

Лабораторийн амьтдаас цус авах аргачлал, цусны хэмжээ (тойм өгүүлэл)

Т.Даваасамбуу¹, Б.Бадамцэцэг¹, Л.Лхагва¹, Л.Хүрэлбаатар

¹Эм судлалын хүрээлэн

davaasambuu@monos.mn

Blood Collection Techniques and Limits

Davaasambuu T¹., Badamtsetseg B¹., Lkhagva L¹., Khurelbaatar L¹.

¹Drug research institute

davaasambuu@monos.mn

Purpose: The document outlines the preferred methods for collecting blood from laboratory animals and blood collection volume and frequency limits. Blood collection for experimental purposes must comply with researchers of the Drug research institute (DRI) approved protocol, including approved collection techniques, volumes, and frequencies. The Department of Pharmacology researchers train investigators in various collection techniques. The researcher may collect blood for veterinary care purposes using accepted clinical techniques ensuring volumes collected do not adversely affect animal health.

Blood Collection Limits: The DRI limits one time survival blood collection to 7.5% of an animal's blood volume in most circumstances. Serial blood sampling limit vary by species, strain and frequency of blood collection. The DRI may require monitoring for anemia (using assays such as hematocrit and/or serum protein levels) when repeated collection of larger volumes are required. Blood collected for diagnostics or other veterinary procedures must be considered when evaluating total volume available for experimental use. In all cases blood collection volumes should be limited to the minimum volume that will allow for successful experimentation or diagnostics.

Удиртгал: Шинжлэх ухааны судалгаа шинжилгээнд туршилтын амьтдаас цус авах хэд хэдэн чухал арга байдаг. Энэхүү цус авах аргуудыг мэдэж байх нь туршилтын амьтдыг стрессд оруулахгүй байх, мөн туршилт судалгааны үр дүнд нөлөөлөх эрсдэлийг багасгах ач холбогдолтой. Үүнээс гадна тухайн судлаач туршилтын амьтдаас цус авах арга техник сайтар эзэмшиж, цус авах үед туршилтын хулганыг стрессгүй байлгах, эрүүл мэндэд сөрөг нөлөө үзүүлэхгүйгээр цус авахад тухайн аргын мөн чанар оршино [1]. Туршилтын амьтдаас их хэмжээний цус авах нь цусны даралт ихсэх, өвдөлтийн шок цаашлаад үхэлд хүргэх аюултай байдаг [2]. Дэлхийн

зарим улс орнуудын судлаачид лабораторийн амьтдаас цус авах арга аргачлал боловсруулж, нэг удаа авч болох цусны хэмжээг тодорхойлсон байна. Калифорниагийн их сургуулийн судлаачдын тодорхойлсноор "Лабораторийн амьтдын сүүлний хажуугийн вен (Tail vein) болон нүд (Orbital sinus)-ний венийн судаснаас цус авах нь хамгийн тохиромжтой юм. Бага хэмжээний цусыг сарвууны венийн судас (Dorsal pedal vein), хэвлийн хөндий, зүрх (Cardiac puncture)-нээс авч болно гэсэн байна. Мөн туршилтын амьтдаас авч болох нэг удаагийн цусны хэмжээг нийт цусны 7.5% гэж тогтоосон бөгөөд лабораторийн амьтад нь алдагдсан цусаа 7 хоногийн дотор нөхөн авах чадвартай" хэмээн үзжээ [3]. Мичиганы их сургуулийн эрдэмтэд "Лабораторийн амьтдын асаргаа сувилгаа болон тэдгээрийг туршилтанд хэрэглэх нь" гэсэн гарын авлага боловсруулжээ. Энэхүү гарын авлагад лабораторийн амьтдаас цус авахдаа мал эмнэлгийн ариутгал, халдваргүйтгэлийг сайтар ханган, хагас нойрсуулалтыг хийсэн байна гэж заажээ. Нэг удаагийн авч болох цусны хэмжээг биеийн жингийн 6-8% гэж тогтоосон байна. Энэ нь амьтдын эрүүл мэндэд сөрөг нөлөөгүй, алдагдсан цусаа 7 хоногийн дотор нөхөх боломжтой хэмээн үзсэн байна [3,4,5].

