ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Институт Регенеративной Медицины

Лекция:

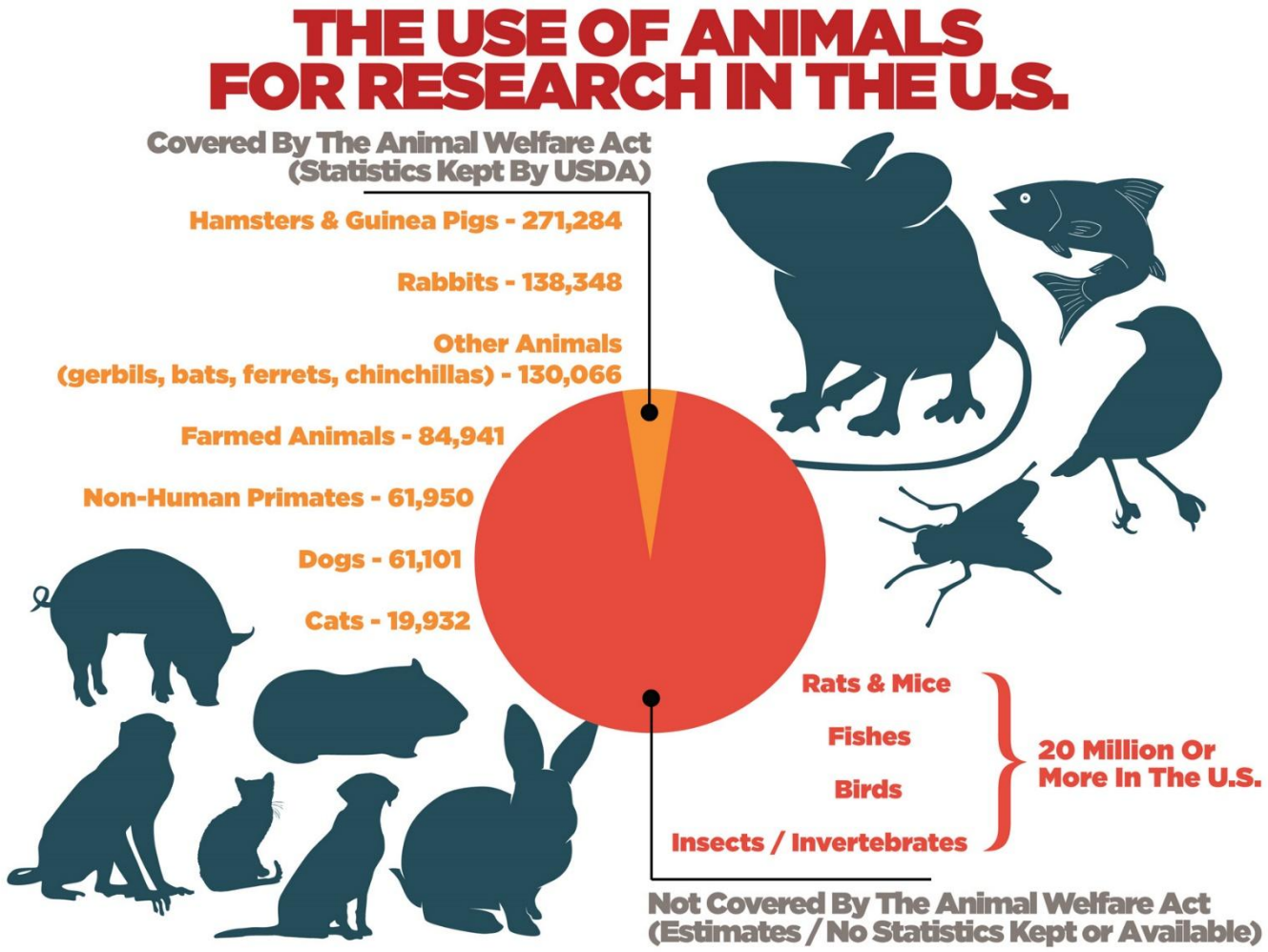
«ОСНОВЫ РАБОТЫ С ЛАБОРАТОРНЫМИ ЖИВОТНЫМИ»

