

LABORATUVAR HAYVANLARINDA TEMEL UYGULAMALAR: LABORATUVAR HAYVANLARINDAN KAN ALMA TEKNİKLERİ

BASIC APPLICATIONS IN LABORATORY ANIMALS: BLOOD COLLECTION TECHNIQUES IN EXPERIMENTAL ANIMALS

Mutlu Küçük, Aydın Çevik, Rivaze Kalaycı

İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü,
Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı

Sorumlu Yazar : Yard. Doç. Dr. Mutlu Küçük

Yazışma adresi : İstanbul Üniversitesi

Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü,

(Aziz Sancar DETAE), Vakıf Gureba Cad.

Çapa, Fatih 34390, İstanbul/Türkiye

Tel : 0212 4142000 / 33372

Fax : 0212 5324171

E-mail adres : m.kucuk@istanbul.edu.tr

Küçük laboratuvar hayvanlarından kan alma işlemi, araştırmacıların deneysel çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Kan alma teknikleri çok sayıdadır ve çeşitli düzenleyici kurumlar ve kılavuzlarla belirlenmiştir. Laboratuvar hayvanlarından alınan kan örneğinin en az stresle alınması önemlidir, çünkü stres çalışmanın sonucunu etkiler. Bu nedenle kan alma tekniğini uygulayan araştırmacının, yeterli eğitiminin olması gereklidir. Bu eğitim, bizim ülkemizde 80 saatlik sertifikasyon

programlarıyla sağlanmaktadır (8). Araştırmacı, küçük laboratuvar hayvanlarında uygulayacağı kan alma tekniğini, hayvan etik kurulları tarafından onaylanmak şartıyla kullanabilir.

Kan alma teknikleri ve alınabilecek kan miktarı, hayvanın türüne göre değişir. Laboratuvar hayvanlarından çeşitli amaçlar için, değişik miktarlarda ve farklı bölgelerden kan alınmaktadır (9, 10) (Tablo 1).

Tablo 1: Laboratuvar Hayvanlarında Yaygın Olarak Kullanılan Kan Alma Yerleri

Tür	Uygun Kan Alma Bölgesi	Uygun Kan Hacmi (tek seferde)	Maksimum Kan Hacmi (terminalde)
Fare	Kalp, orbital sinüs, kuyruk veni, lateral safenöz ven, juguler ven	0.2-0.3 ml	1 ml
Sıçan	Kalp, orbital sinüs, kuyruk veni, lateral safenöz ven, kuyruk arteri	2-3 ml	10-15 ml
Tavşan	Kalp, marjinal kulak veni	20-40 ml	60-200 ml
Kobay	Kalp, safenöz ven, kulak veni, juguler ven, orbital sinüs	4-8 ml	1-25 ml

Arterlerden ve venlerden kan alınabildiği gibi orbital sinüsten ve kardiyak ponksiyon yoluyla da kan alınabilir. Kan almada kullanılacak yerin seçimi; kan alma amacına (arter kanı, ven kanı veya ikisinin karışımı), kan alma süresine, sıklığına ve deneyin devam edip etmeyeceğine bağlı olarak değişir. Ayrıca bakılacak parametreye bağlı olarak da kan alma yeri tayin edilmelidir. Genellikle merkezi bir bölgeden (örneğin kalpten) alınan kandaki lökosit, eritrosit ve trombosit sayısı, periferden (örneğin kuyruktan) alınan kanla kıyaslandığında daha düşük sayıdadır. Bu farklılıklar periferik kapiller staz ve direnç, kan alma tekniğiyle indüklenen stres cevabı veya konağın çeşitli yerlerindeki immünolojik yanıtlardan kaynaklanabilir. Sıcaklığın etkisini de bertaraf etmek için, özellikle farenin kuyruğundan kan almadan

önce mutlaka farelerin homojen bir şekilde ısınmasına izin verilmelidir (5). Bazı bölgelerden kan alımında ağrı meydana geldiği için anestezi altında yapılmalıdır. Bu yüzden, deneyin planlanması aşamasında kan alma yöntemi de ayrıntılarıyla belirlenmelidir. Ayrıca, bilinci yerinde küçük laboratuvar hayvanlarından kan alınması sırasında oluşacak stresten dolayı bazı biyokimyasal parametrelerin değişebileceği dikkate alınmalıdır. Laboratuvar hayvanının kanının tümü alınacaksa, bu prosedür genel anestezi altında gerçekleştirilmeli ve kan alındıktan sonra hayvanın ölüp ölmediği kontrol edilmelidir.