Түүнчлэн, Германы эрдэмтэн Карл-Хенз Дейл нь "J Appl Toxicol" олон улсын сэтгүүлд өгсөн "Цус авах удирдамж" [6] бүтээлдээ лабораторийн амьтдаас нэг удаа авах цусны хэмжээг 7.5-8% гэж тогтоогоод энэ нь долоо хоногийн хугацаанд нөхөн төлжиж, энэ хэмжээ нь тухайн амьтны эрүүл мэндэд ямар нэгэн сөрөг нөлөө үзүүлэхгүй гэж заасан байна [7]. Мөн цус авах арга аргачлалыг дурджээ .

Монос Группийн дэргэдэх Эм судлалын хүрээлэнгийн судлаачид нь кетаминаар (1 мл/кг) хэсэг газрын нойрсуулалтыг гүйцэтгэж, лабораторийн амьтдын сүүлний вен (Tail vein), гүрээний венийн судас (Jugular Vein) –наас цус авч, нэг удаагийн авч болох цусны хэмжээг биеийн жингийн 7.5% хэмээн тогтоосон. Энэ нь бусад орны судлаачдын цус авах арга аргачлалтай нийцэж байна.

Цус авах арга аргачлал: Лабораторийн амьтдаас цус авахдаа ариун нөхцөлд, нэг удаагийн зүү, нэг удаагийн вакуум хуруу шил (*IMPROVACUTER, Gel and Clot Activator*) ашиглана. Цус авах явцад лабораторийн амьтад нь хагас нойрсолтын байдалд байна. Лабораторийн амьтдыг нойрсуулахдаа төрөл бүрийн унтуулах бодисуудыг ашигладаг [8,9,10,11]. Нойрсуулах бодис болон тарих тунгийн хэмжээг Хүснэгт 1-ээс харна уу.

Хүснэгт 1. Тайвшруулах болон унтуулах бодисууд

Нэршил	Тун(mg/kg)	Тарих хэсэг
Кетамин	50-100	Булчин, хэвлийн хөндий
Зайлазин	1-5	Булчин, хэвлийн хөндий
Медетомедин	0.1-0.5	Арьсан дор, хэвлийн хөндий
Атропин	0.05	Арьсан дор, хэвлийн хөндий
Диазепам	2.5-5.0	Булчин, хэвлийн хөндий
Мидозалам	5	Хэвлийн хөндий
Фенобарбитал	40-50	Хэвлийн хөндий, судсаар

Туршилтын амьтдыг тайвшруулж, унтуулсны дараа Хүснэгт 2-т заасны дагуу судалгаанд ашиглах цусны дээжийг авна [1,3,4,5,6,7,10,13,14,15].

Хүснэгт 2. Цус авах байрлал

Амьтны төрөл	Байрлал
1 Цагаан хулгана	Сүүлний вен ба артери, дунд чөмөгний хажуугийн вен, нүүрний хажуугийн вен, нүдний ухархай вен
2 Харх	Сүүлний вен ба артери, дунд чөмөгний хажуугийн вен, нүүрний хажуугийн вен, нүдний ухархай вен, гүрээний вен судас
3 Туулай	Чихний дээд вен (бага хэмжээний цус), чихний артери (их хэмжээний цус)
4 Усан гахай	Чихний вен, дунд чөмөгний дээд вен, дээд хөндийн вен

Туршилт судалгаанд ихэвчлэн туршилтын хархны сүүлний хажуугийн вен (lateral tail vein), цагаан хулганы гүрээний судас (jugular vein), туулайн чихний венийн судас (marginal vein)-наас тус тус цус авах нь илүү тохиромжтой байдаг. Туршилт судалгааны явцад “Амьтанд туршилт хийх био-анагаахын ёс зүйн удирдамж”-ийн дагуу ёс зүйн хэм хэмжээг (1-4 зүйлүүд) [12] баримтлан ажиллавал зохино.

Туршилтын амьтдаас нэг удаа авах цусны хэмжээ

Эмнэл зүйн өмнөх судалгааны туршилтын явцад нэг удаа авах цусны хэмжээ нь лабораторийн амьтдын эрүүл мэнд, цаашлаад туршилт судалгааны үр дүнд нөлөөлж болно. Тийм учраас туршилтын амьтдын цусны нийт хэмжээ болон нэг удаа авах цусны хэмжээ чухал юм. Нэг удаа авч болох цусны дээд хэмжээг тухайн туршилтын амьтны нийт цусны эзэлхүүнээс 7.5%, 10%, 15% гэсэн 3 төрлийн

хувиар тооцно [2,14,16,17]. Нэг удаа авч болох цусны хэмжээ, нийт цусны ногдох хувийг тодорхойлсныг хүснэгт 3-аас харна уу.