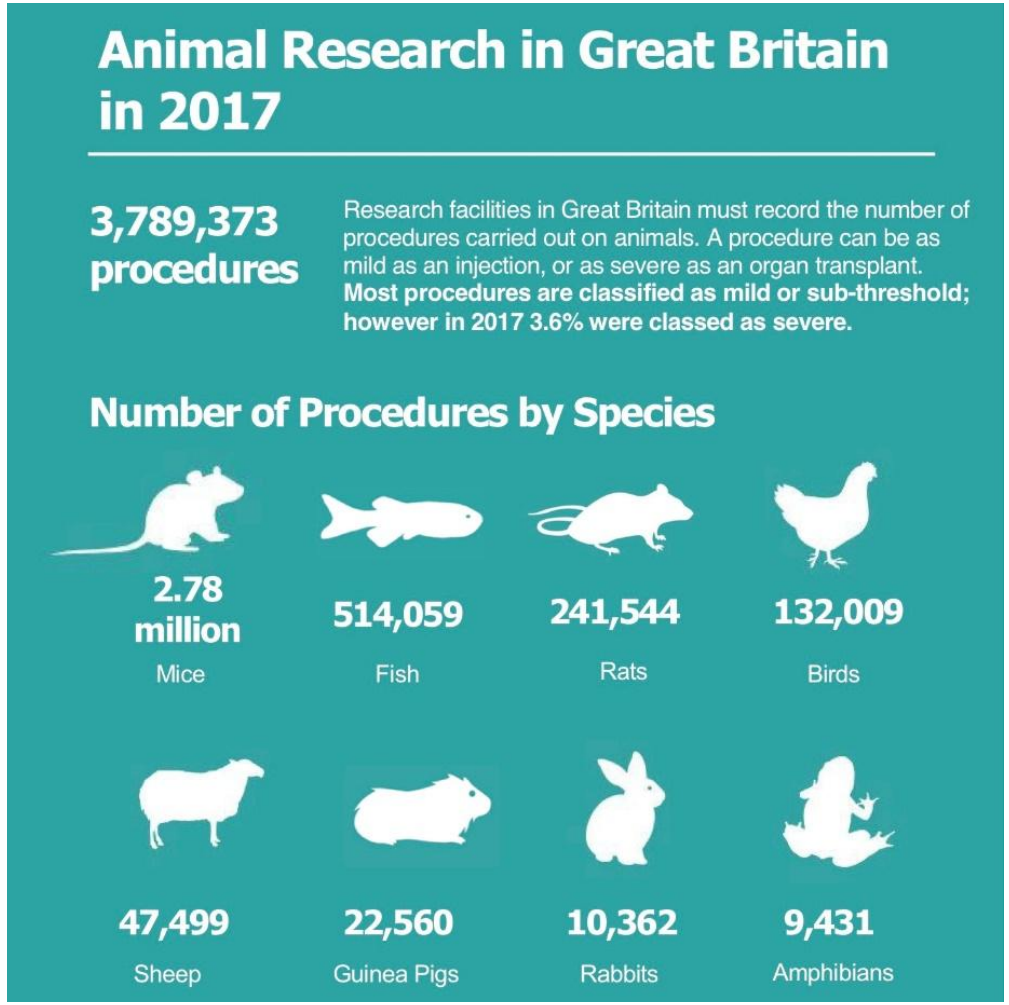
м.н.с. Лаборатории экспериментальной морфологии ИРМ

