

ПЛАСТИНАЦИЈА НА ТКИВА И ОРГАНИ: ИНТЕРДИСЦИПЛИНАРЕН ПРИСТАП ЗА ЗАМЕНА НА ЛАБОРАТОРИСКИ ЖИВОТНИ КОИ СЕ КОРИСТАТ ВО НАСТАВНО НАУЧНИОТ ПРОЦЕС

Илиески Влатко., Пендовски Лазо., Петков Владимир.,
Поповска-Перчиник Флорина., Мизрахи Рашела

Универзитет Св. Кирил и Методиј, Факултет за ветеринарна медицина
Катедра за Функционална морфологија
Адреса: Лазар Поп Трајков 5-7, 1000 Скопје, Македонија
e-mail: vilieski@fvm.ukim.edu.mk

АБСТРАКТ

Целта на трудот е да се примени методот за пластинацијата како алтернативна метода за заштита на животните кои се користат во едукацијата, експериментите и истражувањата согласно европската директива 86/609/ЕЕС.

Како материјал е употребено едно женско угинато морско прасе на старост од 2 години. Дисекцијата на мускулите, поткожните структури и органите од абдоминалната празнина извршена е непосредно по смртта на животното. Пластинацијата на морското прасе е изведена со примена на протоколот на стандардната техника - S-10.

Пластинираното морско прасе е со цврста конзистенција, на допир е суво, без мирис и без токсични хемикалии. Дисекцираните мускули на пластинираниот модел овозможуваат да се изучи нивната синтопија и да се разбере нивната функција. Поради трајната фиксација органите во стомачната празнина ја задржуваат топографската позиција и даваат целосен увид на анатомскиот сооднос на абдоминалните органи како што се: желудникот во сооднос со слезената панкреасот и левиот бубрег, прикажан е мезентериумот со деловите од тенките и дебелите црева, роговите на матката со јајниците и сл.

Според резултатите, примената на S-10-техниката за пластинација овозможува да се добие траен анатомски модел од лабораториско животно на кое може да се проучува анатомска градба. Методата за пластинација е важен инструмент кој дозволува примена на 3'R концептот, бидејќи пластинираните модели ја намалуваат употребата на лабораториските животни кои се користат за едукација и истражување.

Клучни зборови: лабораториски животни, морско прасе, пластинација, едукација, истражување, европска директива 86/609/ЕЕС.

ВОВЕД

Лабораториските животни во биолошките науки најчесто се користат во експерименти за решавање на разни медицински проблеми. (1-3) Во предклиничките предмети лабораториските животни воглавно се користат за испитување на физиолошките и биохемиските

процеси во организмот како и за подготовка на ткива за хистолошки односно пато-хистолошки претраги. (4)

Исто така голем е бројот на лабораториски животни кои годишно се еутаназираат и се користат како кадавери за изучување на морфолошка градба. (5-7) Бидејќи кадаверите се подложни на путрификација и трулење пот-

ребно е да фиксираат со хемиски средства како што се формалин, фенол, етанол и глицерин со цел нивна заштита и подолго користење. (6) Вака фиксираниите препарати создаваат токсични пареи кои најчесто имаат канцерогено дејство врз органите на дишење и очите. Затоа во биолошките дисциплини, интенција е пронаоѓање и примена на нови алтернативни методи кои би можеле да се искористат како соодветна замена на употребата на лабораториските животни. (8)

Во овој труд пластинацијата е применета како метода за изучување на анатомската градба на лабораториските животни со цел да се користи како алтернативна метода за заштита на животните кои се употребуваат во едукацијата и истражувањата согласно Европската директива 86/609/EEC. (9)

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Во изработката на овој труд употребено е едно морско прасе (*Cavia porcellus*) од женски пол умрено од природна смрт на старост од 2 години.

Пластинацијата на морското прасе е изведена согласно протоколот за стандардната техника за пластинација - S-10, во кој ткивата се импрегнираат со мешавина од силиконите S-10/S3.