Her tür, vücut ağırlığına göre farklı hacimde kan ihtiva etmektedir (Tablo 2). Erişkin hayvanlarda tahmini kan hacmi 55-70 ml/kg vücut ağırlığıdır (7).

Tablo 2: Laboratuvar Hayvanlarının Total Kan Hacimleri

	Fare	Sıçan	Tavşan	Kobay
Total kan (ml/kg)	70-80	50-65	57-65	65-90

Sağlıklı, erişkin laboratuvar hayvanlarından sıvıları değiştirmeden, öldürmeden kan alımı tek seferde toplam dolaşımdaki kan hacminin % 10'u ile sınırlıdır ve bu durumda kan alımı 3-4 hafta sonra tekrar edilebilir. Yaşlı ve obez hayvanlarda bu prosedür daha dikkatli bir şekilde gerçekleştirilmelidir. Dolaşımdaki kan hacminin % 30'undan daha fazla kan alındığı takdirde, hayvanın ciddi bir hipovolemiye gireceği unutulmamalıdır, bu durumda sıvı replasmanı gerekebilir. Aralıklarla kan örneklerinin tekrar alınması halinde, hayvanların toplam kan hacminin maksimum 0,6 ml/kg/gün veya % 1,0'i her 24 saatte bir, % 7,5'i her 7 günde bir, % 10'u her 2-4 haftada bir alınabilir (7). Tekrarlanan kan örneği alma işleminde, laboratuvar hayvanlarında ağrı ve stresin azaltılması için geçici bir kanül kullanılabilir.

Kan alımından sonra bölgeye direkt olarak veya gazlı bir bez ile bastırılarak kanamanın durdurulması sağlanmalıdır. Kan alma yeri neresi olursa olsun, kanama tam olarak durdurulmadan hayvan kafese konulmamalıdır.



Resim 1: Kalpten kan alma

Kuyruktan kan almadan önce, kuyruk anatomisinin iyice bilinmesi gerekir. Kuyruқта ikisi lateral ve biri dorsal olmak üzere üç adet ven, bir adette ventral arter vardır. Kan alma işlemine kuyruğun uç kısmından başlanmalıdır.

FARE

Kalpten Kan Alımı: Bu teknik genellikle deneyin sonlandırılması ve fazla miktarda kan alınması gerektiği durumlarda kullanılır. Fare anestezisi ile uyutulduktan sonra sırt üstü pozisyonda yatırılır, insülin enjektörü kullanılarak ksifosterna orta hattın biraz solundan kalp atımları hissedilerek 20-30 derecelik açı ile kalbe girilir (Resim 1, 2). Kalpte olup olmadığını anlamak için enjektörün pistonu yavaşça geri çekilir. Kalbin kollabe olmasını önlemek için yavaş olunmalıdır. Tekrarlayan kan alımları için bu yöntem kullanılamaz. Farenin büyüklüğüne ve kalp atımına bağlı olarak 0,1-1 ml kan elde edilebilir (6).



Resim 2: Kalpten kan alma

Kuyruktan Kan Alma: Uzun süreli ve tekrarlı kan alımları için tercih edilen bir yöntemdir. Fare uyutulur ve özel hareket kısıtlayıcısına konulur. Kan kuyruk veninden ya da arterden alınacaksa damarın görünür hale getirilmesi gerekir. Lateral kuyruk veninden 25-30 no'lu iğne ile enjektöre

yavaşça çekilerek 0.5 ml kan alınabilir (Resim 3). Daha fazla kan almak için kuyruk veninin üzerine küçük bir kesi yapılır ve kan doğrudan tüp içine akıtılır. Bu yöntem ile 1 ml kan alımı mümkündür (9). (Resim 4). Kanama, daha sonra kesi üzerine baskı uygulanarak durdurulur.



