методам идентификации лабораторных грызунов и кроликов относят: карточку (этикетку) на клетке; прокол (надрез) ушной раковины; ярлыки (бирки) на ушной раковине; татуаж; маркеры; микрочипирование.
- Фукорцин не применяется у животных из-за содержания фенола.
- На каждой клетке с животными должна присутствовать **бумажная этикетка**.
- При поступлении в виварий из питомников сотрудники вивария заполняют этикетку на животных по следующему образцу:

№ КЛЕТКИ		№ ПРОТОКОЛА	
		КОЛ-ВО	ПОЛ
ЛИНИЯ/СТОК		НОМЕРА ЖИВОТНЫХ	
ДАТА ПОСТАВКИ		ВЕС/ВОЗРАСТ ПРИ ПОСТАВКЕ	
МАНИПУЛЯЦИИ, ВВОДИМЫЕ ВЕЩЕСТВА			
ОСОБЫЕ ОТМЕТКИ			
ИССЛЕДОВАТЕЛЬ(тел.)			
ВЕТЕРИНАР (тел.)			



Основные методы идентификации лабораторных животных

	Постоянно/Временно	Анастезия	Боль/Дискомфорт	Хендлинг/Рейстрейнер
Бритье/стрижка шерсти	В	Нет	Д	Нет
Кожная метка	В	Нет	Д	Нет/Х
Цветная метка шерсти	В	Нет	Д	Нет
Ушная метка - бирка	В	Нет	Б	Р
Тату на ушах	П	Нет	Б	Х/Р
Тату на хвосте	П	Нет	Б	Х
Тату на пальцах/подушечках	П	Нет	Б	Р
Микрочип	П	Да	Б	Х/Р
Ушная насечка	П/В	Нет	Б	Х
Ампутация фаланг пальцев. <i>Не рекомендуется. Возможно лишь в возрасте 4-8 дней.</i>	П	Нет	Б	Х

Введение экспериментальных веществ

- Для каждого пути введения следует выбрать подходящий размер иглы
- Меняйте иглы перед введением каждому животному, чтобы избежать переноса вещества и инфекции.
- Следите, чтобы игла была острой.
- Если требуется многократное внутривенное введение препарата, предусмотрите возможность катетеризации вен у животных.

Рекомендуемые размеры игл для введения веществ разными путями

Вид	в/к	п/к	в/м	в/в	в/б	в/ж
Мышь	26-27G	25-27G	27G	25-28G	23-27G	22G
Крыса	27G	26G	25G	25-27G	23-25G	18G