Алексей Файзуллин

Москва, 20.01.2020

ЭКСПЕРИМЕНТЫ НА ЖИВОТНЫХ





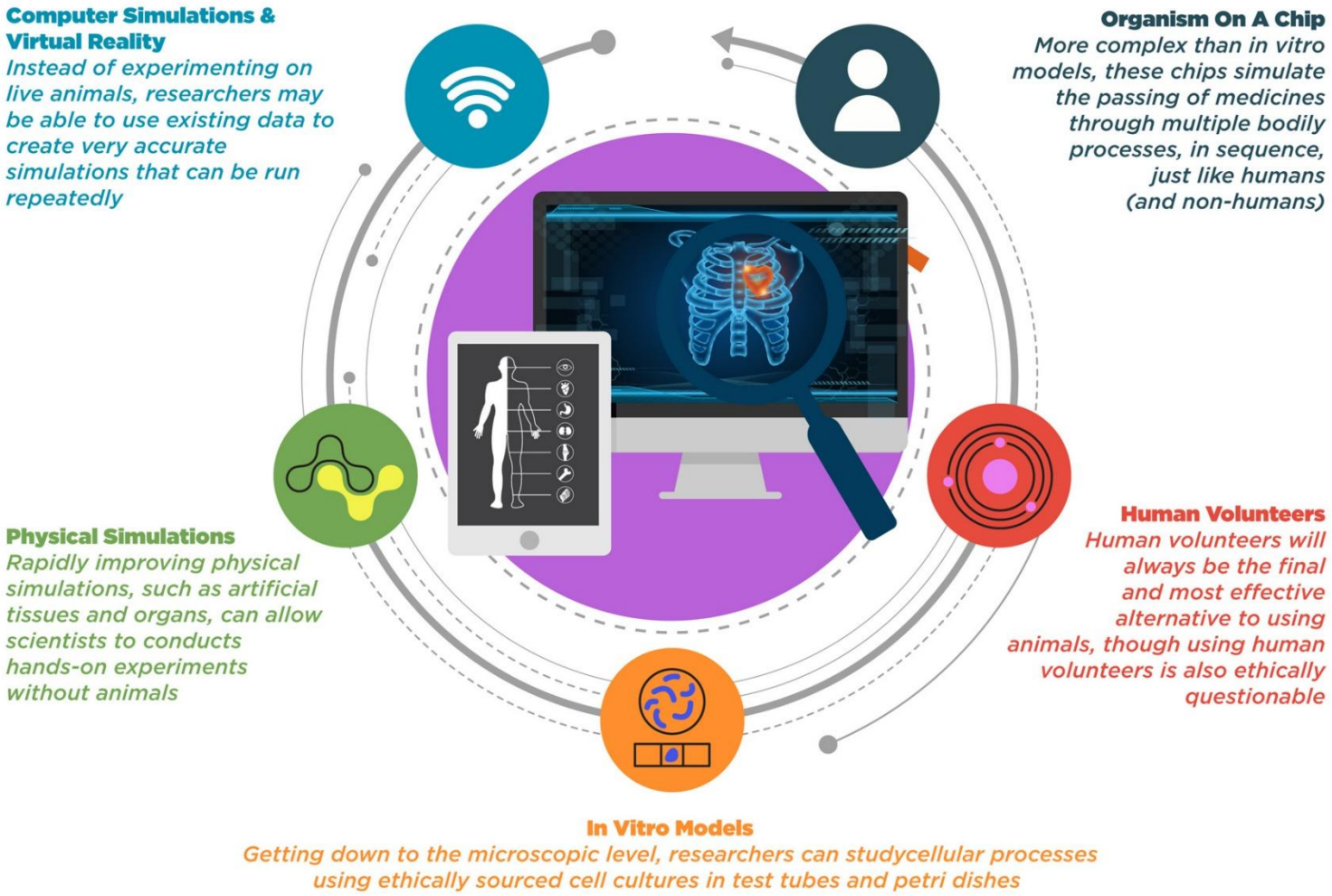