Resim 3: Kuyruktan kan alma



Resim 4: Kuyruktan kan alma

Lateral Safen Venden Kan Alma: Az miktarda kan örneği gerektiği durumlarda bu yöntem kullanılır. Fareyi tespit etmek için 50 ml falkon tüpü kullanılır. Tüpün konik kısmı, farenin rahat nefes alıp vermesi için delinir. Fare tüp içine konulur ve arka bacak gerilir, kuyruk ve kalça arasındaki deri kıvrımı tutularak sabitleştirilir (Resim 5a). Lateral safen veninin bulunduğu alandaki tüyler temizlenir. Bu alan alkolle silinir, venöz dolumu sağlamak için işaret parmağı ile kalçadan, başparmak

ile uyluktan baskı uygulayarak venöz dolum sağlanır (Resim 5b). Daha sonra safen vene atılan küçük bir kesi ile az miktarda kan alınır (Resim 5c). Kanamayı durdurmak için venin üzerine baskı uygulanır. Bu yöntem çoklu örnek alımında kullanılabilir. Birden fazla örnek aynı yerden alınacağı zaman yara kabuğu kaldırılır. Bu bir günde birkaç kez yapılabilir (4). Kanı durdurmak için ven üzerine baskı uygulanır. Kanamanın durduğundan emin olduktan sonra fare kafesine konur.



Resim 5a: Lateral safen venden kan alma



Resim 5b: Lateral safen venden kan alma



Resim 5c: Lateral safen venden kan alma

Orbital Sinüsten Kan Alma: Kan almak için, fare hafif anestezi altında uyutulur ve yan yatırılır. Göz kapakları gerdirilerek gözlerin hafif dışarıya çıkması sağlanır (Resim 6). Medial göz açısından kapiler bir tüp orbital sinüse sokulur ve göz küresinin arkasındaki pleksusa doğru ilerletilir. Tüp pleksusun içinde döndürülür, buradaki damar-



Resim 6: Orbital sinüsten kan alma

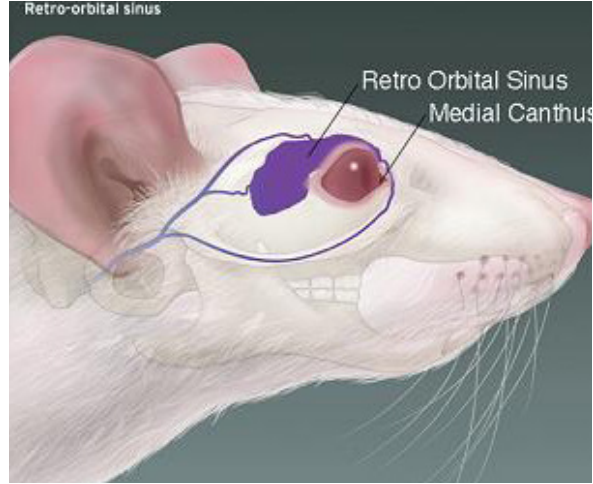
lar kanatılarak kanın tüp içine dolması sağlanır (Resim 7a, 7b). Bu teknikle haftada bir veya iki haftada bir fareden 0.25 ml kan alınır. Bu işlemi yaparken o bölgenin anatomisinin iyi bilinmesi gerekir (Resim 8). İşlem bittikten sonra kanama ve hematoma oluşmasını önlemek için tüpün girdiği yere hafifçe baskı uygulamak gerekir (3, 9).



Resim 7a: Tüpün pleksusa ilerletilmesi



Resim 7b: Tüpe kanın dolması



Resim 8: Retro orbital sinüsün anatomisi

SIÇAN

Kalpten Kan Alma: Bu teknik fazla miktarda kan alınması gerektiği durumlarda ve deneye son verilme aşamasında kullanılır. Bu tür bir işlem yapılmadan önce, sıçan uygun anestezi yöntemiyle uyutulmalıdır. Kan alınacak bölge tıraş edilir. İşaret ve başparmak arasında göğüste kalp atımları saptanır. 25 no'lu iğne ile toraksın sol tarafına ve dik olarak girilir. İğne ile girilirken enjektöre

hafif bir basınç uygulanır. Eğer kan gelirse enjektör pistonu yavaşça bırakılmalıdır. Diğer bir yöntemde de kalp; sırt üstü yatırılan hayvanın ksifosternal kısmından palpe edilir (Resim 9a). İğne ile tam göğüs altından, vücuda 25-30 derece açı ile girilir. İğne, kan gelinceye kadar adım adım ilerletilir ve kan gelince piston yavaş bir biçimde serbest bırakılır (Resim 9b) (1, 6).

