МЕТОДИКА ЗАБОРА КРОВИ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ: ЭТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ, ТЕХНИКА ВЫПОЛНЕНИЯ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ.

[a]Курбанова Нилуфар Батировна
[a]Докторант 1-курса Ферганского государственного университета

[b]Мамасаидов Жамолиддин Тургунбоевич
[b]Доктор медицинских наук, профессор «Central Azian Medikal University» города Ферганы

[d]Мадаминов Фахриддин Ахмадович
[d]Доктор философии по медицинским наукам, доцент. Медицинский институт общественного здравоохранения города Ферганы

Аннотация: *Целью данной работы обобщить современные подходы к забору крови у экспериментальных животных, рассмотреть основные методы венозного, капилярного, артериального и терминального получения крови, а так же показать значение принципов гуманного обращения с животными в лабораторных исследованиях. Особое внимание уделено подготовке животного, выбору места пункции, допустимым объёмам крови, профилактике осложнений и влиянию стресса на достоверность лабораторных данных. Анализ литературы показывает, что методика забора крови должна подбираться индивидуально с учётом вида животного, массы тела, возраста, физиологического состояния, цели исследования, необходимого объёма образца и кратности повторных процедур [2;5]. Соблюдение принципов 3-R является обязательным условием современной экспериментальной биологии и медицины [6]*

Ключевые слова: *экспериментальные животные, забор крови, венепункция, лабораторные животные, микросэмплинг, биоэтика, 3R, стресс, гематология, физиология.*

ВВЕДЕНИЕ

Экспериментальные животные широко используются в биомедицинских исследованиях для изучения физиологических механизмов, патологических процессов, действия лекарственных препаратов, токсического влияния химических веществ и эффективности новых методов лечения. В таких исследованиях кровь является одним из наиболее ценных биологических материалов, поскольку её состав отражает функциональное состояние организма. Анализ крови позволяет определить гематологические показатели, концентрации глюкозы, белков, липидов, электролитов, ферментов, гормонов, цитокинов, антител и других биомаркеров [5].

Забор крови имеет большое значение в исследованиях стресса, эндокринной регуляции и адаптационных реакций. К примеру, по полученной крови можно оценивать уровень глюкокортикоидов, катехоламинов, глюкозы, лактата и маркеров воспаления. Но сама процедура по забору крови может выступать стрессовым фактором. Фиксация животного, боль, непривычное обращение, шум, запахи и длительное ожидание процедуры активируют

гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему и симпатическую нервную систему. В результате изменяются те же показатели, которые исследователь пытается измерить. Поэтому методика забора крови должна быть не только технически правильной, но и максимально стандартизированной.

В современной лабораторной практике большое значение имеет концепция 3R, сформулированная Russell and Burch [6]. Этот метод включает замену животных альтернативными методами, сокращение количества животных в опыте и совершенствование процедур для уменьшение боли, стресса и страдания. Он предполагает выбор наименее травматичного способа, правильную фиксацию, использование обезболивания или анестезии при необходимости, контроль объёма крови и наблюдение за животным после процедуры [2]

С научной точки зрения качество крови как биологического материала зависит от многих факторов: вида животного, возраста, пола, физиологического состояния, питания, времени суток, условий содержания, способа фиксации, места пункции, типа антикоагулянта, скорости обработки и условий хранения образца. Поэтому забор крови нельзя рассматривать как простую техническую манипуляцию. Это важный этап эксперимента, от которого зависит достоверность полученных результатов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В работе использован аналитический обзор научных публикаций из баз данных PubMed, PMC, MDPI, ScienceDirect, Frontiers и других рецензируемых источников, посвященных исследованию гематологии различных видов лабораторных животных. Проведен сравнительный анализ различных методик по забору крови.

ЭТИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ЗАБОРА КРОВИ

Любая процедура, связанная с животными, должна быть предварительно рассмотрена и одобрена этическим комитетом или комиссией по контролю за использованием лабораторных животных. В протоколе исследования необходимо указать вид животных, количество особей, массу тела, возраст, пол, условия содержания, способ фиксации, место забора крови, объём образца, частоту повторных процедур, необходимость анестезии, методы остановки кровотечения и критерии исключения животного из эксперимента [3]

Этическая обоснованность процедуры определяется не только научной целью, но и тем, насколько выбранный метод соответствует состоянию животного. К примеру, у молодых, старых, беременных, больных или обезвоженных животных риск осложнений выше. У таких животных допустимый объём крови должен быть уменьшен, а интервал между процедурами увеличен. Нельзя применять один и тот же стандартный объём для всех животных без учёта массы тела и физиологического состояния.

Важнейшим требованием является подготовка персонала. Забор крови должен выполнять только обученный специалист, владеющий анатомией сосудов, техникой фиксации, правилами асептики и методами оказания помощи при осложнениях. Многократные неудачные попытки пункции недопустимы, так как они усиливают боль, стресс и повреждение тканей. Если специалист не может

быстро и безопасно выполнить процедуры, манипуляцию следует прекратить и привлечь более опытного сотрудника.

ПОДГОТОВКА ЖИВОТНОГО К ЗАБОРУ КРОВИ

Подготовка начинается задолго до самой процедуры. Животные должны пройти период акклиматизации после транспортировки или пересадки в новые условия. Это особенно важно при изучении гормонов стресса, иммунологических показателей и сердечно-сосудистой регуляции. Смена клетки, транспортировка, новые запахи, шум и контакт с незнакомым человеком могут изменять физиологические показатели крови.

Перед процедурой нужно оценить общее состояние лабораторного животного. И обратить внимание на активность, положение тела, качества шерсти, цвет слизистых оболочек, частоту дыхания, наличие обезвоживания, ран, отёков, истощения или признаков заболевания. Масса тела должна быть измерена непосредственно перед расчетом допустимого объёма крови. Это особенно важно для мелких лабораторных животных, у которых даже небольшая ошибка в объёме может иметь серьёзные последствия [3].

Время забора крови следует стандартизировать. Многие показатели, включая кортизол, кортикостерон, глюкозы, мелатонин и некоторые цитокины, имеют циркадную динамику. Если в одной группе кровь берут утром, а в другой вечером, различия могут быть связаны не с экспериментальным фактором, а с суточными колебаниями. Поэтому во всех группах забор крови должен проводиться в одинаковое время суток.

Фиксация должна быть надёжной, но мягкой. Чрезмерное сдавливание грудной клетки нарушает дыхание, а сдавливание брюшной полости может влиять на кровообращение и вызывать выраженный стресс. У мелких грызунов применяют ручную фиксацию, специальные удерживающие устройства или кратковременную анестезию в зависимости от метода. У кроликов важно избегать грубой фиксации позвоночника, так как резкое движение может привести к травме.

ОБЩИЕ ПРАВИЛА АСЕПТИКИ И БЕЗОПАСНОСТИ

Перед забором крови необходимо подготовить все инструменты: стерильные иглы, шприцы, капилляры, пробирки, антикоагулянты, ватные тампоны, антисептик, маркировочные этикетки и журнал регистрации. Инструменты должны соответствовать размеру животного и диаметру сосуда. Слишком толстая игла увеличивает риск травмы, а слишком тонкая может вызывать гемолиз при сильном отрицательном давлении.

Место пункции очищают и обрабатывают антисептиком. У животных с густой шерстью участок может быть выстрижен. После получения крови место пункции прижимают стерильным тампоном до полной остановки кровотечения. При повторных заборах необходимо чередовать стороны или участки пункции, чтобы избежать гематом, воспаления, тромбоза и болезненности [2]

После получения пробы крови необходимо произвести правильную маркировку образцов. Каждая пробирка должна содержать информацию о номере животного, группе, дате, времени забора, виде анализа и типе антикоагулянта.

Ошибка маркировки может привести к полной потере данных исследования. После забора кровь следует немедленно обработать в соответствии с целью анализа: перемешать с антикоагулянтом, центрифугировать, отделить сыворотку или плазму, заморозить или доставить в лабораторию.

ДОПУСТИМЫЙ ОБЪЁМ КРОВИ

Расчёт допустимого объёма крови является одним из ключевых этапов планирование исследования. Общий объём циркулирующей крови у лабораторных животных обычно выражается в миллилитрах на килограмм массы тела. У разных видов он различается, у мышей средний общий объём крови составляет около 58,5 мл/кг, а у крыс около 64 мл/кг [4].

