Archive of SID

مروری بر بیهوشی و تزریقات در موش آزمایشگاهی

روزبه فلاحی*

کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: fallahiroozbeh@gmail.com

چکیده

در تحقیقات علمی، موش آزمایشگاهی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است و به عنوان اولین حیوان انتخابی مطرح است. موش‌های آزمایشگاهی در مطالعات و تحقیقات بیولوژی، باکتریولوژی، ویرولوژی، فارماکولوژی، فیزیولوژی بیماریها، سلول و سرطان‌شناسی، تغذیه، ژنتیک، تهیه سرم و واکسن، تست فرآورده‌های بیولوژیک، تست فرآورده‌های دارویی، مطالعات روان‌شناسی، آزمایشات رفتاری، تست ناهنجاری‌زایی، تست‌های سم‌شناسی، تست مکمل‌های غذایی، تحقیقات فضایی، ایزوتوپ‌ها و مواد رادیو اکتیو و بسیاری از موضوعات دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرند. از آنجاکه در بسیاری از آزمایشاتی که بر روی موش های آزمایشگاهی انجام می گیرند، نیاز به بیهوش کردن آنها جهت انواع روش های تزریقات، خونگیری ها، جراحی و ... است، لذا لزوم به کارگیری و استفاده از داروهای مناسب بیهوشی و طریقه استفاده از آنها و معرفی انواع روش های استاندارد تزریقات در این حیوان آزمایشگاهی ضروری به نظر می رسد.

کلیدواژگان: بیهوشی، تزریقات، موش آزمایشگاهی

مقدمه

حیوانات آزمایشگاهی در زمینه‌های مختلف کاربرد داشته و اکنون سالیانه، میلیون‌ها سر از این حیوانات در تحقیقات گوناگون نظیر بیولوژی، ایمنی‌شناسی، انگل‌شناسی، پاتوفیزیولوژی، سرطان، ژنتیک، اختلالات ارثی، تغذیه، بیماری‌های عفونی، جراحی تجربی، رادیولوژی، پیوند اعضاء، تعیین اثر داروهای جدید و حتی در کیهان‌نوردی و تحقیقات فضایی استفاده می‌شوند. به طور کلی از حیوانات آزمایشگاهی به عنوان مدل، در تحقیقات زیست شناسی استفاده می‌شود. گرچه از هر حیوانی، چه اهلی و غیر اهلی در زمینه‌های مختلف می‌توان استفاده کرد، ولی جوندگان و حیوانات کوچکتر به لحاظ اندازه کوچک و مناسب، قابلیت تولید مثل بالا، تعدد انواع، دستیابی آسان، راحتی کار و احتیاج به فضای کمتر، به مقدار بیشتری نسبت به حیوانات دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرند. موش به تنهایی در حدود ۸۰ ٪ از کل حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده در تحقیقات را به خود اختصاص می‌دهد. سالیانه میلیون ها سر موش آزمایشگاهی در تحقیقات گوناگون به مصرف می‌رسد. در کار عملی بر روی حیوانات آزمایشگاهی نظیر انجام روش های مختلف تزریقات، خونگیری ها، جراحی و ... نیاز به بیهوش کردن آنها با استفاده از داروهای مناسب بیهوشی می باشد. انتخاب و طریقه استفاده از انواع داروها و معرفی انواع روش های استاندارد تزریقات، بر طبق رعایت موارد اصول اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی از اهمیت زیادی برخوردار می باشد (۱-۶).

ایجاد بیهوشی در موش آزمایشگاهی

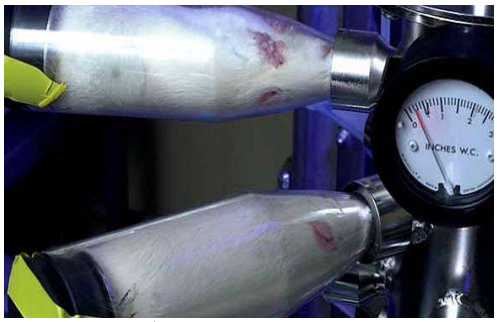
بیهوشی به دو صورت استنشاقی (استفاده از مایعات فرار بیهوش کننده) و تزریقی صورت می‌گیرد. در روش استنشاقی، استفاده از هالوتان، متوکسی فلوران، ایزو فلوران، اتر و کلروفرم در محفظه‌های شیشه ای و استفاده از آتروپین برای جلوگیری از ترشح بزاق دهان و گرفتگی عضلات معمول است (شکل ۱). در بعضی از نژادها بویژه در نرها، کلروفرم آسیب شدید کبدی و کلیوی ایجاد می‌کند. برای بی‌حسی‌های موضعی از ژل‌ها و اسپری‌ها یا کرم‌های بی-حسی لیدوکائین و پروکائین[1] و بوپیواکائین[2] در محل تزریق استفاده می‌شود. برای بیهوشی تزریقی، بسته به مدت زمان مورد نیاز بیهوشی، از دیازپام (۵ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم)، پنتوباربیتال (۶۰-۵۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم)، کتامین هیدروکلراید (۷۵ میلی‌گرم به ازاء هر