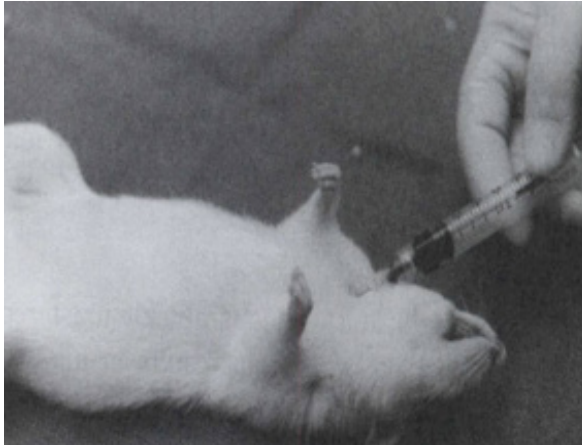


Resim 9a: Kalpten kan almaya hazırlık



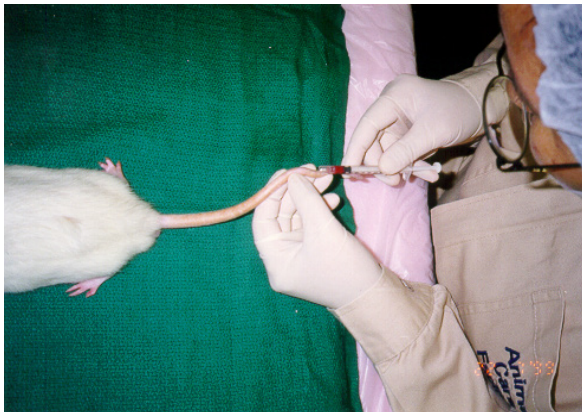
Resim 9b: Kalpten kan alma

Juguler Venden Kan Alma: Hayvan uyutulmalı, boynu tıraş edilmeli, orta hatta ve jugular vene paralel olarak 25 no'lu iğne ile girilmelidir (Resim10). Cilt altı katlar dikkatlice geçildikten sonra buraya venin kollabe olmasını önlemek için prokain hidroklorür uygulanmalıdır (9).



Resim 10: Juguler venden kan alma

Kuyruktan Kan Alma: Sıçan uygun anestezi madde ile uyutulur. Sıçanın lateral kuyruk veninden 25-30 no'lu iğne ile 20-30 derecelik açıyla girilerek 0.5 ml kadar kan alınabilir (Resim 11). Damar görünür değilse, kuyruk ılık suya (40°C) daldırılarak damarın görünür hale gelmesi sağlanır (9) ve akabinde de vazodilatasyonu arttırmak için kuyruk 5-8 dakika 37°C de bekletilebilir (6). Diğer bir yöntem ise kuyruk ucu kesilerek (kesinin hemen üstünden ipek iplikle bağlanır) ya da bistüri ile damarın üzerinde küçük bir kesi yapılarak kan alınmasıdır (Resim 12) (11). Kan alındıktan sonra kesi yerinin üzerine hafif basınç uygulayarak kanama durdurulur (2, 9).



Resim 11: Kuyruktan kan alma



Resim 12: Kuyruktan kan alma

Ventral Kuyruk Arterinden Kan Alma: Uygun bir anestezik madde ile uyutulan sıçanın kuyruğu 5-10 saniye sıcak suya daldırılıp çıkarılarak damarların genişlemesi ve görünür hale gelmesi sağlanır (Resim 13a). Daha sonra sıçan sırtüstü pozisyona getirilen sıçanın, kuyruk arterine 20-30 derece açı ile ucunda enjektör bulunan 20-22