Постапката започнува со фиксација на препарираното морското прасе во имерзионен раствор од 5% формалин на собна температура за време од еден месец. (11) Употребена е ниска концентрација на формалин за да се овозможи брза инкорпорација на формалинот низ клеточната мембрана и негово навлегување во молекуларните структури на клетката. Ваквиот пристап има за цел денатурација на клеточните ензими и спречување на автолиза. (12)

Дехидратацијата е следната фаза на пластинацијата каде интраклеточната и интерклеточната вода од ткивата се заменува со органски растворувач (13). Применета е постапката на дехидратација во три ацетонски бањи со технички чист ацетон п.а. (100%) на температура од -25°C за време од три недели. Ниската температура кај оваа техника овозможува стабилизација на формата на ткивата и го спречува собирањето на органите кои се де-

Слика 1. Морско прасе (*Cavia porcellus*)



Дисекцијата на кожата, поткожните структури и мускулите е извршена непосредно после смртта на животното. (10) Отворена е абдоминалната празнина со сагитална инцизија на linea alba а потоа со две трансверзални инцизии по работ на arcus costae овозможен е пристап до внатрешните органи на абдоменот. Сите органи во абдоминалната празнина се препарирани во нормална анатомска позиција in situ.

хидрираат со што се задржува нивната форма и големина. Степенот и брзината на дехидратацијата се следи со промената на концентрацијата на чистота на ацетонот со ацетометар. Кога ќе се постигне концентрација поголема од 99% дехидратацијата е комплетна. (14)

Импрегнацијата е централната постапка од пластинацијата каде интермедијалниот раствор се заменува со полимер под вакуум усло-

ви. Процесот се заснова на разликите во точките на испарување помеѓу полимерот и ацетонот при различни притисоци. (15) При апликација на вакуум, притисокот во вакуум комората постепено се намалува и предизвикува промена на ацетонот од течна во гасна состојба. (15-17). Ацетонот во облик на гас се аспирира од вакуум комората преку вакуум пумпа а полимерот се вовлекува во ткивата као негова замена. Импрегнацијата на морското прасе со мешавина од силикон S10/S3 во сооднос 100: 0.5 е изведена по принципот на „неконтинуирана форсирана импрегнација“ за време од 40 денови. Морското прасе се подложува на вакуум во временски интервал од 8-10 часа а потоа постепено вакуумот се намалува со што се овозможува релаксација на ткивата. (18) Ваквиот пристап на работа овозможува бавна импрегнација со навлегување на силиконот во најдлабоките слоеви на ткивата. Брзината на импрегнација е следена со вакуум контролер. (Табела 1)

После целосната импрегнација се прават последните моделирања кај препаратот бидејќи силиконот се уште е течен и овозможува манипулација со ткивата. Во оваа студија морското прасе е остаено на собна температура за време од 24 часа да се исцеди вишокот на полимер од неговата површина а потоа помеѓу мускулите и органите од абдоминалниот празина се поставени мали делови од ткаенина која го ресорбира вишокот на полимер а истовремено овозможува да се разграничат соседните анатомски структури.

Табела 1.
Приказ на брзината на импрегнација

притисок	денови
300 mbar	1
250 mbar	1
225 mbar	1
200 mbar	1
170 mbar	1
130 mbar	2
100 mbar	1
80 mbar	3
70 mbar	2
60 mbar	2
45 mbar	2
30 mbar	3
20 mbar	2
18 mbar	1
15 mbar	2
13 mbar	1
10 mbar	2
8 mbar	2
5 mbar	5
вкупно	40 денови

Слика 2. Моделирање на мускулите на екстремитетите



Зацврстувањето е последната фаза од пластинацијата. Импрегнираниот силикон во ткивата на морското прасе. Зацврстено е со силиконски зацврстувач S6, течност која на собна температура испарува и постепено дифундира во ткивата. (12,15,19) Зацврстувачот предизвикува надолжни и странични поврзувања на молекулите од мешавината S10/S3 со што се предизвикува стабилизација на нивните врски (19). За време од 24 часа силиконот од површината на морското прасе е целосно зацврстена.

Во следните 2 месеци подготвениот препарат се сместува во затворена пластична кеса со цел силиконот целосно да се зацврсти и во најдлабоките ткива.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Со пластинација на морското прасе (*Cavia porcellus*) преку импрегнација со силикон-S10 е добиен траен анатомски модел кој може да се користи за едукација при изучување на анатомијата на лабораториските животни. Фиксираните ткива исто така можат да се истражуваат и во научноистражувачки цели. Пластинираното морско прасе е со цврста конзистенција, на допир е суво и без мирис. Мускулатурата и органите имаат темна нијанса што се должи на употребениот фиксатив.

Слика 3. Пластинирано морско прасе. Отворена е абдоминалната празнина со сагитална инцизија на *linea alba* а потоа со две трансверзални инцизии овозможен е пристап до внатрешните органи на абдоменот кои се препарирани и поставени во анатомска позиција *in situ*.



Временскиот период потребен за добивање на анатомскиот модел детално е прикажан во Табела 2.