ЭКСПЕРИМЕНТЫ НА ЖИВОТНЫХ

ЗАЧЕМ?

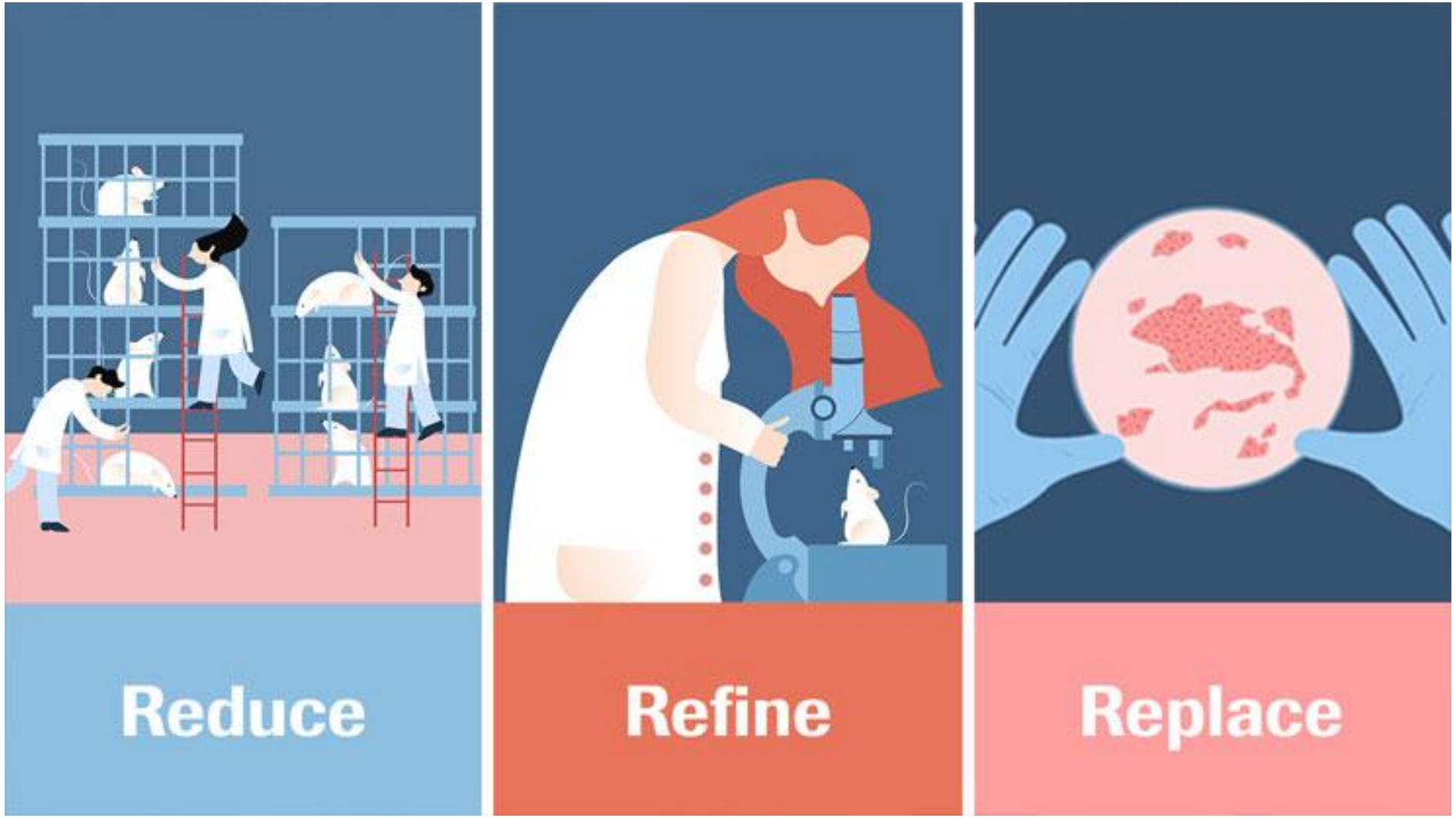
1) Транслируемые в клинику результаты (иногда)

