اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی

شماره جلسه		استاد مربوطه	زمان (ساعت)
۱	روش های در دست گرفتن و کنترل حیوانات	دکتر ناظمی	۴
۲	آشنایی با انواع حیوانات آزمایشگاهی آشنایی با شرایط استاندارد نگهداری و کار با حیوانات	دکتر امین	۴
۳	تشریح حیوانات و شناسایی با آناتومی حیوانات آزمایشگاهی	دکتر ناظمی	۴
۴	روش های مختلف بی هوشی حیوانات	دکتر ناظمی	۴
۵	روش های مختلف تجویز دارو	دکتر امین	۴
۶	اصول تعیین دوز و منحنی دوز-پاسخ	دکتر امین	۴
۷	روش های مختلف خونگیری	دکتر ناظمی	۴
۸	روش های نمونه برداری از بافت های مختلف	دکتر ناظمی	۴
۹	خصوصیات تولید مثلی و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی	دکتر ناظمی	۴
۱۰	آشنایی با مدل های حیوانی درد و افسردگی	دکتر امین	۴

جدول شماره ۱. زیر عناوین موضوعات (subtitle) به ترتیبی که قرار است ارایه شوند (در حد امکان هر چه بیشتر جزییات زیر عناوین مطالب را در اینجا ذکر کنید).	
۱	تاریخچه استفاده از حیوانات آزمایشگاهی
۲	آشنایی با انواع حیوانات آزمایشگاهی
۳	آشنایی با خصوصیات بیولوژیک موش صحرایی
۴	اصول اولیه کار ، حمل و جابجایی و مقید کردن حیوانات آزمایشگاهی
۵	انواع روش های بی‌هوش کردن حیوانات آزمایشگاهی
۶	انواع راه های تجویز داروها و عصاره های گیاهی
۷	انواع روش های خونگیری از حیوانات آزمایشگاهی (موش صحرایی)
۸	انواع روش های مهم بافت برداری از حیوانات
۹	روش های آسان کشی و معدوم کردن حیوانات آزمایشگاهی
۱۰	مسائل اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی
۱۱	مدل های حیوانی در علوم زیستی و پزشکی
۱۲	

