

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، ویروولوژی، 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 موش‌های آزمایشگاهی انجام می‌گیرند، نیاز به بیهوش کردن آنها جهت انواع روش‌های تزریقات، خونگیری‌ها، جراحی و ... است، لذا لزوم به کارگیری و استفاده از داروهای مناسب بیهوشی و طبقه استفاده از آنها و معرفی انواع روش‌های استاندارد تزریقات در این حیوان آزمایشگاهی ضروری به نظر می‌رسد.

کلیدواژگان: بیهوشی، تزریقات، موش آزمایشگاهی

مقدمه

بیهوشی می‌باشد. انتخاب و طبقه استفاده از انواع داروها و معرفی انواع روش‌های استاندارد تزریقات، بر طبق رعایت موارد اصول اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد (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 شیشه‌ای و استفاده از اتروپین 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^۱ و بوپیواکائین^۲ در محل تزریق استفاده می‌شود. برای بیهوشی تزریقی، بسته به مدت زمان مورد نیاز بیهوشی، از دیاپام (۵ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم)، پنتوباریتال (۶۰-۵۰ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم)، کتامین هیدروکلراید (۷۵ میلی گرم به ازاء هر

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 اعضا، 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 میلیون‌ها سر موش آزمایشگاهی در تحقیقات گوناگون به مصرف می‌رسد. در کار عملی بر روی حیوانات آزمایشگاهی نظیر انجام روش‌های مختلف تزریقات، خونگیری‌ها، جراحی و ... نیاز به بیهوش کردن آنها با استفاده از داروهای مناسب

¹ Procaine
² Bupivacaine

برون ده قلبی منجر می‌شود. کتامین بر خلاف دیگر داروهای بیهوشی، نه تنها شلی عضلانی ایجاد نمی‌کند، بلکه توان عضلانی را افزایش می‌دهد. 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 می‌ماند، 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 آدرنژیک^۴ در سیستم اعصاب مرکزی و به دنبال آن کاهش میزان آزاد شدن نوراپی‌نفرین^۵ در اعصاب، به ایجاد آرام بخشی و بروز خواب آلودگی می‌انجامد. دیگر اثرهای این دارو، شامل شلی عضلانی، بی‌دردی و استفرغ در گوسفندان است. این دارو به وسیله کبد متابولیزه و از راه ادرار دفع می‌شود (۱، ۴، ۶، ۸، ۹).

کیلوگرم) همراه با زایلازین (با نام تجاری 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^۱؛ دز^۴ کتامین، ۸۰-۱۰۰ 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^۲ بر گیرنده‌های ان-متیل-دی-آسپارتیت^۳ اثر بیهوش کننده 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

تزریقات در موش آزمایشگاهی

روش‌های مختلف تزریق در موش آزمایشگاهی عبارت اند از:

تزریق داخل عضلانی (IM)^۶

پس از مقید کردن حیوان، تزریق در عضله خلفی ران^۷ 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)^۸

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 ضد عفونی کردن با الکل ۷۰٪ و

¹ Universities Federation for Animal Welfare

² Glutamate

³ N-Methyl-D-Aspartate

⁴ α₂ adrenergic

⁵ Norepinephrine

⁶ Intramuscular injection

⁷ Caudal thigh muscle

⁸ Intraperitoneal injection

کرده، حتی الامکان حیوان نیز تعویض شود (۱، ۳، ۴، ۶، ۷، ۱۰).

تزریق داخل وریدی (IV)^۱

در این حالت بهتر است حیوان در حالت بیهوشی باشد. پس از ضدعفونی کردن دم حیوان، تزریق در داخل ورید دم صورت می گیرد. مقدار ماده مورد نظر ۰/۵-۰/۲ میلی لیتر و نمره مناسب سوزن، ۲۷-۲۹ می باشد. در صورت تزریق نادرست، محل تزریق متورم و پیستون در سیلندر سرنگ به سختی حرکت می کند. در صورت درستی کار، ماده مورد نظر براحتی در رگ دم به جریان می افتد (شکل ۵). از ورید صافن جانبی^۲ نیز می توان برای تزریق داخل وریدی استفاده کرد (شکل ۶) (۱، ۴، ۶، ۷، ۱۱).

تزریق زیرجلدی (SC)^۳

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 می دهیم (شکل ۷). مقدار ماده تزریقی ۰/۲ میلی لیتر و سوزن نمره ۲۲، توصیه می شود (۱، ۴، ۶، ۷).