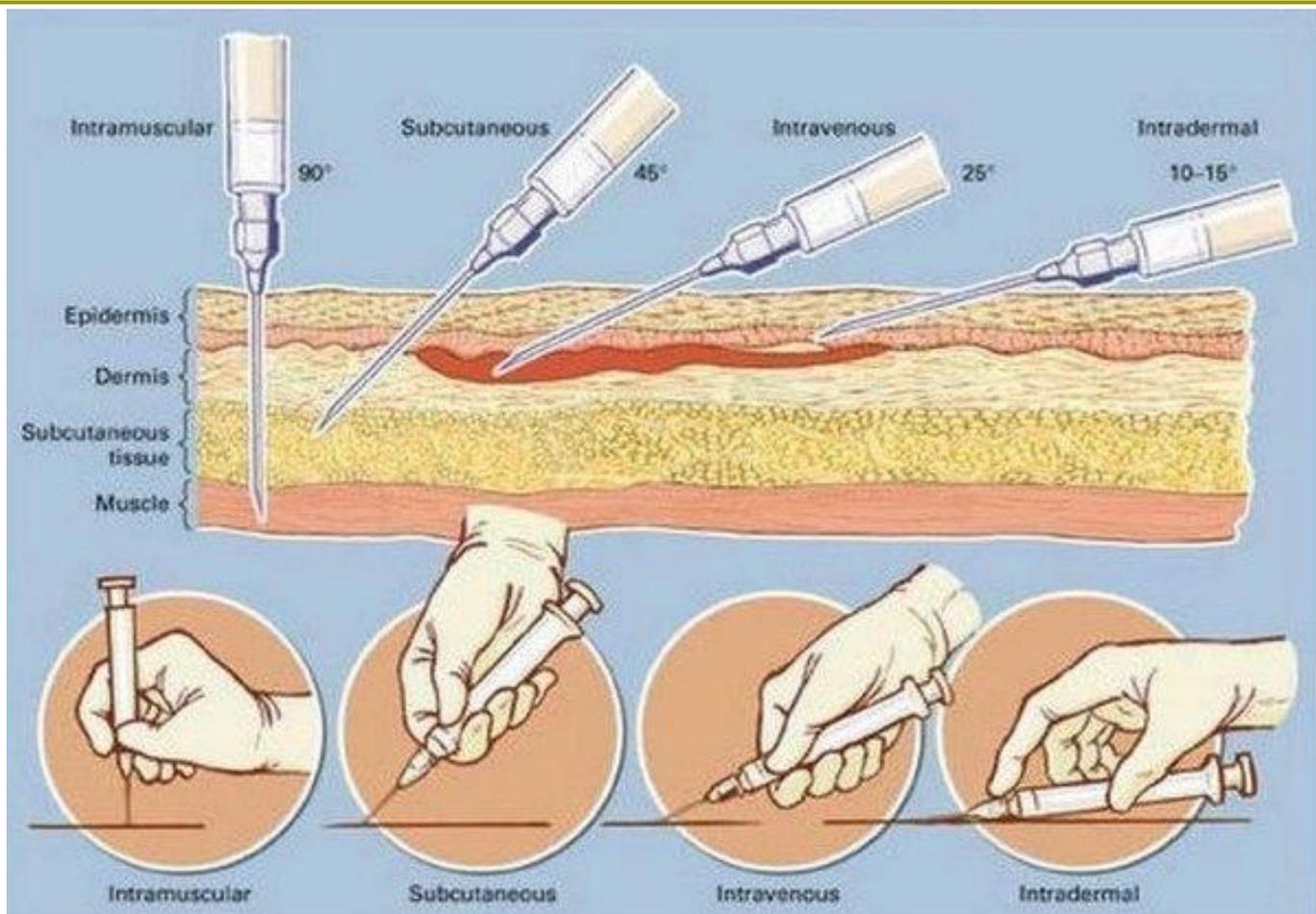


Рекомендованные/максимальные объемы введения (мл.)

Вид	Вес, гр.	Внутрибрюшинно	Внутривенно	Внутримышеч но	Подкожно	Внутрижелудоч но
Мышь	20 – 24	0,4/1,92	0,12/0,5	0,05/0,1	0,2/0,8	0,2/1
	25-30	0,5/2,32	0,125/0,5	0,2/0,5	0,25/1	0,25/1,25
	>30	0,6/2,4	0,15/0,5		0,3/1,2	0,3/1,5
Крыса	100 – 200	2/4	0,5/2	0,1/0,2	0,5/1	1/4
	200 – 240	2,4/4,8	1/4		1/2	2/8
	250 – 300	3/6	1,25/5		1,25/2,5	2,5/10
	> 300	3,1/6,2	1,5/6		1,5/3	3/12

Согласно "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" // JOURNAL OF APPLIED TOXICOLOGY 21, 15-23 (2001) Karl-Heinz Diehl, Robin Hull, David Morton, Rudolf Pfister, Yvon Rabemampianina, David Smith, Jean-Marc Vidal and Cor van de Vorstenbosch

Под каким углом делать инъекции?



Внутримышечные — 90
градусов
Подкожные — 45 градусов

Внутривенные — 25 градусов
градусов
Внутрикожные — 10-15 градусов

Подкожное введение

- Для проведения подкожных инъекций желательно наличие ассистента, который будет выполнять фиксацию животного.
- Объем зависит от плотности кожи животного (и, соответственно, от размера подкожного пространства).
- При введении больших объемов используют несколько точек (до четырех: под левую и правую лопатки, спину и точку около хвоста.).
- Иглу необходимо держать под углом 45° к телу животного.