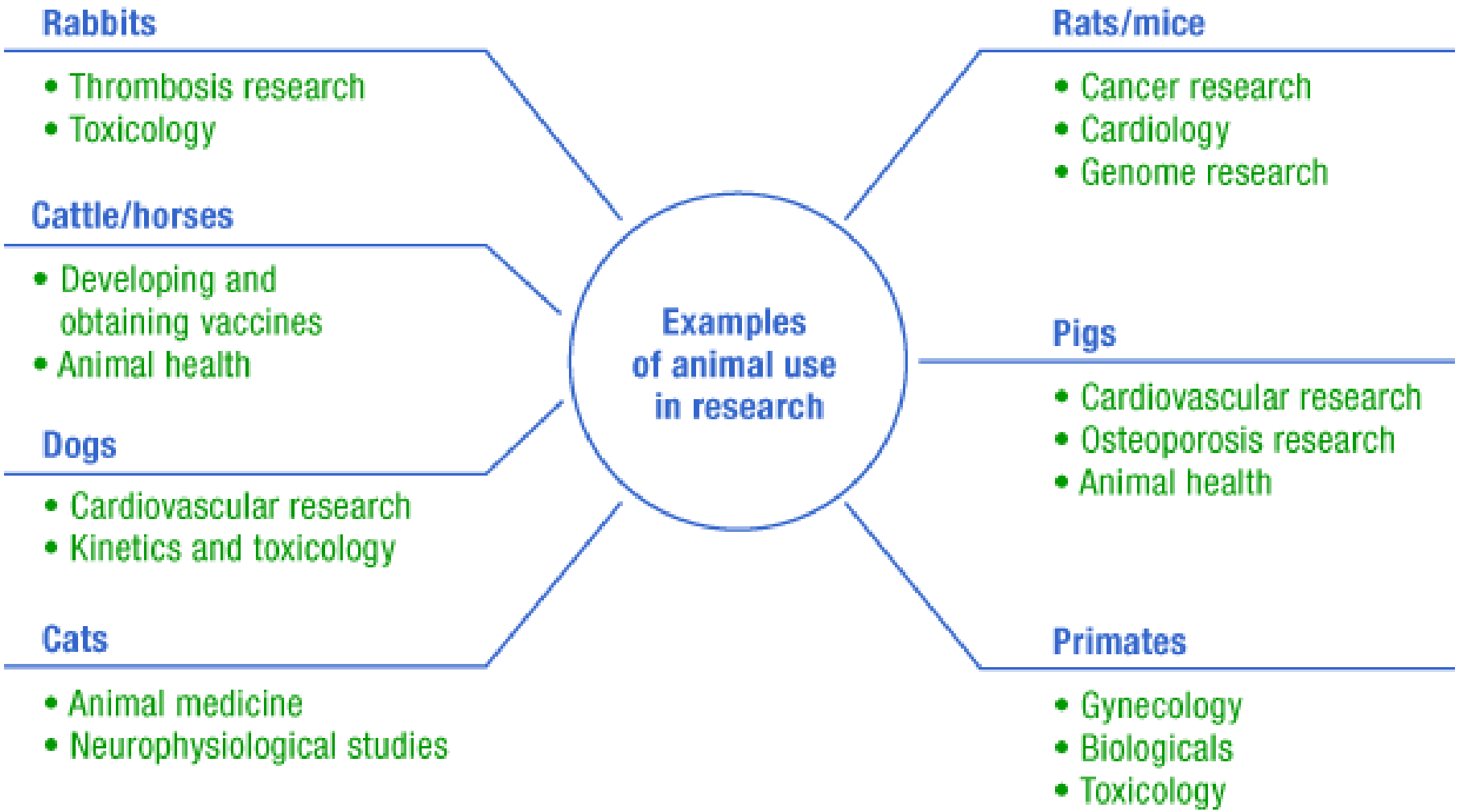
تاریخچه آزمایش بر روی حیوانات

- اولین مورد در قرن سوم و چهارم قبل از میلاد توسط آریستول پزشک یونانی
- استفاده از حیوانات در پژوهش به موازات پیشرفت علم پزشکی
- ظهور اسلام نقطه عطفی در پیشرفت علم پزشکی
- کاربرد حیوانات در اروپا بعد از رنسانس