ОГРАНИЧЕНИЯ?

1) Этические вопросы
2) Дорого

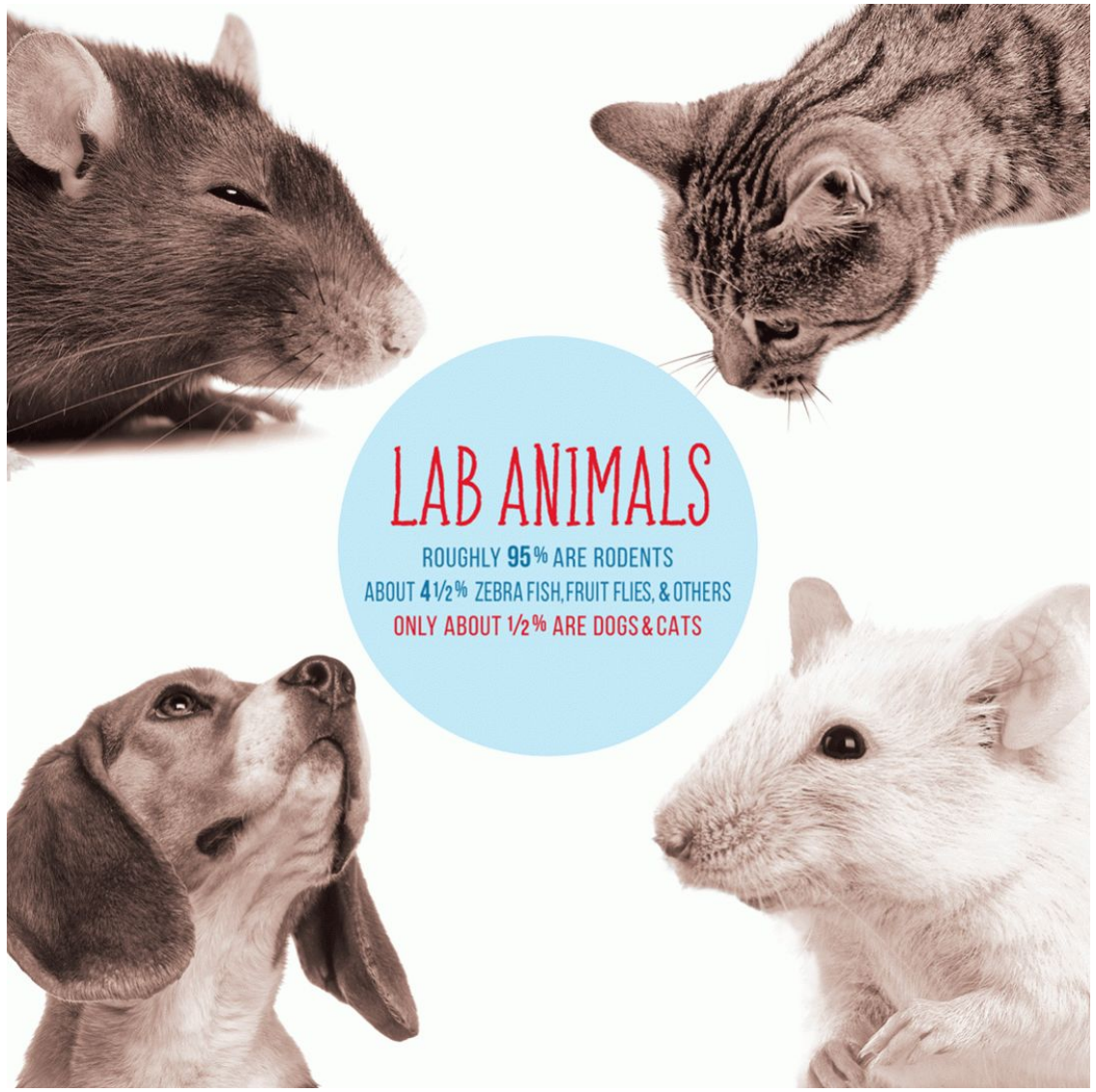


ПРАВИЛО ТРЕХ R



ВЫБОР ЖИВОТНОГО

?



?

ПЛАНИРОВАНИЕ

1) Цель и задачи эксперимента
2) Разработка дизайна эксперимента (методы и модели
3) Определение размеров выборок
4) Разработка протоколов экспериментов
5) Распределение обязанностей
6) Получение разрешения ЛЭК

….

Можно начинать?

ПИЛОТНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ

ЗАЧЕМ?

1) Корректировка и стандартизация протоколов
2) Выявление ошибок в дизайне эксперимента
3) Формирование рабочей команды

<u>Пилотный эксперимент экономит время и, в итоге, минимизирует использование лабораторных животных!</u>

ПОДГОТОВКА К ЭКСПЕРИМЕНТУ

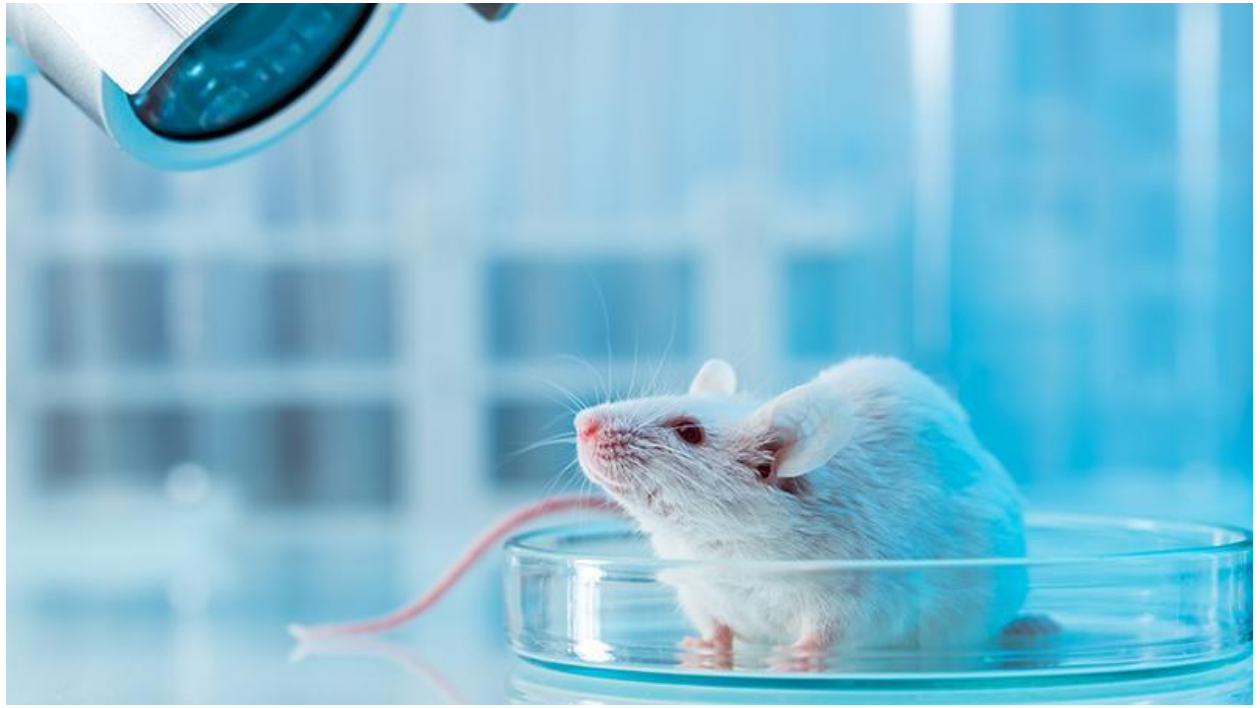
1) Организация необходимых условий для транспортировки и операции на животном (асептика!)
2) Получение и маркировка животных с указанием ФИО, организации и контактов ответственного исследователя
3) Уведомление всех участников эксперимента
4) Согласование с руководством
5) Проверка наличия всех расходных материалов
6) Handling