На практике часто используют правило, согласно которому у здорового животного можно однократно получить до 10% общего объёма циркулирующей крови при условии достаточного периода восстановления [3]. Однако при повторных заборах этот объём должен быть значительно меньше. Если кровь берут еженедельно или чаще, необходимо учитывать суммарную кровопотерю за весь период исследования. Слишком частые заборы могут привести к анемии, снижению массы тела, угнетению активности, нарушению терморегуляции и изменению лабораторных показателей.

При расчёте объёма необходимо учитывать не только плазму, но и потерю форменных элементов крови. Восполнение жидкости не устраняет полностью последствия кровопотери, поскольку эритроциты и гемоглобин восстанавливаются медленнее, чем объём плазмы. Поэтому инфузионная поддержка не должна рассматриваться как способ оправдания чрезмерного забора крови.

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ЗАБОРА КРОВИ

ВЕНОЗНЫЙ ЗАБОР КРОВИ

Венозный забор является наиболее распространенным методом. Он применяется для получения крови на гематологические, биохимические, гормональные и иммунологические исследования. У разных видов используются разные вены: хвостовая вена у мышей и крыс, латеральная подкожная вена у грызунов, краевая ушная вена у кроликов, яремная или подкожная вена у собак, краниальная полая вена или ушная вена у свиней [5].

Преимущество венозного метода состоит в возможности повторного забора крови без необходимости терминальной процедуры. Однако венепункция требует точного знания анатомии и правильной фиксации. При нарушении техники возможны гематома, кровотечение, тромбоз, повреждение нерва, боль и воспаление [2].

КАПИЛЛЯРНЫЙ ЗАБОР КРОВИ И МИКРОСЭМПЛИНГ

Капиллярный забор используется для получения небольшого объёма крови. Он подходит для экспресс-анализа глюкозы, лактата, некоторых гормонов и микробиохимических показателей. В современных исследованиях всё большее значение имеет метод микросэмплинг, что значит получение малых объёмов крови с использованием чувствительных аналитических методов.

Микросэмплинг позволяет уменьшить нагрузку на животное и сократить число животных в эксперименте, так как у одной особи можно получать серию проб в динамике. Этот подход соответствует принципу «reduction» (сокращение) поскольку уменьшает потребность в большом количестве животных [6]. С другой стороны этот метод требует точной техники, быстрой обработки и оборудования, способного работать с малыми объёмами.

АРТЕРИАЛЬНЫЙ ЗАБОР КРОВИ

Артериальная кровь используется преимущественно для анализа газового состава, кислотно-щелочного и некоторых параметров гемодинамики. Эта процедура более инвазивна, чем венозная и требует высокой квалификации. Обычна она проводится под анестезией или при катетеризации.

Артериальная пункция связана с повышенным риском кровотечения, боли, спазма сосуда и нарушения кровоснабжения тканей. Поэтому она должна применяться только при наличии строгого научного обоснования [3].

ТЕРМИНАЛЬНЫЙ ЗАБОР КРОВИ

Терминальный забор крови выполняется в конце эксперимента, когда у животного нет необходимости восстанавливаться после процедуры. Он позволяет получить большой объём крови, для комплексных биохимических, иммунологических или токсикологических исследованиях. К таким методам относится пункция сердца или крупных сосудов под глубокой анестезией либо после гуманной эвтаназии.

Терминальный метод нельзя использовать как обычную замену менее инвазивным способом. Он требует этического обоснования и должен выполняться только в условиях, исключающих боль и сознательного страдания животного [1].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Забор крови у исследуемых животных является важным моментом лабораторных исследованиях, от которого зависит не только уровень качества полученных данных, но и состояние здоровья экспериментальных животных. Особенно важно заранее рассчитывать допустимый объём крови, соблюдать правила асептик, правильно фиксировать животное и предупреждать развитие боли, стресса и осложнений.

Таблица 1. Сравнительная таблица методик забора крови у разных видов животных [3].