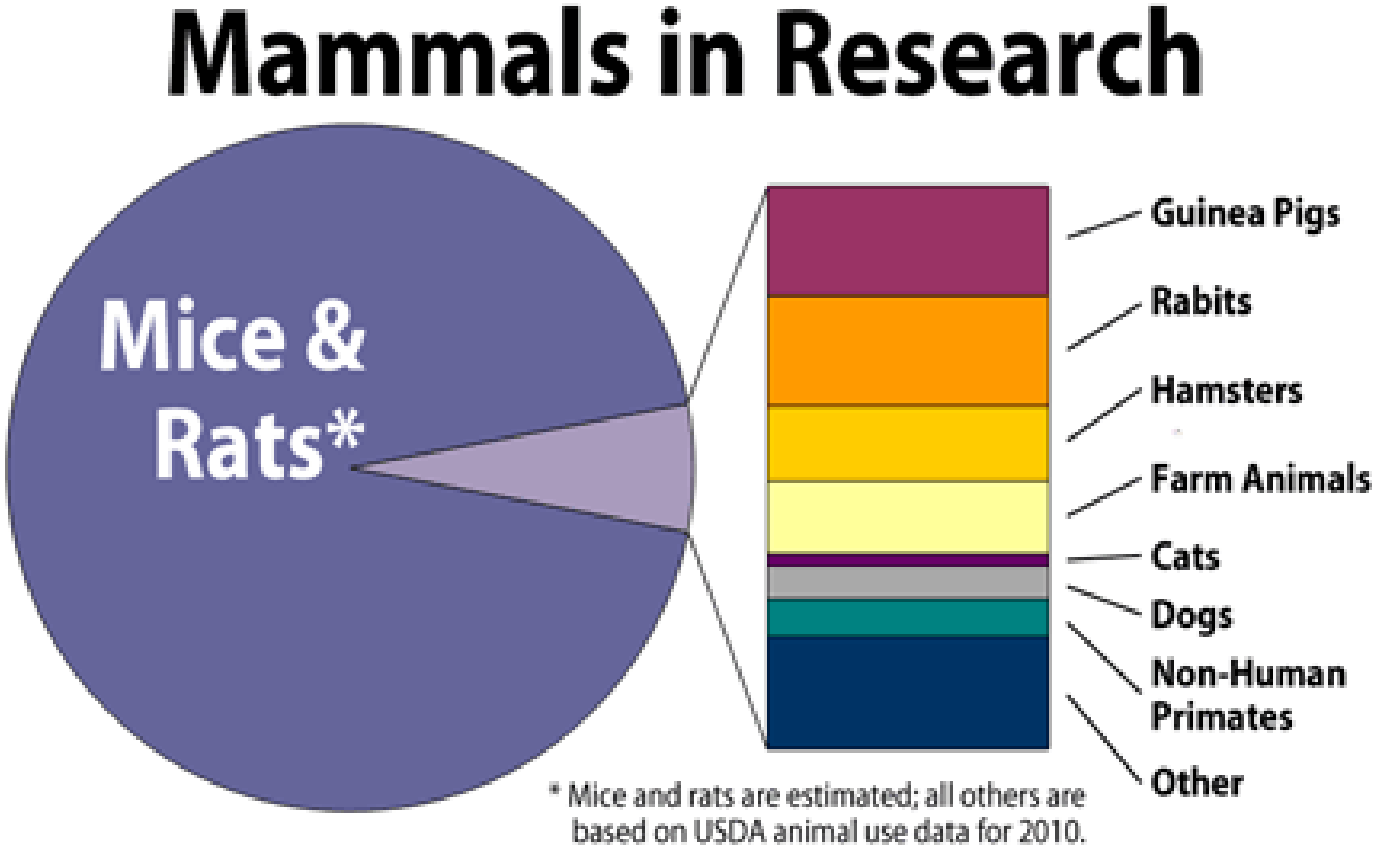
چرا محققان از حیوانات آزمایشگاهی استفاده می کنند؟

- مسائل اخلاقی مربوط به کار با انسان
- هزینه کمتر و دسترسی آسان
- اطمینان ازاثربخشی و ایمنی داروهای جدید، واکسن ها وتکنیک های جراحی
- کشف علل بیماریهای شدید و کشنده، راههای در مانی و طرق جدید پیشگیری از بیماریها
- ایجاد سریع مدل بیماری های مختلف در برخی از حیوانات آزمایشگاهی
- سالانه بیش از ۱۰۰ میلیون حیوان آزمایشگاهی در سراسر جهان مورد استفاده قرار می گیرند.