Табела 2. Фази и временска рамка за пластинација

Фази во пластинацијата	Време (денови)	Температура
Фиксација	30	собна температура
Испирање	1	10°C
Предладење	1	5°C
Дехидратација	28	-25°C
Имерзија	1	-20°C
Форсирана импрегнација	21	-20°C
Предзацврстување и моделирање	5	собна температура
Гасно зацврстување	1	собна температура
Фаза на пост-гасно зацврстување	60	собна температура

За разлика од пластинацијата како трајна метода за фиксација на анатомски модели, најчесто за изучување на анатомијата се користат препарати кои се фиксираат со разни хемиски средства како што се формалин, фенол, алкохол и глицерол со цел да се заштитат од распаѓање како и за нивна подолготрајна употреба.(20) Вака подготвените препарати се познати како „влажни модели“ кои поради испарувањето на токсичните пареи делуваат токсично на организмот и ги иритираат лигавиците од дишниот систем и очите. За подготовката на влажните препарати како и при нивна употреба во практичните дисекции потребни се специјално опремени простории кои ги задоволуваат условите за работа.(5,8) Во оваа студија пластинираното морско прасе е слободно од хемикалии, лесно за манипулација а за негово складирање може да се користи секоја просторија на собна температура.

Сепак според Weiglein AH (1997) пластинираните препарати не даваат советен приказ

Слика 4. 1. *ventriculus*; 2. *lien*; 3. *pancreas*



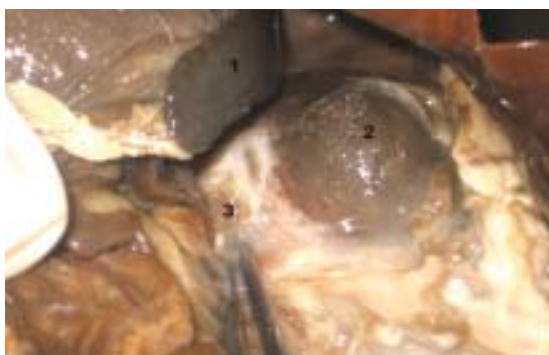
Слика 5. 1-3. *lobi hepatis*; 4. *vesica fellea*;



за начинот на делување на одредени анатомски структури како што се движењето на зглобовите или механизмот на движење на мускулите.(17) Исто така поради нивната цврста и трајна фиксација честопати не може да се добие вистинска слика за соседните анатомски структури (нерви, артерии, вени, лигаменти)кои лежат во подлабоките слоеви од препаратот.(15)

Слика 6. Абдоминална празнина

1. lien; 2. ren sinister; 3. ovarium sinister



За да се избегнат овие недостатоци при пластинацијата на морското прасе е употребена ниска концентрација на силиконската компонента S3 (0.5% од основната мешавина) со што е овозможена делумна флексибилност на ткивата.

Органите во stomачната празнина може да се поместуваат а потоа поради трајната фиксација секогаш да се вратат во својата пози-

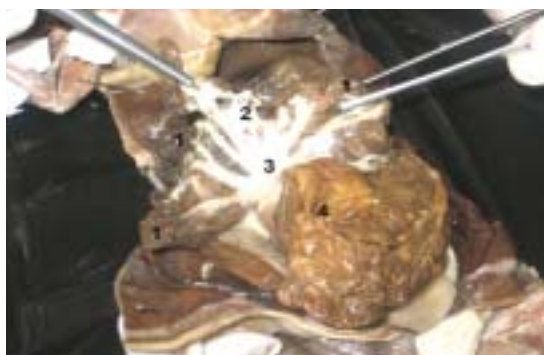
ција задржувајќи ја топографска положбата на сите органи од абдоменот.

Со подигање на цревната плоча овозможен е пристап до дел од гениталните органи (роговите и телото на матката, исто така добро се гледа топографскиот сооднос на желудникот, слезената, панкреасот и левиот бубрег, се издвојува и мезентриумот со делови од тенките и делови од дебелите црева, лобуси-

Слика 7. Абдоминална празнина.