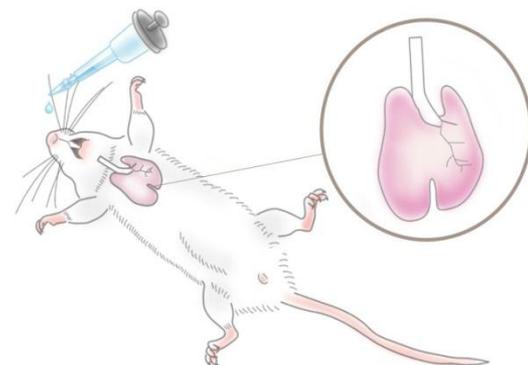
Инстилляций глазных капель



- При использовании автоматической пипетки:
 - ▣ Набрать в пипетку необходимый объем препарата.
 - ▣левой рукой зафиксировать животное.
 - ▣Поднести носик пипетки к конъюктивному мешку глаза животного и нажатием на поршень пипетки выдавить вещество.
- При использовании специальных флаконов-капельниц:
 - ▣Открутить колпачок флакона-капельницы, положить его рабочую поверхность.
 - ▣левой рукой зафиксировать животное
 - ▣Взять перевернутый флакон большим и указательным пальцами.
 - ▣На кончик носика флакона-капельницы выдавить небольшую каплю раствора.
 - ▣Поднести носик флакона-капельницы к животному таким образом, чтобы выдавленная капля раствора попала в конъюктивный мешок глаза.
- Животное вернуть в клетку.
- Удостовериться, что животное видит нормально, и оно свободно перемещается по клетке.
- Поставить отметку о введении в соответствующем протоколе.

Интраназальное введение

- Набрать в пипетку нужный объем раствора (общий объем вводимого вещества – не более 20 мкл для мыши и не более 50 мкл для крысы).
- Левой рукой зафиксировать животное.
- На кончик носика пипетки выдавить небольшую каплю раствора.
- Поднести пипетку к животному таким образом, чтобы выдавленная капля раствора вплотную приблизилась к носовому ходу животного.
- Подождать пока животное вдохнет эту каплю.
- При необходимости ввести больше одной капли носовые ходы нужно чередовать.
- Животное вернуть в домашнюю клетку.
- Удостовериться, что дыхание у животного нормальное, и оно свободно перемещается по клетке.
- Поставить отметку о введении в соответствующем протоколе.



Внутрибрюшинное введение

- ❑ Набрать в шприц нужный объем раствора.
- ❑ Животное жестко зафиксировать в руке:
 - ❑ В случае проведения инъекции мыши, большим и указательным пальцем левой руки захватить животное за кожу загривка. Средний палец подложить под спину животного. Мизинцем прижать хвост животного к ладони. Безымянным пальцем оттянуть и держать за стопу заднюю конечность животного.
 - ❑ В случае проведения инъекции крысе (старше 40 дня), указательным и средним пальцем левой руки обхватить животное сзади за шею. Переднюю лапу животного зажать между указательным и большим пальцами. Мизинцем оттянуть заднюю лапу и зафиксировать ее.
- ❑ Наклонить руку с зафиксированным животным таким образом, чтобы животное оказалось вниз головой, животом кверху под небольшим углом.
- ❑ Инъекцию проводить в нижнюю треть живота, ближе к стороне, иглой по направлению от себя, под углом к животному примерно 30-45 градусов.
- ❑ Если на месте инъекции выступила кровь, остановить ее, прижав стерильной салфеткой.
- ❑ Животное вернуть в клетку.
- ❑ Удостовериться, что дыхание у животного нормальное, и оно свободно перемещается по клетке.
- ❑ Поставить отметку о введении в соответствующем протоколе.



Внутрижелудочное введение

□ Зафиксировать животное рукой. Правильная фиксация является необходимым условием успешного выполнения процедуры.

Фиксацию крыс осуществляют либо за кожу спины, либо по бокам грудной клетки.

Первый способ удобнее при работе с животными до 250-300 г, второй – при работе с более крупными крысами.

□ Другой рукой взять шприц с зондом. Цилиндр шприца удерживать большим и средним пальцами, указательный палец должен быть свободен для того, чтобы давить на поршень шприца.

□ Несколько откинуть голову животного назад и ввести зонд в пищевод, проводя зонд вдоль верхнего неба и верхнего ряда зубов. **Введение зонда осуществлять без усилия.** При проведении процедуры существует риск введения зонда в трахею. О попадании зонда в трахею можно судить по нарушению ритма дыхания крысы и осязательному механическому сопротивлению. В этом случае немедленно извлечь зонд и освободить животное.