[1] Procaine
[2] Bupivacaine

www.SID.ir

Archive of SID

کیلوگرم) همراه با زایلازین (با نام تجارتی رامپون) (۱۰-۵ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم) که همگی به صورت داخل صفاقی تجویز می‌شوند استفاده می‌گردد و مدت زمان بیهوشی بین ۲۰ تا ۶۰ دقیقه است. در بعضی از منابع مانند کتاب UFAW[1]؛ دز[4] کتامین، ۱۰۰- ۸۰ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم + زایلازین به مقدار، ۱۰ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی و مدت زمان بیهوشی ۳۰-۲۰ دقیقه ذکر شده است (۱، ۴، ۶، ۷، ۸).



شکل ۱- بیهوشی استنشاقی در موش آزمایشگاهی.

نکات مهم:

۱- قبل از تزریق هر دارو، باید حیوان لحظاتی در محیط آزمایشگاه قرار بگیرد تا دمای آن با دمای محیط یکسان شود.

۲- موضع تزریق با پنبه آغشته به الکل ۷۰٪ ضد عفونی شود.

۳- جهت پیشگیری از صدمات بافتی به حیوان، همواره از سرنگ مناسب و یکبار مصرف و سوزن با نمره مورد نظر استفاده شود.

کتامین

برای اولین بار در سال ۱۹۷۰ در گربه استفاده شد. کتامین با جلوگیری از اثر انتقال دهنده عصبی تحریکی گلوتامیت[2]بر گیرنده‌های ان- متیل- دی-آسپارتیت[3]اثر بیهوش کنندگی خود را اعمال می‌کند. در صورت مصرف آن به تنهایی، احتمال بروز تشنج و صرع، وجود دارد. به همین دلیل معمولاً به صورت ترکیب با دیگر داروهای تضعیف کننده سیستم اعصاب مرکزی به کار برده می‌شود.کتامین با تحریک اعصاب سمپاتیک، به افزایش ضربان قلب، فشار خون و برون ده قلبی منجر می‌شود. کتامین بر خلاف دیگر داروهای بیهوشی، نه تنها شلی عضلانی ایجاد نمی‌کند، بلکه توان عضلانی را افزایش می دهد. بی‌دردی ناشی از کتامین برای جلوگیری از دردهای احشایی موثر نیست، اما برای تسکین دردهای سطحی، مانند سوختگی، بسیار موثر است. این دارو از جفت می‌گذرد و می‌تواند جنین را تضعیف کند. در بیهوشی با کتامین، چشم‌ها باز باقی می ماند، لذا استفاده از محلول‌های چشمی، برای جلوگیری از خشک شدن سطح قرنیه، ضروری است (۱، ۴، ۶، ۸، ۹).

زایلازین

زایلازین (رامپون) با تحریک گیرنده‌های آلفا ۲ آدرنرژیک[4] درسیستم اعصاب مرکزی و به دنبال آن کاهش میزان آزاد شدن نور اپی‌نفرین[5] در اعصاب، به ایجاد آرام بخشی و بروز خواب آلودگی می‌انجامد. دیگر اثرهای این دارو، شامل شلی عضلانی، بی‌دردی و استفراغ در گوشتخواران است. این دارو به وسیله کبد متابولیزه و از راه ادرار دفع می‌شود (۱، ۴، ۶، ۸، ۹).

تزریقات در موش آزمایشگاهی

روش‌های مختلف تزریق در موش آزمایشگاهی عبارت اند از:

تزریق داخل عضلانی (IM)[6]

پس از مقید کردن حیوان، تزریق در عضله خلفی ران[7] صورت می‌گیرد. مقدار ماده تزریقی ۰/۲-۰/۱ میلی‌لیتر و نمره مناسب سوزن، ۲۵-۲۳ می‌باشد (شکل ۲) (۱، ۴، ۶، ۷).