Resim 13a: Arterin görünür hale gelmesi

Orbital Sinüsten Kan Alma: Faredeki yöntemin aynısı uygulanır. Sıçan uygun anestezi ile uyutulur ve yan yatırılır. Göz kapakları gerdirilerek gözlerin hafif dışarı çıkması sağlanır. Gözün medial kantusundan kapiler bir tüp orbitaya sokulur ve göz küresinin arkasındaki pleksusa doğru ilerletilir. Bu tüp, pleksus içinde sağa sola döndürülür, damarın yırtılmasıyla kanın tüp içine dolması sağlanır (6, 9, 12, 13). Bu yolla 0.5 ml miktar kan alınabilir. Farelerde olduğu gibi işlem sonrasında kanama veya hematoma oluşmaması için göze baskı uygulanır. Teorik olarak kabul görmekle birlikte, uygulaması faredekinden çok daha zor olduğundan tercih edilmez.

Safen Venden Kan Alma: Faredeki tekniğin aynısı uygulanır (1, 13).



Resim 14a: Kalp atımı alımı

no'lu iğne ile girilir (Resim 13b). Hızla enjektör dolar, fakat kanama azalır veya kesilirse iğne yavaşça geri çekilir. Hala kan almak istenirse daha proksimalinden yeniden denenebilir. Bir süre damara bası yapmak, kanama kontrolü için gereklidir.

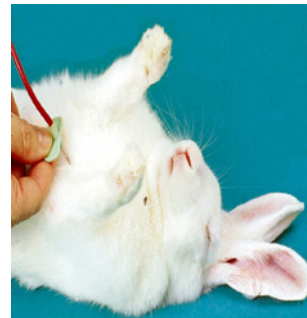


Resim 13b: Kuyruk arterinden kan alma

Diğer yöntemler safen ven, penil ven ve sublingual venden kan almadır.

TAVŞAN

Kalpten Kan Alma: Bu yöntemle kan alma, ancak deneye son verme aşamasında uygulanır. Tavşan uygun anestezi altında iken sağ lateral pozisyona yatırılmalı ve 19-21 no'lu iğne ile kalp atımının en iyi hissedildiği yerden (Resim 14a), 3-4 cm uzunluğunda bir iğne ile girilip sıçanlarda anlatıldığı kan alınabileceği gibi, sırtüstü yatırılan hayvanın ksifosternal bölgesinden yavaşça girilerek de kan alınabilir (Resim 14b). Kullanılacak iğnenin vakumlu olması tercih edilir (6).



Resim 14a: Kalpten kan alma

Kulak Veninden Kan Alma: Tavşandan kan almak için lateral ya da marjinal kulak venleri veya arteri tercih edilir. Özellikle bu iş için en uygun ven, marjinal kulak venidir. Kan alınacak bölgenin tüyleri tıraş edilir (Resim 15). Bu işlem için tavşanın anestezisi altında olması gerekli değildir. Özel tasarım hareket kısıtlayıcı içine konan tavşandan kan örneği kolaylıkla alınabilir. Kulak işaret

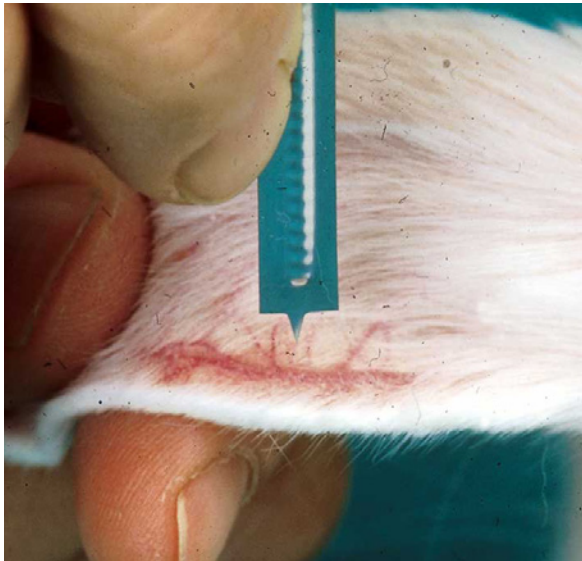
parmağı ile başparmak arasına alınır, 21-23 no'lu iğne ile kulak venine girilip gerekli miktarda kan enjektöre yavaşça çekilir (Resim 16). Diğer bir yöntem ise, ven üzerine küçük bir kesi yaparak 50 ml'ye kadar kanın damla damla alınmasıdır (Resim 17a, 17b, 17c). Eğer daha fazla kan almak isteniyorsa, santral venin hemen önündeki santral kulak arteri kullanılabilir (6, 9).