Вид животного	Основные места забора крови	Ориентировочный допустимый объём	Преимущество	Ограничения
Мышь	Хвостовая вена, подкожная вена, поднижнечелюстная область, терминально-сердце или крупные сосуды	Общий объём крови примерно 58,5 мл/кг. Однократно у здорового животного обычно не более 10% общего	Подходит для микросэмплинга; возможно серийное получение малых проб; широко используется в	Малый объём крови; высокий риск гемолиза; требуется точная фиксация; частые заборы могут быстро

	под глубокой анестезией	объёма крови; при повторных заборах меньше	формакологии и генетике	вызвать анемию
Крыса	Хвостовая вена, латеральная подкожная вена, яремная вена, терминально-сердце или крупные сосуды	Общий объём крови примерно 64мл/кг. Однократно обычно до 10% общего объёма крови у здоровой особи; при серийных исследованиях объём снижают	Более крупные сосуды по сравнению с мышью; возможно получение большого объёма; подходит для динамических исследований	Требуется правильная фиксация; при хвостовой пункции возможно повреждение тканей; повторные заборы требуют строгого контроля объёма
Кролик	Краевая ушная вена, центральная ушная артерия при специальных показаниях, яремная вена, терминально-сердце под глубокой анестезией.	Объём рассчитывают по массе тела и состоянию животного; однократный забор у здорового животного обычно ограничивают примерно 10% общего объёма крови	Ушная вена хорошо доступна; можно получать достаточный объём крови; удобен для гормональных и биохимических исследований	Риск гематомы уха; стресс при грубой фиксаций; артериальный забор более болезненный и требует осторожности
Морская свинка	Подкожные вены, яремная вена, краниальная полая вена только опытным персаналом, терминальные методы под анестезией	Объем строго расчитывают по массе тела; желательно использовать малые объёмы и увеличенные интервалы восстановления	Возможность получения крови для биохимических и иммунологических исследований; подходит для некоторых моделей воспаления и аллергии	Сосуды менее доступны; высокий риск технических ошибок; требуется опытный персонал; стресс сильно влияет на показатели
Собака	Яремная вена, головная подкожная вена предплечья, латеральная подкожная вена голени	Объём рассчитывают индивидуально; благодаря большей массе тела возможно получение большого объёма, но с соблюдением	Хорошо доступные сосуды; техника близка к ветеринарной клинической практике; можно получать качественные образцы	Требуется обученный персонал и правильная фиксация; возможна стрессовая реакция; необходимо учитывать

		общих лимитов безопасности		породу, возраст и состояние здоровья
Свинья	Краниальная полая вена, яремная вена, ушная вена	Объём зависит от массы тела; у крупных животных возможно получение значительного объёма, но в пределах этически утвержденного протокола	Подходит для исследований, близких к клинической физиологии человека; можно получать достаточный объём крови	Сложная фиксация; риск травмы при неправильной технике; некоторые методы требуют седации или анестезии; быстро развивается стресс

Данная таблица (Таблица 1.) показывает, что универсального метода забора крови для всех экспериментальных животных не существует. Метод должен подбираться в зависимости от вида, массы тела, цели, цели исследования и допустимого уровня инвазивности. Diehl et al., подчёркивают, что выбор пути забора крови должен учитывать не только техническую возможность получения образца, но и риск боли, стресса, повреждения тканей и нарушения физиологических показателей [2].

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. AVMA Panel on Euthanasia. *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition*. American Veterinary Medical Association, 2020.

2. Diehl, Karl-Heinz, et al. “A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes.” *Journal of Applied Toxicology*, vol. 21, no. 1, 2001, pp. 15–23. DOI: 10.1002/jat.727.

3. National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. “Blood Sampling: General Principles.” *NC3Rs*, 10 Nov. 2013, nc3rs.org.uk/3rs-resource-library/blood-sampling/blood-sampling-general-principles.

4. National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. “Blood Sampling: Rat.” *NC3Rs*, 2022.

5. Parasuraman, S., R. Raveendran, and R. Kesavan. “Blood Sample Collection in Small Laboratory Animals.” *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, vol. 1, no. 2, 2010, pp. 87–93. DOI: 10.4103/0976-500X.72350.;

6. Russell, W. M. S., and R. L. Burch. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, 1959.