□ После введения зонда на глубину, соответствующую расположению желудка, ввести вещество, надавив на поршень шприца указательным пальцем. Жидкость вводить плавно, за 5-15 сек. (или более в случае больших объемов). При появлении признаков асфиксии немедленно прекратить введение, извлечь зонд и освободить животное. В случае, если жидкость была введена в трахею, признаками чего являются нарушения дыхания, животное должно быть эвтаназировано.

□ Плавно извлечь зонд и освободить животное.

□ После проведения процедуры следует осмотреть животное в клетке. При наличии признаков асфиксии животное должно быть эвтаназировано.

□ Перед введением следующему животному из данной клетки зонд протереть салфеткой, смоченной в 70% растворе этилового спирта. При смене клеток зонд следует промыть 3% раствором перекиси водорода либо 70% раствором спирта, затем – стерильной водой и высушить салфетками.

□ Поставить отметку о введении в соответствующем протоколе.



Отбор крови

- Если кровь отбирать слишком часто, у животного может развиться анемия.
- Восстановление полного кровяного состава происходит через 2 недели по формуле 1 мл/кг/день.
- Каждые 24 часа можно отбирать до 1% объема циркулирующей крови, каждые 7 дней – 7,5%, каждые 2-4 недели - 10%.
- Если большой объем крови (>15%) отбирать слишком быстро без замещения, животное может испытать гиповолемический шок. Однако слишком медленно тоже не стоит – кровь сворачивается, не больше 5 мин.
- При проведении кровезамещения можно увеличить объем максимального взятия крови вдвое. Для кровезамещения следует сразу после отбора крови ввести внутривенно теплый физиологический раствор в том объеме, в котором была взята кровь.



Объем циркулирующей крови у лабораторных животных

Вид животного	Объем циркулирующей крови, мл
Мышь (20-40 гр)	1-2,8
Крыса (125-350 гр)	6,8-24,5
Хомяк (60-110 гр)	4,7-8,58

Объемы крови и восстановительный период

% от объема циркулирующей крови	Мышь 25 гр.	Крыса 250 гр	Восстановительный период
7,5%	0,1 мл	1,2 мл	1 неделя
10%	0,2 мл	1,6 мл	2 недели
15%	0,3 мл	2,4 мл	4 недели

Каждые 3-4 недели можно отбирать до 15% объема циркулирующей крови.

Места прижизненного взятия крови

Вид	Латеральная вена хвоста вена	Ампутация кончика хвоста (с анальгезией)	Ретрорбитальный синус глаза (под анестезией)	Кардиальная пункция (под анестезией)	Вена бедра	Лицевая вена (под анестезией)	Подъязычная вена (под анестезией)
Мышь	+	-	+	-	+	+	-
Крыса	+	+	+	+	+	+	+



FIGURE 1. Blood collection from the saphenous vein.

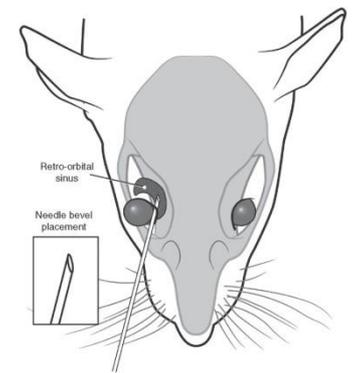
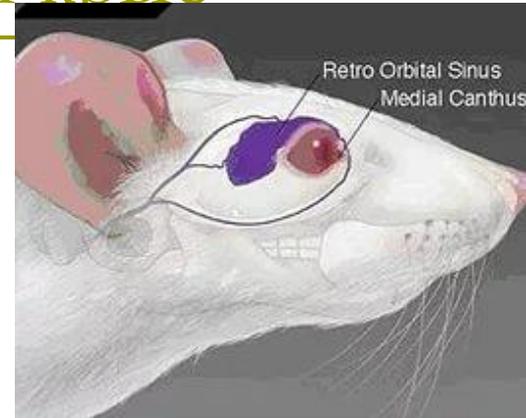
Процедура взятия проб крови путем ампутации кончика хвоста у крыс