تزریق داخل صفاقی (IP)[8]

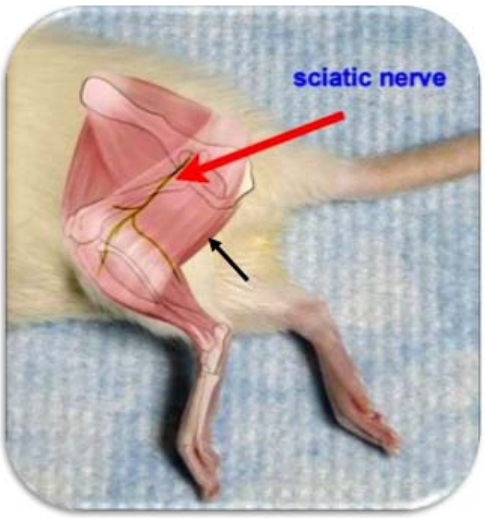
پس از مقید نمودن موش به طوری که شکم حیوان بطرف تزریق کننده و نیز سر حیوان بطرف پایین قرار گیرد، تزریق داخل صفاقی صورت می‌گیرد. در این صورت امعاء و احشا بطرف دیافراگم رانده شده و از ناحیه تزریق دور می‌شوند. محل تزریق، در طرفین شکم و ترجیحاً طرف چپ و قسمت پایین شکم است که پس از ضدعفونی کردن با الکل ۷۰ ٪ و

[1] Universities Federation for Animal Welfare
[2] Glutamate
[3] N-Methyl-D-Aspartate
[4] α_2 adrenergic
[5] Norepinephrine
[6] Intramuscular injection
[7] Caudal thigh muscle
[8] Intraperitoneal injection

www.SID.ir

Archive of SID

آسپیره کردن، ماده مورد نظر را باید به آرامی تزریق کرد (شکل ۳). مقدار ماده مورد نظر ۱/۵-۱ میلی‌لیتر و سوزن نمره ۲۳، مناسب می‌باشد. نحوه و میزان تزریق و استفاده از نمره مناسب سوزن بایستی به دقت رعایت شود. در غیر این صورت صدمات و آسیب‌های بافتی در محل تزریق ایجاد می‌شود که ممکن است در نتیجه تحقیق تأثیرگذار باشد (شکل ۴).



شکل ۲- موقعیت آناتومیکی عضله خلفی ران و تزریق در آن.

شکل ۳- تزریق داخل صفاقی در موش آزمایشگاهی.

اگر در هنگام آسپیره کردن، ماده زرد رنگ دیده شود نشان دهنده، وارد شدن سوزن به مثانه و اگر ماده سبز و یا قهوه‌ای رنگ دیده شود نشان‌دهنده وارد شدن سوزن به روده‌ها می‌باشد که در این صورت سرنگ و سوزن را باید عوض کرده، حتی‌الامکان حیوان نیز تعویض شود (۱، ۳، ۴، ۶، ۷، ۱۰).

تزریق داخل وریدی (IV)[1]

در این حالت بهتر است حیوان در حالت بیهوشی باشد. پس از ضدعفونی‌کردن دم حیوان، تزریق در داخل ورید دم صورت می‌گیرد. مقدار ماده مورد نظر ۰/۵-۰/۲ میلی‌لیتر و نمره مناسب سوزن، ۲۹-۲۷ می‌باشد. در صورت تزریق نادرست، محل تزریق متورم و پیستون در سیلندر سرنگ به سختی حرکت می‌کند. در صورت درستی کار، ماده مورد نظر براحتی در رگ دم به جریان می‌افتد (شکل ۵). از ورید صافن جانبی[2] نیز می‌توان برای تزریق داخل وریدی استفاده کرد (شکل ۶) (۱، ۴، ۶، ۷، ۱۱).

تزریق زیرجلدی (SC)[3]

حیوان را به روی شکم قرار داده و پس از ضد عفونی کردن محل تزریق، پوست پشت گردن را بلند کرده و تزریق را انجام می‌دهیم (شکل ۷). مقدار ماده تزریقی ۰/۲ میلی‌لیتر و سوزن نمره ۲۲، توصیه می‌شود (۱، ۴، ۶، ۷).