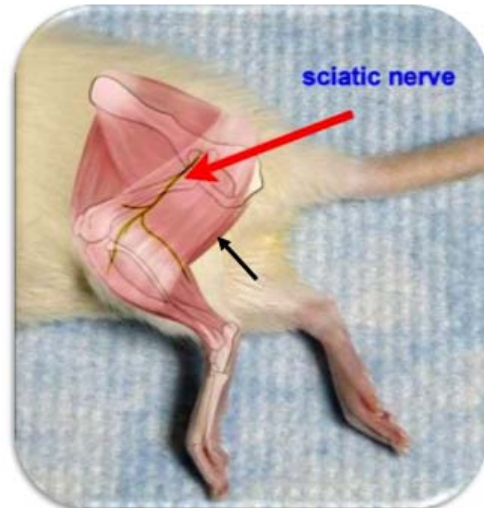
تزریق داخل پوستی (ID)

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

تزریق داخل مغزی^۵

جهت عبور مواد شیمیایی یا دارویی از سد خونی- مغزی^۶ و رساندن مستقیم آنها به سیستم اعصاب مرکزی، از روش تزریق داخل مغزی استفاده می شود. این روش بیشتر در موش، رت و جوجه مورد استفاده قرار می گیرد. در موش و رت در نوزادان زیر ۳ روز صورت می گیرد.

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



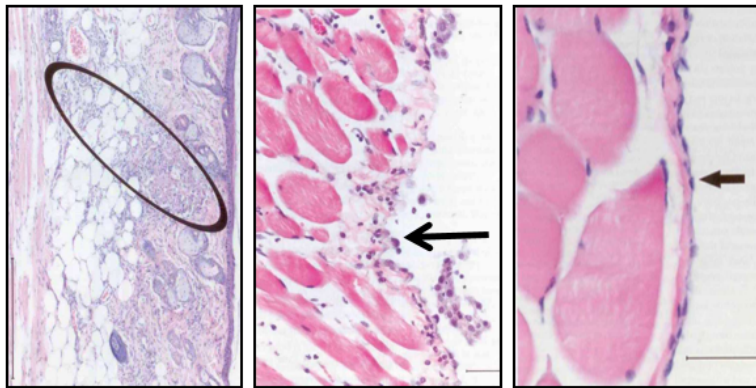
شکل ۲- موقعیت آناتومیکی عضله خلفی ران و تزریق در آن.



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 قهوه ای رنگ دیده شود نشان دهنده وارد شدن سوزن به روده ها می باشد که در این صورت سرنگ و سوزن را باید عوض

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



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 ۷- تزریق زیرجلدی در موش آزمایشگاهی.



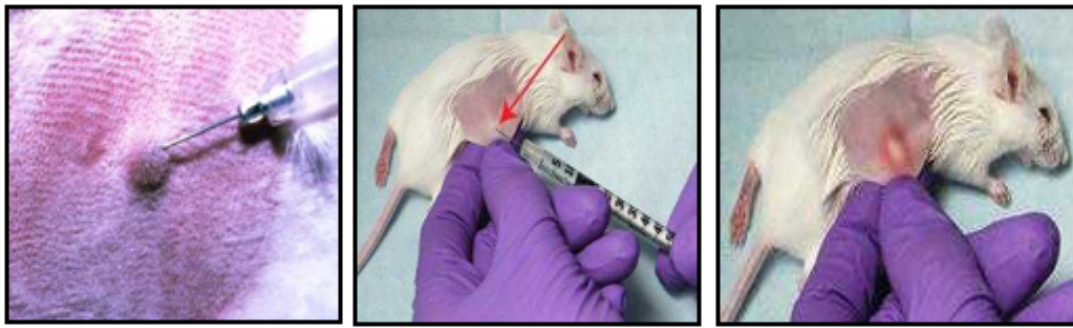
شکل ۵- تزریق داخل ورید دم موش آزمایشگاهی.

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 ملاحظه 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.



شکل ۶- موقعیت آناتومیک ورید صافن جانبی موش آزمایشگاهی.

¹ Fontanelle

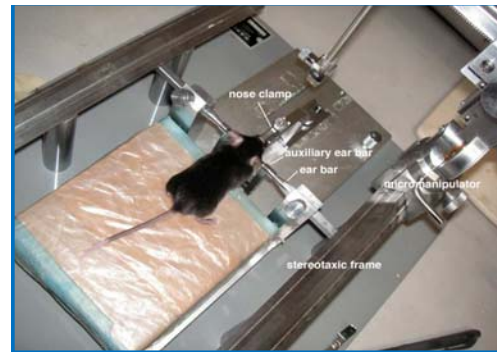


شکل ۸- تزریق داخل پوستی در موش آزمایشگاهی.