ПРЕДОПЕРАЦИОННАЯ ПОДГОТОВКА

1) Транспортировка животных
2) Создание асептических условий (пеленки, УФ и др.)
3) Определение веса и общего состояния животного
4) Начало заполнения протокола эксперимента
5) Премедикация (атропин:хлоропирамин=1:1, 0,2 мл/кг)
6) Адекватная анестезия (общая, местная)
7) Антибактериальная терапия (байтрил, аугментин…)
8) Подготовка операционного поля (бритва)

ПРОВЕДЕНИЕ ОПЕРАЦИИ

1) Хирургические манипуляции должны выполняться хирургами или опытными студентами-хирургами
2) Динамическое наблюдение за ЧСС, ЧДД и температурой тела животного
3) Продолжение ведения протокола эксперимента
4) Допустимо начало предоперационной подготовки следующего животного за 30-60 минут до завершения операции
5) Незамедлительное прекращение операции при выявление болезненных ощущений животного
6) Фиксация фото и видеоматериалов



ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫЙ ПЕРИОД

1) При операциях, связанных с потерей крови или тканей рекомендуется ввести подкожно физиологический раствор
2) Динамическое наблюдение за общим состоянием животного (боль, беспокойство)
3) Антибактериальная терапия (например, байтрил, 1мл, 1 раз в сутки в течение 5 дней)
4) Фиксация фото и видеоматериалов
5) В зависимости от вида животного – специальная диета

ВЫВЕДЕНИЕ ИЗ ЭКСПЕРИМЕНТА

ТРЕБОВАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ЭВТАНАЗИИ:

1) Минимизация боли и стресса
2) Скорое наступление смерти
3) Бессознательное состояние
4) Воспроизводимость техники
5) Сохранность забираемых тканей

Химическая

1) Передозировка наркотическим препаратом или сульфатом магния
2) Ингаляционные средства (камера с CO_2)

Физическая

1) Цервикальная дислокация
2) Декапитация

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

Необходимо учитывать особенности операционной комнаты, особенно риски инфицирования животных до операции, во время оперативного вмешательства и в послеоперационном периоде.

1) При риске инфицирования необходима антибактериальная терапия, но в виварии могут обитать устойчивые к антимикробным препаратам возбудители
2) Необходимо правильно подбирать и комбинировать антимикробные препараты (в связи с перекрестной или природной устойчивостью к антимикробным препаратам)
3) Во время операции высокий риск инфицирования места имплантации скаффолдов
4) Необходимо уменьшить инфицирование операционной раны за счет обильного промывания раны антисептиками (водный раствор хлоргексидина), уменьшить контаминацию раны шерстью.
5) В опасных ситуациях до оперативного вмешательства начать прием противомикробных препаратов (чтобы на момент операции ткани животного уже были насыщены).
6) В послеоперационном периоде прием антимикробных препаратов не гарантирует отсутствие инфекционно-воспалительного процесса
7) Необходима правильная антибиотикотерапия (см. выше) + длительность приема не менее 5 дней.

МАРКИРОВКА

Правильная маркировка материала позволяет повысить информативность морфологического исследования и предотвратит возникновение ошибок. Поэтому необходимо ЗАРАНЕЕ ДО ОПЕРАЦИИ спланировать маркировку образцов.