تزریق داخل پوستی (ID)

پس از چیدن موی قسمت گردن و یا کمر حیوان، محل تزریق را با پنبه الکل ضد عفونی کرده، سوزن را به صورت مماس با بدن در بین جلد فرو می‌بریم. مقدار ماده مورد نظر ۰/۱ میلی‌لیتر و نمره سوزن مناسب، ۲۹-۲۷ می‌باشد. در صورت درستی عمل، محل تزریق به اندازه یک عدس متورم می‌شود (شکل ۸) (۱، ۴، ۶، ۷).

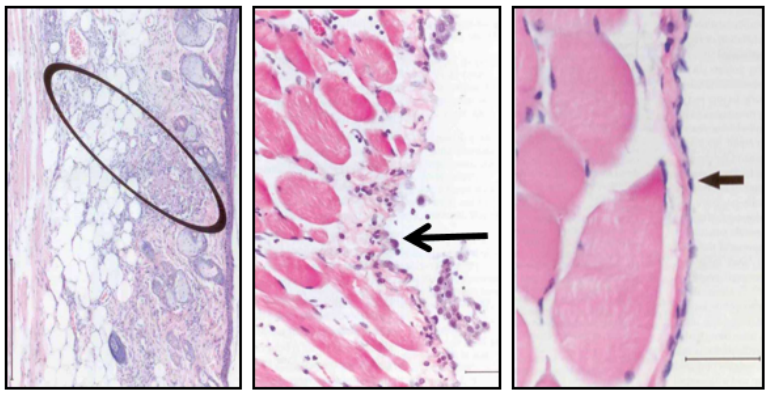
تزریق داخل مغزی[5]

جهت عبور مواد شیمیایی یا دارویی از سد خونی- مغزی[6] و رساندن مستقیم آنها به سیستم اعصاب مرکزی، از روش تزریق داخل‌مغزی استفاده می‌شود. این روش بیشتر در موش، رت و جوجه مورد استفاده قرار می‌گیرد. در موش و رت در نوزادان زیر ۳ روز صورت می‌گیرد.

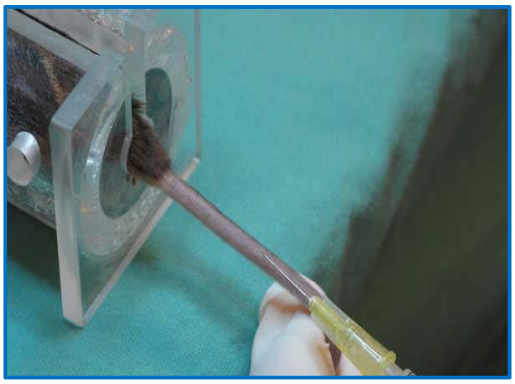
[1] Intravenous injection
[2] Lateral saphenous vein
[3] Subcutaneous injection
[4] Intradermal injection
[5] Intracranial injection
[6] Blood-Brain Barrier

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- محل تزریق داخل صفاقی (شکل سمت راست، در حالت طبیعی و قبل از تزریق، شکل وسط هیپرپلازی خفیف سلول‌های آماسی در محل تزریق در روش تزریق مناسب، شکل سمت راست، هیپرپلازی شدید سلول‌های آماسی در محل تزریق در روش تزریق نامناسب).



شکل ۵- تزریق داخل ورید دم موش آزمایشگاهی.

شکل ۷- تزریق زیرجلدی در موش آزمایشگاهی.

شکل ۶ – موقعیت آناتومیکی ورید صافن جانبی موش آزمایشگاهی.

برای انجام این تزریق، سر نوزاد را بین دو انگشت شست و نشانه قرار داده، سوزن با نمره ۲۷ را با زاویه ۴۵ درجه از سمت جلو در منطقه جلویی ملاج[1] وارد مغز می‌کنیم. مقدار تزریق نباید بیشتر از ۰/۵ میلی‌لیتر باشد. بعد از تزریق، نوزاد را به پیش مادر برده و تا یک ساعت باید تحت نظر قرار گیرد. بعضی اوقات مادر آن را قبول نمی‌کند و آن را از خود دور می‌کند. اگر از محل تزریق، خون آمده باشد، مادر ممکن است نوزاد را کشته، آن را بخورد. بهتر است برای جلوگیری از صدمات احتمالی و استرس زیاد، قبل از تزریق، نوزاد را بیهوش کرد. برای تزریق به بالغین، به یک فریم جامد با گیره مخصوص نیاز است که سر حیوان در آن قرار می‌گیرد و کاملاً بی‌حرکت می‌شود (شکل ۹). گرچه می‌توان بدون فریم نیز تزریق را انجام داد (شکل ۱۰)، بیهوشی نیز لازم می‌باشد.