1. lien; 2. ren sinister; 3. ovarium sinister

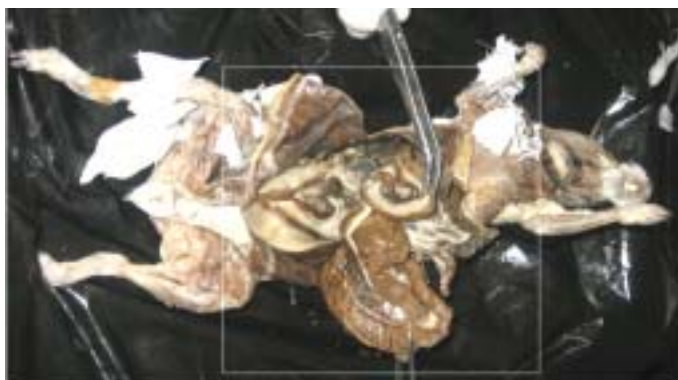
1. jejunum; 2. mesenterium; 3. масно ткиво во мезентриум



те на црниот дроб и положбата на жолчната кеса и сл.

Со претходната дисекцијата на мускулите од екстремитетите и телото на морското прасе, со пластинацијата се фиксирали во соодветна положба овозможувајќи изучување на синтопијата на мускулите а можноста од делумна подвижност на зглобовите дозволува лесно да се разбере нивната функција.

Слика 8. Топографска анатомија на абдоминална празнина. 1. jejunum; 2. colon ascedens; 3. масна ткиво во mesocolon ascedens; 4. caecum; 5. colon descedens; 6. coronue uteri; 7. corpus uteri; 8. ovarii dexter; 9. ren dexter



Слика 9. Приказ на дисекцирани мускули и масни пернициња. 1. дорзално масно перниче, 2. аксиларно масно перниче, 3. *m.latissimus dorsi*; 4. *m.trapezius thoracis*; 5. *m.omotransversarius*; 6. *caput longum m. triceps brachii*; 7. *caput laterale m. m. triceps brachii*; 8. *m.deltoideus*; 9. *pars acromnialis m.deltoideus*; 10. *m.sarrtorius*; 11. *m.biceps brachii*; 12. *m.gluteus superficialis*; 13. *fascia lumbodorsalis superficialis*



Една од целите на овој труд е имплементација на Европската директива 86/609/ЕЕС за заштита на животните кои се користат во едукацијата, експериментите и истражувањата. (9) Во директивата се содржани насоките на делување на Европската комисијата и земјите членки на ЕУ за пронаоѓање, развивање и валидација на методи кои ги намалуваат или заменуваат лабораториските животни во експериментите. Директивата наложува утврдување на нови алтернативни методи со кои би можело да се добијат информации соодветни на оние добиени во експерименти каде се користат живи животни притоа вклучувајќи мал број на животни или овозможувајќи помалку штетни процедури соодветни за истражувањата во оваа област. Од друга страна познато е дека секоја година голем број на животни се повредуваат или еутаназираат со цел да се изучи нивната морфолошка структура. (21) Со примена на пластинацијата во оваа студија како алтернативна метода, се покажа дека со пластинација на едно лабораториско животно се овозможува негова трајна примена во едукацијата бидејќи подготвените пластинати нудат информации со квалитет кој не отстапува од податоците добиени при дисекција при изучување на анатомијата кај лабораториските животни.

Денес исто така етиката има голема важност во медицината. На универзитетите често се избегнуваат дискусиите за употребата на животните во експерименти, изучување на

нови вештини или да се потврдат разни хипотези. Притоа многу студенти се приморани да ги користат еутаназираните животни за дисекција притоа без да имаат соодветна замена на дисекцијата. (21, 22, 23) Со имплементација на пластинацијата како алтернативна метода, потребата од дисекцијата на животните може да се намали со што се намалува и бројот на еутаназирани животни потребни во текот на една учебна година. Применета на оваа метода ќе има позитивен импакт при обука на младите истражувачи и во целост во општество преку цврсто етаблирање на етичната пракса земајќи го во предвид напредокот во технолошкиот развој кој ја наметнува потребата за проширувања на знаењата и вештините.

ЗАКЛУЧОК

Методата за пластинација на ткива и органи преставува важен инструмент кој овозможува примена на 3'R концептот. Овој факт произлегува од квалитетот на пластинираните модели кои се добиени со примена на оваа метода. Пластинираните ткива и органи ја имаат истата структура облик и положба како и органите фиксирани со конвенционалните методи и средства на фиксација. Предноста кај пластинираните методи е тоа што се трајни, не се токсични и можат да се користат и повеќекратно со што и ја намалат употребата на лабораториските животни во научни и едукативни цели.