1) Маркировка тканевого образца должна обозначать индивидуальные особенности этого образца: исследуемая группа, номер образца, дата эксперимента, ФИО экспериментатора, и т.п. Их можно указать на флаконе с фиксирующей жидкостью
2) Иногда необходима маркировка частей удаленного тканевого образца из области операции для того, чтобы ЧЕТКО УЗНАТЬ ТОПОГРАФИЮ происходящих при эксперименте процессов. А именно, когда:
   A. Имплантируемый скаффолд имеет сложное строение
   B. Область имплантации имеет сложное строение
3) Общие принципы маркировки для определения топографии процессов в области операции:
   1) Маркировка проводится СТРОГО до помещения образца в формалин
   2) Способы маркировки: шовными нитями разных цветов или с разным количеством стежков, несмываемыми красителями разных цветов (тушь, зеленка, специализированные красители для органов)
   3) Обязательно протоколировать тип маркировки и ее обозначение
   4) Способ маркировки необходимо ЗАРАНЕЕ обсуждать с морфологом и строго его соблюдать
   5) Маркировку должен осуществлять человек, непосредственно участвующий в операции и знающий топографическую анатомию области операции

ЗАБОР МАТЕРИАЛОВ

После выведения животного из эксперимента необходимо:

1) Максимально бережно иссечь область операции, желательно, захватив дополнительно около 0,2-0,5 см интактной ткани с каждой стороны от краев и дна области имплантации. При этом, категорически запрещается делать дополнительные надрезы на ткани, рвать ткань, брать дополнительные «лохмотья» окружающих тканей, если это изначально не оговорено при планировании эксперимента. Толщина образцов не должна превышать 1 см (для полноты фиксации). Остальные 2 размера (длина и ширина) могут быть любыми, но не такими, чтобы образец с трудом помещался в банку с фиксатором и не деформировался и не такими, чтобы объема фиксатора оказалось мало (соотношение объема фиксатора к объему образца 20/1)
2) Правильно промаркировать удаленный фрагмент ткани или банку с фиксатором
3) При необходимости, для предотвращения деформации тонкого плоского образца в ходе фиксации до помещения в фиксирующую жидкость необходимо поместить ткань на картонку или любую другую ровную поверхность и зафиксировать ее края иглами, швами и другими способами (предварительно согласовав с морфологом)

ЭКСПЕРИМЕНТ «МИКРОХИРУРГИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА НЕВРОТИЗАЦИИ МЫШЦЫ»

Модель: Крысы линии Wistar N=24

Группа - 0	Группа - 1	Группа - 2	Группа - 3
Здоровые животные (группа контроля) N=6	Животные с пластикой запирательного аппарата без прямой мышечной невротизации N=6	Животные с пластикой запирательного аппарата с прямой мышечной невротизацией N=6	Животные с пластикой запирательного аппарата с прямой мышечной невротизацией и применением градиента нейротрофинов N=6

Макроскопическая оценка

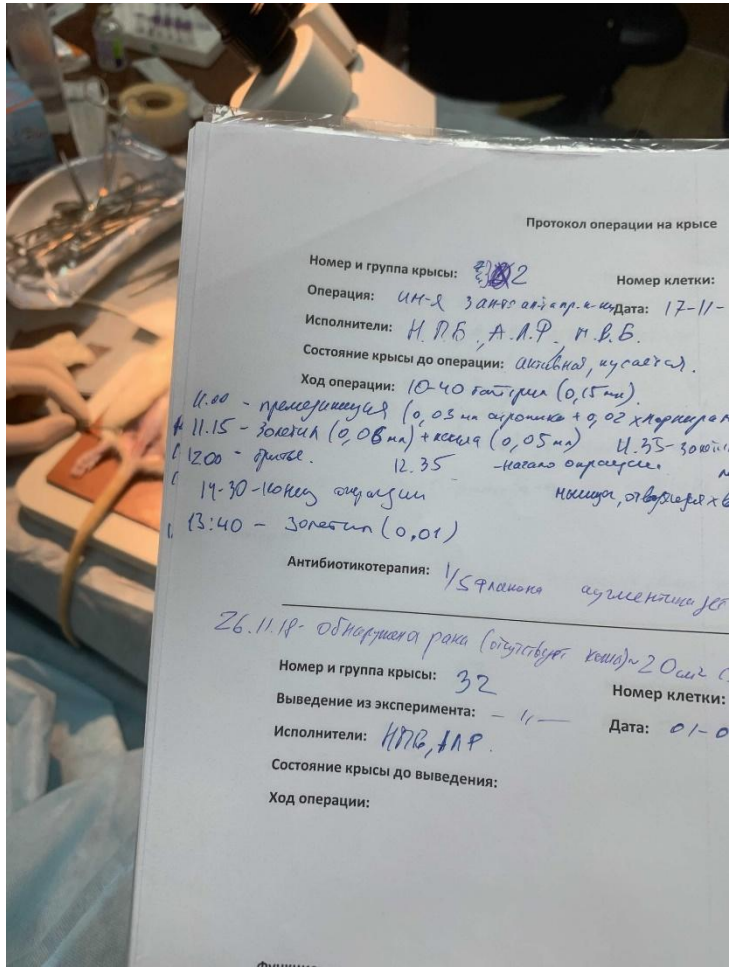
Морфологическое исследование (через 3 месяца)