Хүснэгт 3. Туршилтын амьтдаас нэг удаа авч болох цусны хэмжээ

№	Амьтны төрөл	Цусны хэмжээ (ml/kg)	Цусны дээд доод хязгаар (ml/kg)	Цусны хэмжээ (дундаж)		
				7.5%	10%	15%
1	Цагаан хулгана (дундаж биеийн жин-20 гр)	46.88	44-64	88 µl	116.8 µl	176 µl
2	Харх (200 гр)	51.2	46.4-56	0.96	1.28	1.92
3	Туулай (2 кг)	28	22-35	8.5	11	17

Туршилтын амьтдын нийт цусны 7.5%-ийг авч эмнэл зүйн өмнөх туршилтанд хэрэглэх нь илүү тохирмжтой юм. Энэ нь туршилтын амьтдад цус багадах (анемия) эмгэг үүсэхээс сэргийлэх ач холбогдолтой. Цус авсанаас хойш туршилтын амьтдын нийт цусны эргэн нөхөн төлжиж, хэвийн түвшинд хүрэх хугацааг 1-3 долоо хоногийн давтамжтайгаар үнэлнэ [18,19,20,21,22]. Давтамжийг Хүснэгт 4-ээс харна уу.

Хүснэгт 4. Цус эргэн нөхөн төлжих хугацаа

Нэг удаа		Олон давталттай	
Туршилтын амьтдаас авсан цусны хэмжээ %	Эргэн төлжих хугацаа	Туршилтын амьтдаас авсан цусны хэмжээ %	Эргэн төлжих хугацаа
7.5%	1 долоо хоног	7.5%	1 долоо хоног
10%	2 долоо хоног	10%	2 долоо хоног
15%	4 долоо хоног	15%	3 долоо хоног

Туршилтын амьтдын цуснаас 7.5%-ийг нэг удаагийн шинжилгээнд авсан тохиолдолд цус эргэн нөхөн төлжих хугацаа нь 1 долоо хоног, 10%-ийг авсан тохиолдолд цус эргэн нөхөн төлжих хугацаа нь 2 долоо хоног, 15%-ийг авсан тохиолдолд цус эргэн нөхөн төлжих хугацаа нь 3 долоо хоног гэж тодорхойлсон байна [2,3,12,17,18,19,20,21,22].

Дүгнэлт: Лабораторийн амьтдаас цус авах арга аргачлал, нэг удаа авч болох цусны дээд хэмжээг тодорхойлсоноор эмнэл зүйн өмнөх судалгааны явцад гарч болох төрөл бүрийн эрсдлээс сэргийлэх чухал ач холбогдолтой. Туршилтанд ашиглагдаж байгаа амьтдын эрүүл мэндэд сөрөг нөлөөгүй, цусан хангамжийн дутагдалд оруулахааргүй цусыг батлагдсан арга аргачлалаар авах нь эмнэл зүйн өмнөх судалгааны үр дүн үнэн зөв, статистик магадлалтай гарах зүй тогтолтой байдаг. Иймээс дараах байдлаар дүгнэж байна. Үүнд:

1. Туршилтын амьтдаас цус авахдаа хагас нойрсуулалтын замаар унтуулах нь амьтанд үүсэх өвдөлт, таталт, анафилаксийн шоконд орохоос сэргийлнэ.
2. Туршилтын амьтдаас хэдий хэмжээний цус авахаас шалтгаалан цус авах газрыг сонгон нэг удаагийн вакутайнер* ашиглан, нэг удаагийн хатгалтаар цусыг авна. Их хэмжээний цус авах шаардлагатай бол сүүлний хажуугийн венийн судас (vein tail lateral) болон гүрээний судас (jugular vein)-д хатгалтыг гүйцэтгэнэ. Бага хэмжээний цус авах шаардлагатай бол зүрхний хөндий (Cardiac puncture), нүдний доод венийн судаснаас авч болно.
3. Нэг удаагийн авч болох цусны дээд хэмжээг 3 төрлөөр авч болох боловч хамгийн тохиромжтой нь нийт цусны 7.5% гэж тогтоосон. Тухайн амьтнаас цусыг авсаны дараа нийт цусны хэмжээ хэвийн түвшин хүртэл нөхөн төлжих хугацаа 7 хоног байна. Тухайн туршилтын амьтдаас цус авсанаас хойш 7 хоногийн давтамжтайгаар дахин цус авч болно. Энэ нь тухайн амьтны эрүүл мэндэд ямар нэгэн сөрөг нөлөөгүй юм.