PLASTINATION OF TISSUES AND ORGANS: INTERDISCIPLINARY APPROACH TO REPLACE LABORATORY ANIMALS THAT ARE IN USE FOR EDUCATION AND RESEARCH

*Ilieski Vlatko, Pendovski Lazo., Petkov Vladimir.,
Popovska-Percinic Florina., Mizrahi Rasela

Department of Functional morphology
University "Sts. Cyril and Methodius" – Skopje
Faculty of Veterinary Medicine;
e-mail: vilieski@fvm.ukim.edu.mk

ABSTRACT

The aim of this work is to apply the plastination as an alternative method for protection on animals that are used in education, experiments and research according the European Directive 86/609/EEC.

A two years old female guinea pig is used as material. The dissection of muscles as well subcutaneous structures and organs from abdominal cavity is preformed immediately after the death of animal. The guinea pig is plastinated using the protocol for S10 plastination.

The plastinated guinea pig has firm consistention, it is dry on hand touch, oddorless and free of any chemical substances. The dissected skeletal muscle enable to learn their topography and easy to understand their function. Because of permanent preservation, the organs from abdominal cavity retain their topographical position enabling complete view of anatomical relationship of organs like stomach, spleen, pancreas and left kidney are, the mesenteries with apart of thin and large intestines, the relationship between the ovary and the horns of the uterus.

According the results, the S10 plastination technique can be use for developing an anatomical model from one laboratory animal witch can be used for education process in anatomy. The method of plastination is an important tool allowing 3'R concept to be aplied and widely accepted since plastinated models can reduce using the laboratory animals for education and research purposes.

Key words: laboratory animals, guinea pig, plastination, education, research, European Directive 86/609/EEC.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ammons S.W. Use of live animals in the curricula of U.S medical schools. *Academic medicine*. 70: 740-43; 1995
2. Sieber J.E. Students and scientists attitudes on animal research. *The american biology teacher*. 48(2): 85-91; 1986
3. Goldfinger J et al. Dissection need for animal tests in biology lab. *Currier Times* 50-51; 1993
4. Cohen P.S. Block M. Replacement of laboratory animals in an introductory psychology laboratory. *Humane innovations and Alternatives*. 5: 221-25; 1991
5. Bowd. A.D. Dissection as an instructional technique in secondary science: Choice and alternatives. *Society and Animals*. 1(1): 83-88; 1993
6. Kieser T.D and Hamm R.W. Forum; Dissection - The case for. *The Science teacher*. 58(1): 13-15; 1991
7. Lord T. Important of animal dissection. *Journal of college Science Teaching* 330-31; 1990
8. Young J.A. Formaldehyde-the nose know. *The science teacher*. 51(6): 44; 1984
9. Evropskata direktiva 86/609/EEC.
10. Schrock J.R. Dissection. *The Kansas school Naturalist* 36(3) : 3-16; 1990
11. Oostrom K. Fixation of tissue for plastination: General Principles *J Int Soc Plastination Vol 1* (1): 3-11, 1987
12. Von Hagens G; Tiedeman K; Kriz W: The current potential of plastination. *Anat Embryol* 175 (4): 411-421, 1987.
13. Tiedemann K; Ivic-Matijas D: Dehydration of macroscopic specimens by freeze substitution in acetone. *J Int Soc Plastination*, (2): 2-12, 1988.
14. Henry RW, Janick L, Henry C: Specimen preparation for silicone plastination. *J Int Soc Plastination Vol 12* (1): 13-17, 1997
15. Von Hagens G: Heidelberg Plastination Folder: Collection of all technical leaflets for plastination. *Anatomische Institut 1*, Heidelberg, Germany, 1986.
16. Weiglein A: Preparing and using S-10 and P-35 brain slices *J Int Soc Plastination Vol 10* (1): 22-25, 1996.
17. Weiglein AH; Plastination in the neurosciences. *Acta Anatomica* 1997;158:6-9
18. Henry RW, Nel PPC: Forced impregnation for the standard S10 method. *J Int Soc Plastination 7* (1): 27-31, 1993.
19. Weiglein AH; Henry RW: Curing (hardening, polymerization) of the polymer-Biodur S10. *J Int Soc Plastination 7* (1): 32-35, 1993
20. Hepner L.H. Animals in education: The facts issues and implications. *Albuquerque: Richmond publisher*. 3: 55; 1994
21. Brennan A. et al. Animals in teaching: Education and ethics. In *Animals in education: value responsibilites and questions*. 1. 3-150; 1997
22. Keith -Spiegel P.C; Tabachnick B.G; Allen M. Ethics and academia; Students view of professors actions. *Ethics and behavior*. 3(2): 149-62; 1993
23. Barnerd N.D and Baron L. Alternatives to the dissection. *Humane Innovations and Alternatives in Animal Experimentation* 3: 92-93 1989