Resim 15: Marjinal kulak veni



Resim 16: Kulak veninden kan alma



Resim 17a: Lateral kulak venine insizyon



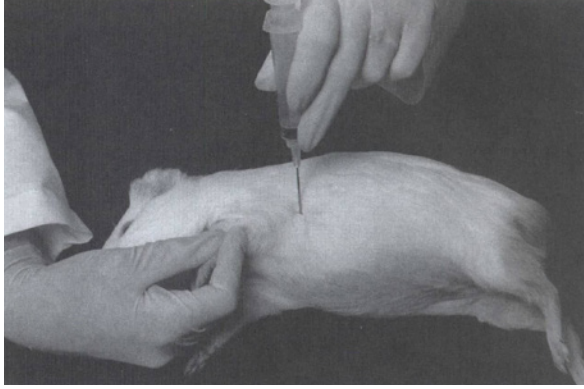
Resim 17b: Kulak veninden kan alma



Resim 17c: Kulak veninden kan alma

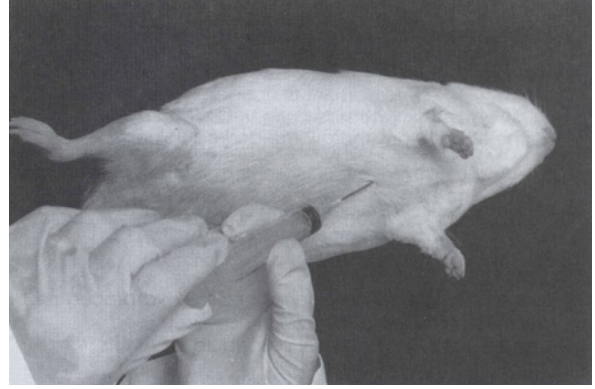
KOBAY

Kobayın kuyruğu olmadığından kulak veni, orbital sinüs, intrakardiyak veya vena jugularis eksternal kan alımı için kullanılır. Kulak veni, çok az miktarda kan almak için kullanılır.



Resim 18: Kalpten kan alma

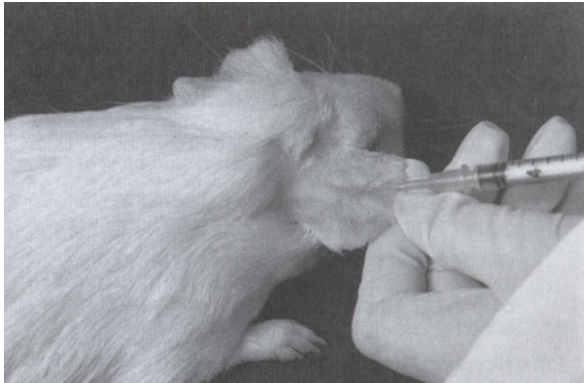
Kalpten Kan Alma: Kobay uygun anestezi ile uyutulduktan sonra sırtüstü yatırılır ve sabitle-nir. Ksifoidin altından 21-23 no'lu iğne ile 25-30 derecelik açı ile kalbe girilir. Yavaş bir biçimde ilerlerken aynı zamanda kan da yavaşça enjektöre çekilir. Eğer kobayın yaşaması isteniyorsa 7 ml'den fazla kan alınmamalıdır (9).



Resim 19: Kalpten kan alma

Lateral Safen Venden Kan Alma: Küçük miktarda kan almak için lateral safen venin bulunduğu alan tıraş edilir. Bu alan dezenfektan ve alkolle silinir, venöz dolumu sağlamak için başparmak ile baskı uygulanır. Daha sonra lateral safen vene 22 no'lu iğne ile girilir ve az miktarda kan alınır. Ardından kanamayı durdurmak için ven üzerine baskı uygulanır. Diğer bir yöntemde ise lateral safen ven üzerine küçük bir kesi yapılır, kan doğrudan tüpe alınır (4).