Качественные	Количественные	Качественные	Количественные
Оценка физиологических отклонений, осложнений	Оценка силы сжатия запирательного аппарата	Характер процессов заживления, степень воспалительных процессов исследование зоны сфинктера	Морфометрическая оценка роста аксонов, образования синапсов

ЭКСПЕРИМЕНТ «МИКРОХИРУРГИЧЕСКАЯ НЕВРОТИЗАЦИИ НЕОАНУСА»

Подготовительный этап:

1) Сформирована рабочая команда
2) Определены необходимые микроскопические и макроскопические методы
3) Определен размер выборки – 6 крыс
4) Разрешение ЛЭК
5) Подготовлена операционная комната
6) Устройство для оценки силы сжатия запирательного аппарата проверено на нормальных крысах
7) Подготовлен протокол



ЭКСПЕРИМЕНТ «МИКРОХИРУРГИЧЕСКАЯ НЕВРОТИЗАЦИИ НЕОАНУСА»

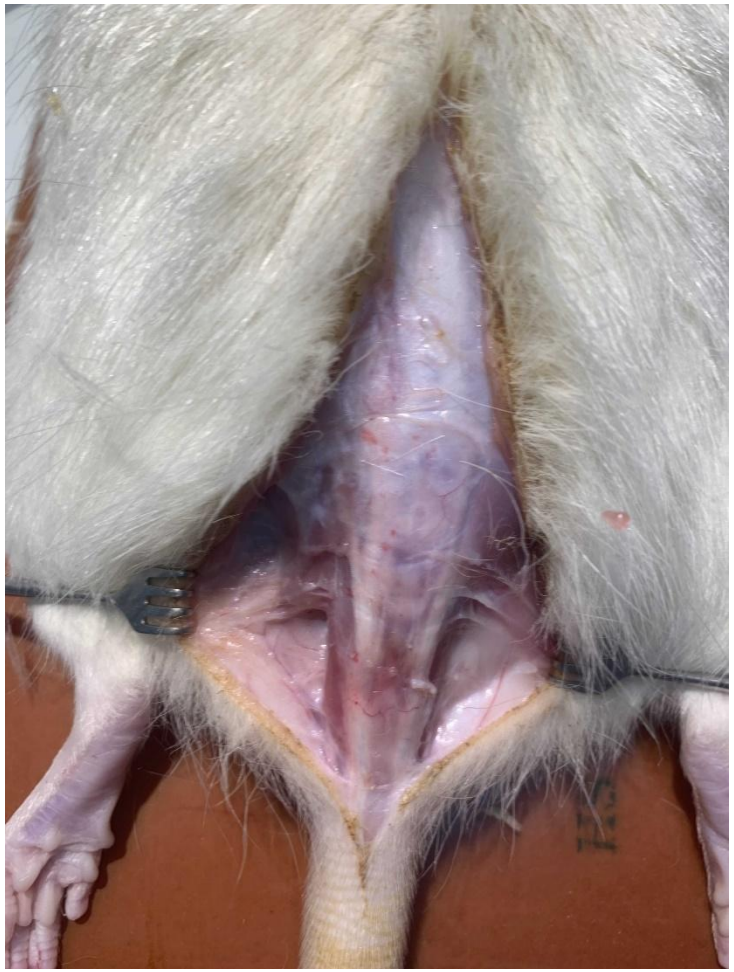
Операция:

1) Крысы оперируются в течение 2-3 часов, поэтому невозможно прооперировать больше 3 за день
2) Прооперированные крысы помещаются в отдельные клетки
3) Премедикация из расчета на 300г крысы – 0,03 атропина + 0,03-0,05 хлоропирамина (30 минут), внутрибрюшинно
4) Наркоз – 0,03 золетила 100 + 0,03 ксилазина, внутрибрюшинно
5) При признаках выхода из наркоза (шевелит носом) – 1/3 первичной доза золетила + ксилазина

Антибиотикотерапия – аугментин детский, разведенный в поилке

Выведение из эксперимента:

1) Наркоз – аналогично
2) Внутрисердечная инъекция раствора сульфата магния (2-5 мл)



ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

Работа с лабораторными животными требует от вас

- **Заботу**
- Знания
- Силы
- Время
- Терпение

Цена халатности зачастую одна – **смерть** подопытного

Помните, что в России есть **уголовное наказание** за жестокое обращение с животными

Спасибо за внимание!