- Для того чтобы сосуды хвоста расширились, необходимо животное согреть. Для этого крыс помещают в рестейнер и массируют хвост.
- Размер рестейнера должен соответствовать размеру животного. Животное должно быть зафиксировано надежно, но дыхание не должно быть затруднено. Рестейнер для мыши может быть изготовлен из полипропиленовой пробирки объемом 50 мл, у которой необходимо срезать дно для обеспечения дыхания мыши и обрезать по длине под размер животных.
- Зафиксированное животное поместить на краю стола.
- Протереть кожу хвоста салфеткой, смоченной кожным антисептиком. Вытереть хвост сухой салфеткой.
- Применить местное обезболивание.
- Ножницами срезать кожу на кончике хвоста (0.5-1 мм). Нельзя травмировать позвонки. При повторных взятиях образцов либо удалить тромб, либо (после заживления раны) повторно срезать кожу. Уменьшение длины хвоста более чем на 5 мм – недопустимо.
- У хорошо согретою животного после надреза хорошо идет кровь. Капли крови собирать в пробирки, при необходимости обработанные антикоагулянтom. Для улучшения сбора крови совершать массирующие движения по направлению от тела к кончику хвоста, «выдавливая» кровь из боковых вен.
- После получения запланированного объема крови остановить кровотечения, используя стерильные салфетки. Обработать рану антисептиком.
- Животное вернуть в клетку.
- Поставить отметку о взятии крови в соответствующем протоколе.



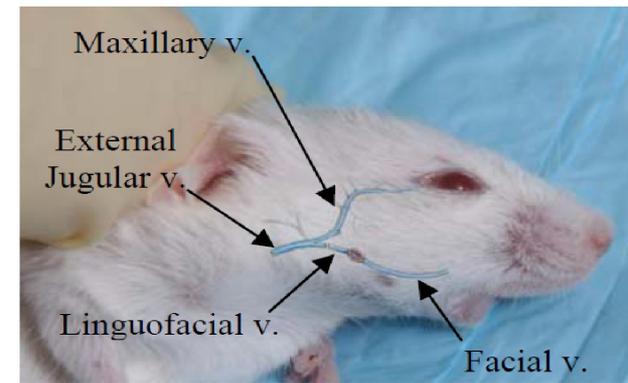
Процедура взятия проб крови из ретрорбитального синуса у мышей и крыс

- Взятие проб крови из ретроорбитального синуса глаза без анестезии у мышей и крыс недопустимо. Фиксация животного осуществляется рукой за кожу спины так, чтобы на шее животного кожа была туго натянута, при этом будет частично ограничен отток крови от головы животного. Об удачной фиксации можно судить по цианозу видимых слизистых оболочек и языка.
- Стерильный стеклянный капилляр, смоченный в растворе коагулянта, ввести во внутренний угол глаза, слегка надавливая и поворачивая. Совершая вращательные движения продвинуть капилляр вглубь и вверх. Эта процедура не требует применения силы!
- При достижении синуса капилляр практически мгновенно заполнится кровью. Вынуть капилляр и подставить пробирку для сбора крови, при необходимости заполнить раствором антикоагулянта.
- После получения запланированного объема крови *обеспечить остановку кровотечения*, используя стерильные салфетки, ослабить фиксацию.
- При необходимости закапать в глаз антисептик (альбуцид, мирамистин, и т.п.) и лидокаин.
- Животное вернуть в клетку, убедиться, что животное не получило серьезных повреждений.
- Сделать отметку в протоколе эксперимента о взятии крови.



Процедура взятия проб крови из лицевой вены у мышей и крыс

- Достать животное из клетки, наркотизировать с помощью ингаляционного анестетика .
- Когда животное потеряло позу, взять его в левую руку за складку кожи на спине так, чтобы натянуть кожу на голове в частности, над точкой нижней челюсти, где будет выполняться пункция.
 - Определить место пункции. *Для этого найти точку без шерсти на нижней челюсти около угла нижней челюсти. Место пункции - чуть выше и дорсальной этой точки в районе задней части челюстной кости сразу за соединением верхней и нижней челюстей.*
 - Обработать место пункции тампоном с антисептиком.
 - *Провести пункцию вены скарификатором. Прокол должен быть достаточно сильным, чтобы обеспечить быстрое проникновение острия на нужную глубину (4-5,5 мм в случае скарификатора).*
- Быстро поднести пробирку для сбора крови, собрать выступающие капли крови в пробирку с антикоагулянтом .
 - Для остановки кровотечения прижать чистый тампон с антисептиком на несколько секунд к месту пункции.
 - Животное вернуть в клетку, понаблюдать за состоянием животного в клетке в течение минуты для выявления/отсутствия кровотечения или признаков дистресса.
 - Сделать отметку в протоколе.