Kulak Veninden Kan Alma: Kobayların kulak veni, küçük miktarlarda kan almak için kullanılır. 0.1-0.2 ml gibi çok küçük miktarlarda kan alınır (Resim 19). Bir başka yöntemle, venin üzerine küçük bir kesi yapılarak da kan alınabilir. Bu işlemin anestezi altında yapılması daha uygun olur (14,15).



Resim 19: Kulak veninden kan alma

Juguler Venden Kan Alma: Bu yöntem sıçanlardaki gibi uygulanır. Kobay uygun anestezi altında uyutulur, boyun bölgesi tıraş edilir. Orta hatta ve jugular vene paralel insizyon yapılır. Cilt dikkatli bir şekilde disekte edildikten sonra insulinenjektörü ile vene girilir ve kan alınır. Kan alma işleminden sonra kanamayı durdurmak için hafifçe baskı uygulanır (14, 15).

KAYNAKLAR

- [1]. Beeton C, Garcia A, Chandy KG. Drawing blood from rats through the saphenous vein and by cardiac puncture. *J Vis Exp* 2007; (7): 266.
- [2]. Brown C. Blood collection from the tail of a rat. *Lab Anim (NY)* 2006; 35(8): 24-25.
- [3]. Fried JH, Worth DB, Brice AK, Hankenson FC. Type, duration, and incidence of pathologic findings after retroorbital bleeding of mice by experienced and novice personel. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2015; 54(3): 317-327.
- [4]. Hem A, Smith AJ, Solberg P. Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink. *Lab Anim* 1998; 32: 364-368.
- [5]. Hoggatt J, Hoggatt AF, Tate TA, Fortman J, Pelus LM. Bleeding the laboratory mouse: Not all methods are equal. *Experimental Hematology* 2016; 44: 132-137.
- [6]. Karl-Heinz Diehl, Robin Hull, David Morton, Rudolf Pfister, Yvon Rabemampianina, David Smith, Jean-Marc Vidal and Cor van de Vorstenbosch. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol* 2001; 21: 15-23.
- [7]. Michael W McGuilland, Andrew N. Rowan. Perspectives on animal use, biological effects of blood loss: Implications for sampling volumes and techniques. *ILAR NEWS* 1989; 31 (4): 5-20.
- [8]. Orman ve Su İşleri Bakanlığında: Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul Ve Esaslarına Dair Yönetmelik, 15 Şubat 2014 tarih, 28914 sayılı resmi gazete.
- [9]. Parasuraman S, Raveendran R, Kesavan R. Blood sample collection in small laboratory animals. *J Pharmacol Pharmacother* 2010; 1(2): 87-93.
- [10]. Salmanoğlu B, Karahan S. Deneysel Uygulamalar. In: İde T (ed). *Laboratuvar Hayvanları Biliminin Temel İlkeleri*. Okan Matbaacılık Ltd. Şti. Medipres. Ankara, Turkey. 2003; pp 292-297.
- [11]. Staszyk C, Bohnet W, Gasse H, Hackbarth H. Blood vessels of the rat tail: a histological re-examination with respect to blood vessel puncture methods. *Lab Anim* 2003; 37(2): 121-125.
- [12]. Van Herck H, Baumans V, Brandt CJ, Boere HA, Hesp AP, van Lith HA, Schurink M, Beynen AC. Blood sampling from the retro-orbital plexus, the saphenous vein and the tail vein in rats: comparative effects on selected behavioural and blood variables. *Lab Anim* 2001; 35(2): 131-139.
- [13]. Van Herck H, Baumans V, Van der Craats NR, Hesp AP, Meijer GW, Van Tintelen G, Walvoort HC, Beynen AC. Histological changes in the orbital region of rats after orbital puncture. *Lab Anim* 1992; 26(1): 53-58.
- [14]. Williams WR, Kendall LV. Blood collection in the guinea pig (*Cavia porcellus*). *Lab Anim (NY)* 2015; 44(6): 207-208.
- [15]. Zimmerman K, Moore DM, Smith SA. Hematological assessment in pet guinea pigs (*Cavia porcellus*): Blood sample collection and blood cell identification. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 2015; 18(1): 33-40.