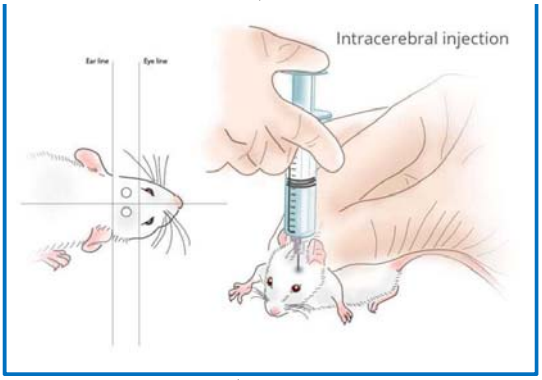
[1] Fontanelle

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۸- تزریق داخل پوستی در موش آزمایشگاهی.

شکل ۹- تزریق داخل مغزی در موش آزمایشگاهی بالغ، با استفاده از فریم.



شکل ۱۰- تزریق داخل‌مغزی در موش آزمایشگاهی بالغ، بدون استفاده از فریم.

حجم تزریق نباید بیشتر از ۲ ٪ حجم مغز باشد. تزریق باید به آرامی صورت گیرد (۱، ۴، ۶، ۷).

در نوزادان، تزریق در منطقه تالامیک[1] نیمکره‌های مغزی صورت می‌گیرد. خطوط زیگزاگ اتصال بین استخوانی در زیر پوست مشخص می‌باشند (شکل ۱۱، A). خطوط زیگزاگ میانی و افقی را مشخص نموده و نقطه تزریق را که در حد واسط آنها می‌باشد علامت‌گذاری کرده و سوزن را وارد می‌کنیم (شکل ۱۱، A و B) (۱، ۷). می‌توان برای مشخص کردن نقطه تزریق، از محل تلاقی خطوط زیگزاگ میانی و کورونال[2] نیز استفاده نمود که به این محل برگما[3] می‌گویند. پس از تعیین نقطه برگما، مناسب ترین نقطه تزریق، ۱ میلی‌متر در قسمت خلفی و ۲ میلی‌متر در قسمت جانبی آن می‌باشد (در شکل ۱۲ با علامت + مشخص شده است) (۱، ۷). عمق فرو بردن سوزن در مغز نباید از ۱/۵ میلی‌متر بیشتر باشد. در غیر این صورت صدمات وارده بسیار بیشتر می‌باشد. می‌توان با یک تکه فوم (یونولیت) که بر روی سوزن نصب می‌شود، اندازه ۱/۵ میلی‌متر را برای سوزن ثابت و تنظیم کرد (شکل ۱۳) (۱، ۷).

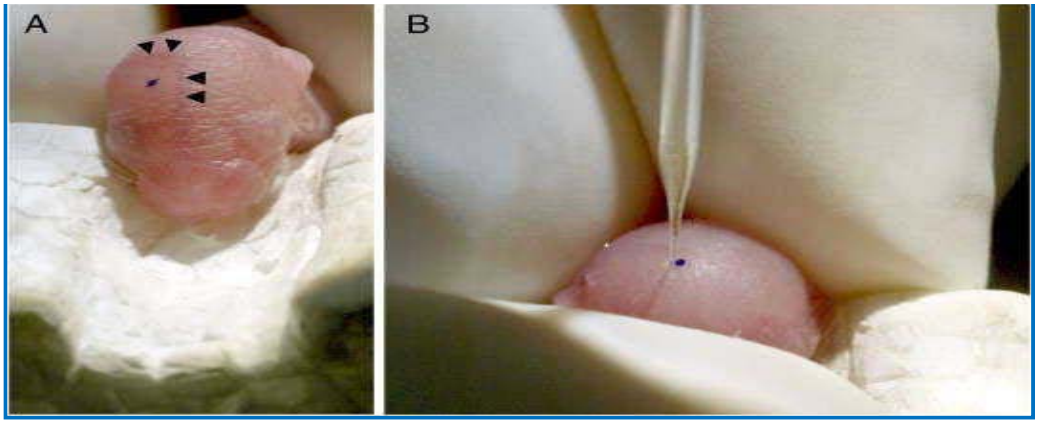
تزریق داخل بالشتک کف پا[4] و قاعده دم

جهت جذب آهسته بعضی از آنتی ژن‌ها، تزریق در داخل بالشتک کف پا و یا در قاعده دم صورت می‌گیرد. در جوندگان برای مدل آزمایشگاهی آرتریت موضعی یا عمومی، تزریق ادجوانت کامل فروند[5] در داخل بالشتک کف پا و یا در قاعده دم صورت می‌گیرد (شکل‌های ۱۴ و ۱۵). حیوان مبتلا به آرتریت بایستی در بستری نرم قرار گیرد و آب و غذای آن در داخل قفس و جلوی حیوان ریخته شود تا مجبور به حرکت نباشد (۱، ۴، ۵، ۱۱). باید توجه داشت که در تمام این تزریقات، بهتر است که حیوان بیهوش باشد و آسپیره کردن قبل از تزریق ضروری است (۱، ۴، ۶، ۷).