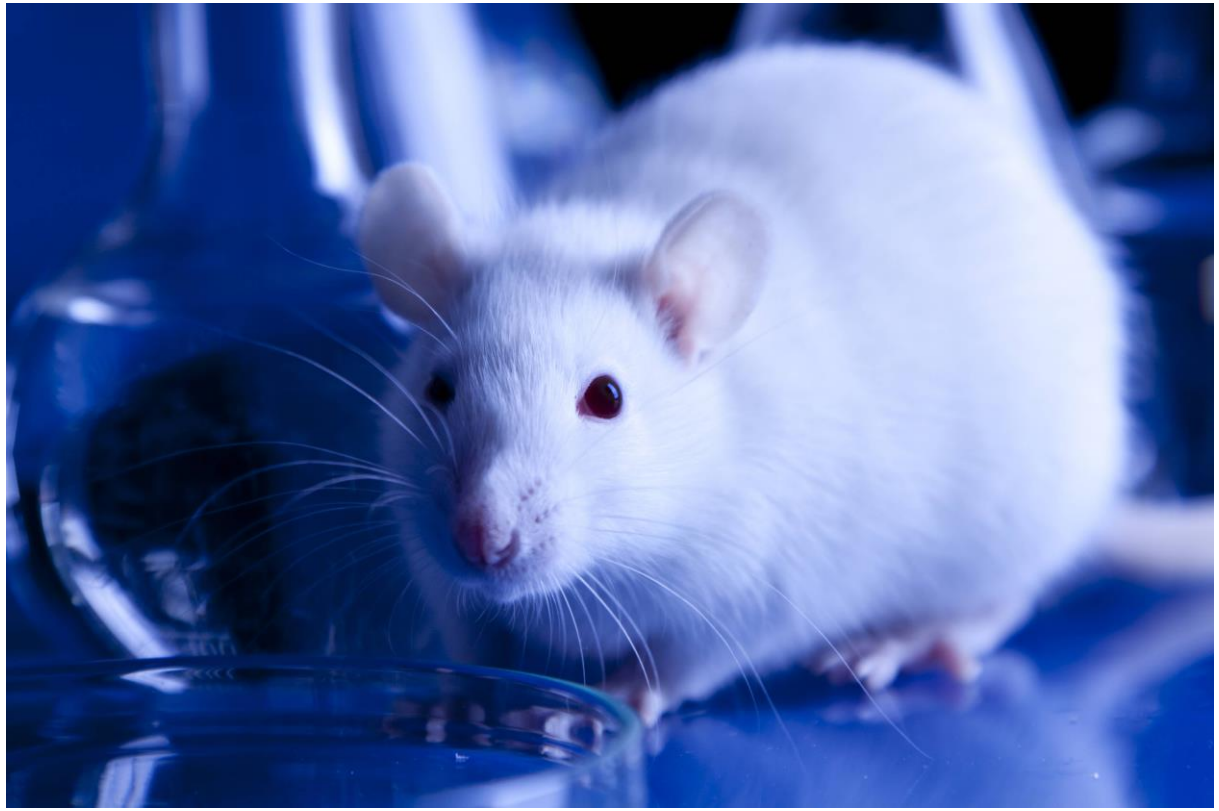
چه نوع حیوان آزمایشگاهی را انتخاب کنیم؟



انواع پستانداران در تحقیقات آزمایشگاهی



موش صحرایی (Rat)



موش سفید بزرگ آزمایشگاهی یا Rat Wistar

- دومین حیوان آزمایشگاهی مورد استفاده بعد از موش سوری
- رت های آزمایشگاهی در حقیقت نسل اهلی شده **Rattus norvegicus** می باشند.
- اختلافات بین رت های وحشی و آزمایشگاهی:
  - بلوغ جنسی زودرس
  - عدم وجود چرخه فصلی تولید مثلی
  - باوری بهتر
  - طول عمر کمتر
  - غدد هیپوفیز و آدرنال کوچک

خصوصیات بیولوژیک موش صحرایی (Rat)

جدول ۱-۴: ویژگی‌های فیزیولوژی رت

وزن نر بالغ	۳۰۰-۵۰۰ گرم
وزن ماده بالغ	۲۵۰-۳۰۰ گرم
عمر متوسط	۲/۳-۵ سال
حداکثر طول عمر	۵ سال
دمای بدن	۳۷/۵ درجه سانتی‌گراد
تعداد ضربان قلب	۳۰۰-۵۰۰ بار در هر دقیقه
تعداد کروموزوم (2n)	۴۲
مقدار مصرف آب در هر ۲۴ ساعت	۸-۱۱ میلی‌لیتر به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن
مقدار مصرف غذا در ۲۴ ساعت	۵ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن
زمان بلوغ	۱۰ ± ۵۰ روزگی
طول دوره بارداری	۲۱-۲۳ روز
تعداد نوزادان در هر زایمان	۸-۱۴ نوزاد
وزن نوزاد در هنگام تولد	۵-۶ گرم
زمان باز شدن چشم‌ها	۱۰-۱۲ روزگی
زمان گرفتن از شیر	۲۱ روزگی
تعداد نفس	۸۵ بار در هر دقیقه
حجم ادرار در ۲۴ ساعت	۵/۵ میلی‌لیتر به ازای هر ۱۰۰ گرم

خصوصیات تولید مثلی موش صحرایی
چرخه استروس (چرخه فحلی)

- استروس به معنای آمادگی حیوان ماده برای پذیرش حیوان نر و جفت گیری است.
- مراحل مختلف سیکل استروس:
  - دی استروس
  - پرواستروس
  - استروس
  - مت استروس

سیستم های مختلف جفت گیری در موش ها

- سیستم مونوگاموس
- سیستم تریوس
- سیستم حرمسرا
  - همزمان سازی سیکل های استروسی
  - وارد کردن یک موش نر به گروه، موجب استروسی شدن موش ها در عرض ۳ روز می شود و از طرف دیگر چرخه های استروسی آن ها را همزمان خواهد کرد.