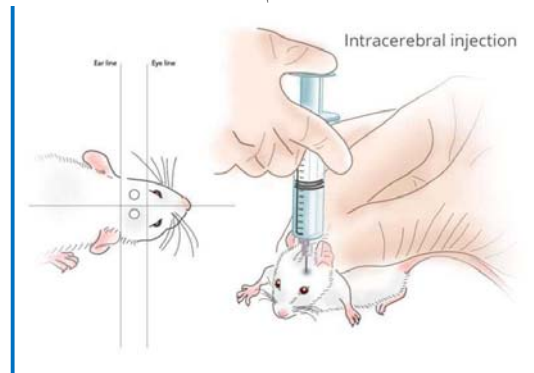
زیر پوست مشخص می‌باشند (شکل ۱۱، A). خطوط زیگزاگ میانی و افقی را مشخص نموده و نقطه تزریق را که در حد واسط آنها می‌باشد علامت‌گذاری کرده و سوزن را وارد می‌کنیم (شکل ۱۱، A و B) (۱، ۷). می‌توان برای مشخص کردن نقطه تزریق، از محل تلاقی خطوط زیگزاگ میانی و کورونال^۲ نیز استفاده نمود که به این محل برگما^۳ می‌گویند. 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^۴ 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^۵ 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).



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

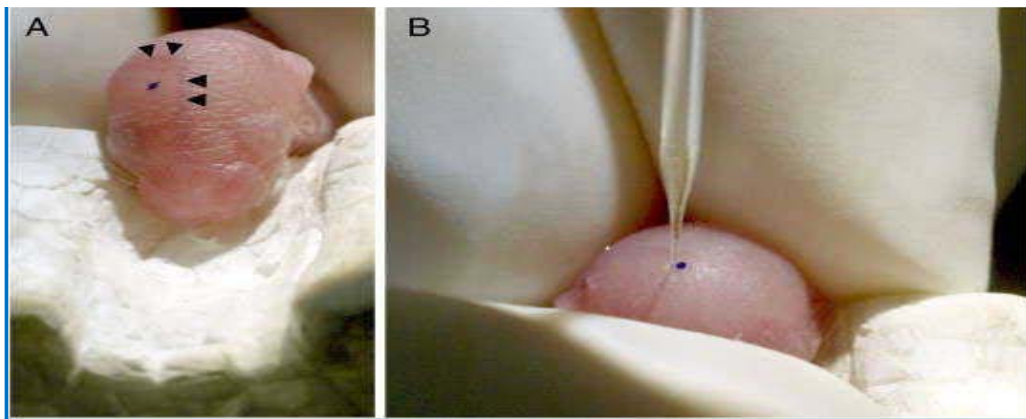


شکل ۱۰- تزریق داخل مغزی در موش آزمایشگاهی بالغ، بدون استفاده از فریم.

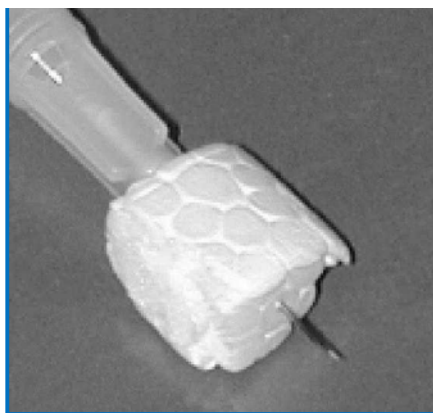
حجم تزریق نباید بیشتر از ۲٪ حجم مغز باشد. تزریق باید به آرامی صورت گیرد (۱، ۴، ۶، ۷).

در نوزادان، تزریق در منطقه تالامیک^۱ نیمکره‌های مغزی صورت می‌گیرد. خطوط زیگزاگ اتصال بین استخوانی در

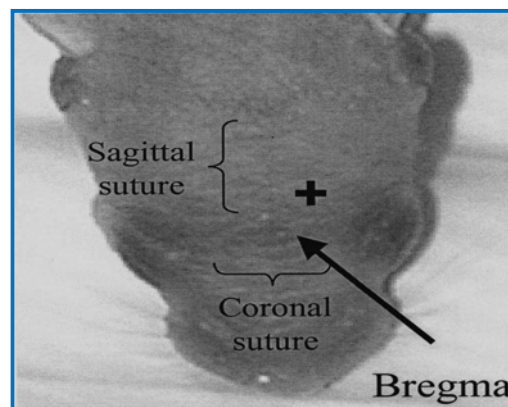
¹ Thalamic
² Coronal
³ Bregma
⁴ Footpad
⁵ Freund's Complete Adjuvant



شکل ۱۱- محل تزریق داخل مغزی در نوزاد موش آزمایشگاهی.



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



شکل ۱۲- محل تزریق داخل مغزی در نوزاد موش آزمایشگاهی.



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



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.