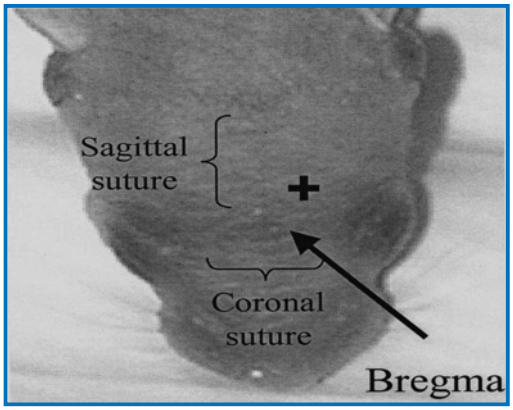
[1] Thalamic
[2] Coronal
[3] Bregma
[4] Footpad
[5] Freund's Complete Adjuant

www.SID.ir

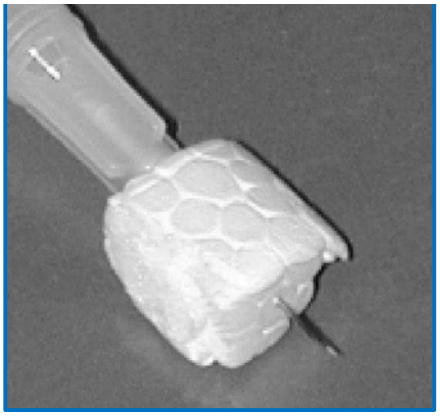
Archive of SID



شکل ۱۱- محل تزریق داخل‌مغزی در نوزاد موش آزمایشگاهی.



شکل ۱۲- محل تزریق داخل‌مغزی در نوزاد موش آزمایشگاهی.



شکل ۱۳- تنظیم میزان عمق تزریق سوزن با استفاده از یونولیت.

شکل ۱۴- شکل سمت راست:آرتریت ایجاد شده در بالشتک کف‌پای موش آزمایشگاهی شکل سمت چپ: حالت طبیعی.

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱۵- تزریق در قاعده دم موش آزمایشگاهی.

منابع

۱. فلاحی، ر؛ منصوری، م. ع. (۱۳۹۴). بیولوژی، پرورش، بیماریها و اصول کار کردن با حیوانات آزمایشگاهی. انتشارات موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی.

2. Bannerman, R. Hematology. In: Foster, H., Small, D., and Fox, J.G. The Mouse in Biomedical Research. Volume III. Academic Press, New York, NY. 1983.

3. Barthold, S.W., Griffey, S.M. and Percy, D.H. Pathology of laboratory rodents and rabbits, 4th ed. Wiley Blackwell. 2016.

4. Danneman, P.J., Suckow, M.A. and Brayton, C. The Laboratory Mouse, 2nd ed. CRC Press. 2012.

5. Ethics of research involving animals. Published by Nuffield Council on Bioethics, 28 Bedford Square London, WC1B 3JS. 2005.

6. UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals, 8th ed. Wiley-Blackwell. 2010.

7. Cunliffe-Beamer, T. Biomethodology and Surgical Techniques. In: Foster, H., Small, D., and Fox, J.G., eds. *The Mouse in Biomedical Research*, Volume III. Academic Press, New York. 1983.

8. Fish, R.R., Danneman, P.J., Brown, M. and Karas, A. Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals, 2nd ed. American College of Laboratory Animal Medicine. 2008.

9. Fox, J., Barthold, S, Davisson M., Newcomer, C. Quimby, F. and Smith, A. The mouse in biomedical research, 2nd ed. American College of Laboratory Animal Medicine. 2007.

10. Percy, D.H., Barthold, S.W. Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits, Iowa State University Press. 2007.

11. Hem, A., Smith, A.J., Solberget, P. Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink. Lab Anim, 1998. 32(4): p. 364-367.

www.SID.ir