Процедура взятия проб крови из камер сердца у мышей и крыс

- Взятие проб крови из камер сердца как правило является терминальной процедурой, сразу после которой проводят эвтаназию животного. Животные должны быть наркотизированы.
- Животное кладут на стол брюшной стороной вверх. У крыс иглу вводят с левой стороны грудной клетки, предварительно пальпируя положение сердца. Глубина введения иглы 1-2 см, в зависимости от размера крысы. Производят забор крови. В случае, если игла не попала в камеру, вынуть шприц и повторить процедуру.
- У мышей иглу вводят под грудину, несколько левее средней линии, срезом вверх. Глубина введения иглы 1-1,5 см. Производят забор крови. В случае, если игла не попала в сердце, вынуть шприц и повторить процедуру .
- **ПРОВЕСТИ ЭВТАНАЗИЮ ЖИВОТНОГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА, УКАЗАННОГО В ПРОТОКОЛЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.**
- Сделать отметку в протоколе.



Маркировка образцов

Образец – любой материал, взятый из тест-системы для изучения, анализа или хранения

В соответствии с СОПами и протоколом образцы:

- Собираются
- Маркируются
- Подготавливаются
- Хранятся
- Транспортируются

Образцы должны быть идентифицированы с указанием:

- номера/кода исследования,
- тест-системы,
- природы образца,
- даты получения.

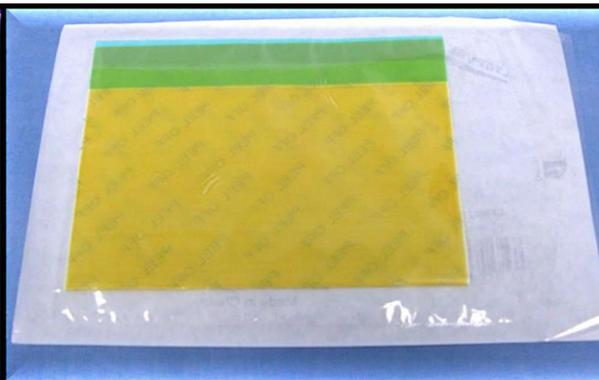
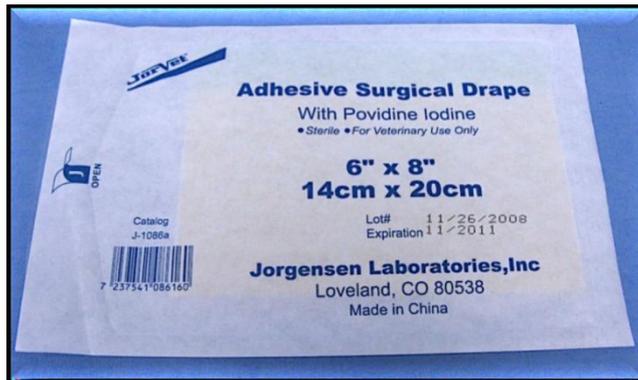
Данная информация должна быть указана на контейнере или сопровождать образец

На контейнерах с реагентами, растворами должна быть следующая информация:

- Название
- Концентрация
- Срок годности



Материалы для хирургических вмешательств



- Клеющая сторона к животным.
- Если возможно, накрывать животных вместе с хвостом.

Хирургические вмешательства

- При проведении хирургических операций исследователь должен руководствоваться принципами гуманного обращения с животными и соблюдать основные правила проведения хирургических операций.
- Все хирургические вмешательства должны проводиться квалифицированными сотрудниками.
- Большие и малые операции с выживанием животного должны проводиться с соблюдением правил асептики. Операции без выживания животного могут проводиться без жесткого соблюдения правил асептики, но чистыми инструментами и на чистых рабочих поверхностях.
- Для проведения хирургических операций на грызунах не требуется специализированного операционного помещения, однако все хирургические вмешательства должны проводиться вне помещения для содержания животных
- Хирургические операции должны сопровождаться соответствующими ветеринарно-медицинскими процедурами предоперационной подготовки животного и послеоперационного ухода.
- При операции должны соблюдаться основные правила хирургической техники: осторожное обращение с тканями, минимальное их повреждение и рассечение, соответствующее использование инструментов, предотвращение кровопотери, использование соответствующих шовных материалов и правильное наложение швов.