Ном зүй:

1. Janet Hoff et al, Methods of Blood Collection in the Mouse, Lab Animal, Volume 29, №10, 2000, p.47-53.
2. John D.Dingell., Blood collection: Maximum Volumes and Fluid Replacement, Institutional Animal Care and Use Committee Standard Operating Procedure, 2007, p.1-3.
3. Animal Care and Use Committee-Animal Care and Use Program, University of California, Berkeley, 2016.

* Нэг удаагийн вакуум хуруу шил (IMPROVACUTER, Gel and Clot Activator)

4. Van herck H., et al. Orbital sinus blood sampling in cats as performed by different animal technician: The influence of technique and expertise. *Laboratory animals*; 1998.p.377-386.
5. Popesko P., Rajtova V and Horak J.A. *Color Atlas of the Anatomy of Small Laboratory Animals, Volume 2, Rat Mouse, Golden Hamster*. Publishing Ltd, London, England, 1992.
6. Karl-Heinz Diehl., Robin Hull., David Morton, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol* 21, 2001, p.15-23.
7. Hawk C.T., Leary S.L. *Formulary for laboratory animals*. University Press, Second edition, 1999.
8. Harkness JE, Wagner JE. *The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents*. Baltimore, Maryland: Williams and Williams, 1995.
9. Hillyer EV, Quesenberry KE, eds. *Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*. New York, New York: WB Saunders, 1997.
10. Merideth A, Redrobe S, eds. *BSAVA Manual of Exotic Pets*. Gloucester, England: British Small Animal Veterinary Association, 2002.
11. Poole T, et al. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 7th ed. Malden, Massachusetts: Blackwell Science, Ltd., 1999; 313-330.
12. Бурмаажав Б. Анагаах ухааны ёс зүй-Амьтанд туршилт хийх биоанагаахын судалгааны ёс зүйн удирдамж, Судлаачийн гарын авлага, УБ, 2007, х.75-78.
13. Waynforth HB, Flecknell PA. *Experimental and Surgical Technique in the Rat*. 2nd ed. London: Academic Press, 1992.
14. Diehl K.H, et al, A good Practice Guide to the Administration of Substance and Removal of Blood, including Routes and Volumes. *Journal of Applied Toxicology*, 2001, p.15-23.
15. Fox J.G., Anderson L.C., Quimby F.W., *Laboratory Animal Medicine*, 2nd edition, New York City, Academic Press, 2002.
16. BVA/FRAME/RSPCCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. Removal of blood from laboratory mammals and birds (first report). *Laboratory Animals*; 1993, 27:p.1-22.
17. Lee HB, Blafox MD. Blood volume in the rat. *J Nucl Med*. 26(1):1985, p.72-76.

18. Abatan OI, Welch KB and Nemzek JA. Evaluation of Saphenous Venipuncture and Modified Tail-Clip Blood Collection in Mice. J Am Assoc Lab Anim 47(3):2008,p.8.
19. Administration of Substances: LASA Good Practice Guidelines, Series1/issue 1998, 1-October.
20. Bernardi, Moneta, Brughera, et al. Haematology and Clinical Chemistry in Rats: Comparison of Different Blood Collection Sites. Comp Haematol Int 6:1996, p.160-166.
21. Car BD, Eng VM, Everds NE and Bounous DI. Clinical Pathology of the Rat In: The Laboratory Rat, 2nd Edition. Suckow MA, Weisbroth SH, and Franklin CL (eds.). Elsevier Academic Press, Burlington, MA: 2006,p.132.
22. Koch M. Experimental Modeling and Research Methodology In: The Laboratory Rat, 2nd Edition. Suckow MA, Weisbroth SH and Franklin CL (eds.), Elsevier Academic Press. Burlington, MA: 2006, p. 593-594.

*Танилцаж нийтлэх санал өгсөн:
ЭЗУ-ы доктор Т. Ахтолхын*