Предоперационная подготовка

- Для проведения операций с выживанием животного все материалы, которые будут соприкасаться с операционным полем (включая шовный материал, бинты, салфетки, вату, имплантируемые материалы), должны быть простерилизованы и согреты.

- Оборудование и материалы, применяемые в операции, но прямо не контактирующие с операционным полем (хирургический столик, стереотаксис и др.) необходимо обработать дезинфектантом.
- Перед проведением полостных операций животных лишают корма на период: как минимум 4 часа – для мыши, 6 часов – для крысы, но не более 24 часов.
- При необходимости животное фиксируют на хирургическом столике, привязав петлевидными узлами за лапы, или приклеив скотчем.
- Для предотвращения высыхания роговицы рекомендуется закапать в глаза глазной гель (офтагель или др.)
- Обработка операционного поля (кожи) выполняется на месте проведения операции перед выполнением разреза. Обработку выполняют тампонами, смоченными дезрастворами (например, хлоргексидином или бетадином), при этом обработку ведут от центра к периферии.
- Если операция будет длиться более 30 мин, рекомендуется обеспечить подогрев животного, т.к. анестезия вызывает гипотермию. Для подогрева можно использовать электрическую или водную грелки, которые кладут под операционный столик.

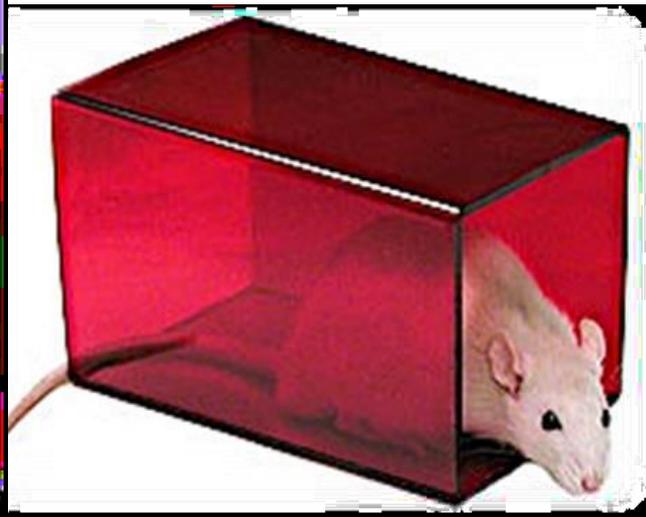


Послеоперационный уход

- Все анестетики угнетают терморегуляцию и способствуют расширению сосудов. Гипотермия приводит к усилению реакции на стресс операции, увеличивает риск заражения, нарушает заживление раны, угнетает ЦНС, препятствует метаболизму препаратов.
- После проведения хирургического вмешательства животное должно быть помещено в теплое чистое место с теплым воздухом до полного выхода из наркоза.
- Во избежание дегидратации, особенно при кровопотерях, после окончания операции рекомендуется ввести внутривенно 1-2мл/100г веса тела теплого (35-37 °С) стерильного изотонического раствора (физ. раствор.)
- Дальнейший послеоперационный уход включает введение анальгетиков в случае необходимости, противомикробных препаратов в случае, если это не повлияет на ход эксперимента, ежедневный мониторинг состояния животных на предмет обнаружения признаков боли и дистресса, особое внимание уделяют состоянию швов.

Послеоперационный уход

- Приглушенный свет, чистая комната, минимальный хэндлинг
- Максимальное обогащение среды
- Питание на уровне пола (в виде геля)
- Социальное размещение ускоряет восстановление.



Необходимость в антибиотиках

- Для предупреждения инфицирования послеоперационной раны и развития воспалительного процесса в послеоперационном периоде рекомендуется применение антибиотиков и других противомикробных препаратов.
- Антибиотики не являются заменой антисептикам.

Антибиотики нужны:

- Иммунодефицит
 - Некоторые полые органы
 - Обширные рассечения тканей
 - Обширная кровопотеря
 - Случайная контаминация
 - Длительная процедура
 - Стресс, старые или больные животные
 - Неопытный хирург
- ↑↑ опыт = ↓↓ антибиотик