ویژگی های حاملگی

- تشخیص وقوع جفت گیری در موش (واژینال پلاک)
- تشخیص آبستنی در موش ها (۲۱-۱۹)
- زایمان و نشانه های آن در موش ماده (لانه سازی)
- جلوگیری از خورده شدن نوزادان توسط مادر (تامین غذا وآب)
- شیردهی به نوزادان (۲۱ روز)
- تعیین جنسیت در موش ها

شرایط استاندارد نگهداری موش صحرایی

- فضای کافی و مناسب
- سیکل روشنایی/تاریکی: ۱۲-۱۲
- شدت نور: ۴۰۰ -۳۰۰ لوکس
- دما: (۲۶-۱۹)
- رطوبت: (۷۰-۳۰)
- تهویه مناسب: ۱۰ تا ۱۵ بار در ساعت
- شدت صوت: حداکثر ۸۵ دسی بل

روش های در دست گرفتن جابجایی و کنترل حیوانات

- ایمنی
- حمل و گروه بندی
- علامت گذاری
- آشنا سازی
- جابجا کردن
- مقید کردن

روش های در دست گرفتن جابجایی و کنترل حیوانات

- ایمنی
- حمل و گروه بندی
- علامت گذاری
- آشنا سازی
- جابجا کردن
- مقید کردن

نکات ایمنی در کار با حیوانات

- خطر گاز گرفتگی: استفاده از دستکش و محافظ
- آلرژی: به خصوص به ادرار رت های نر، استفاده ماسک و تعویض مرتب ماسک
- بیماری های مشترک بین دام: شستشوی مرتب دست
- تهویه مناسب فضای نگهداری
-

آشنا سازی (Training & Familiarization)

- حیوانات با فرد آزمایشگر ارتباط برقرار می کنند
- بو
- صدا
- رنگ
- نحوه برخورد
- خودداری از استرس و عجله در برخورد با حیوان
- مهارت کافی در برخورد با حیوان

گروه بندی و نگهداری

- باکس های تمیز و مناسب
- تعداد مناسب
- دسترسی مناسب به آب و غذای کافی
- شستشوی آسان و مطمئن

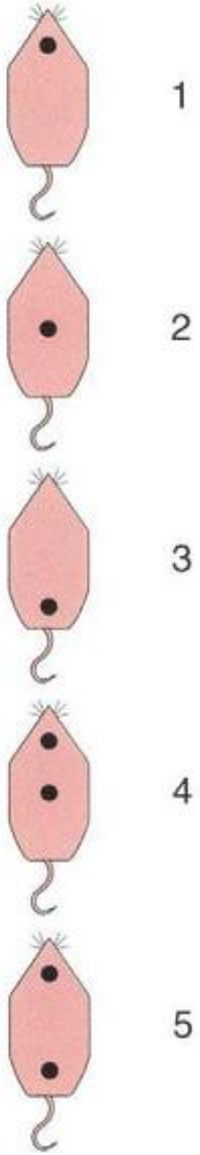
Table 4.2 Conditions for the sterilization or disinfection of husbandry materials

Material	Pressure (kPa)	Temperature (°C)	Sterilization time (min)	Comments
Cages	100 (1 bar)	105	20	Disinfects. Heat resistance needs to be checked
	200 (2 bar)	121	30	Sterilizes. Heat resistance needs to be checked
Racks (metal)	200 (2 bar)	121	30	Sterilizes. Heat resistance of the wheels needs to be checked
Water	200 (2 bar)	121	45	Cool slowly
Sawdust	300 (3 bar)	135	30	

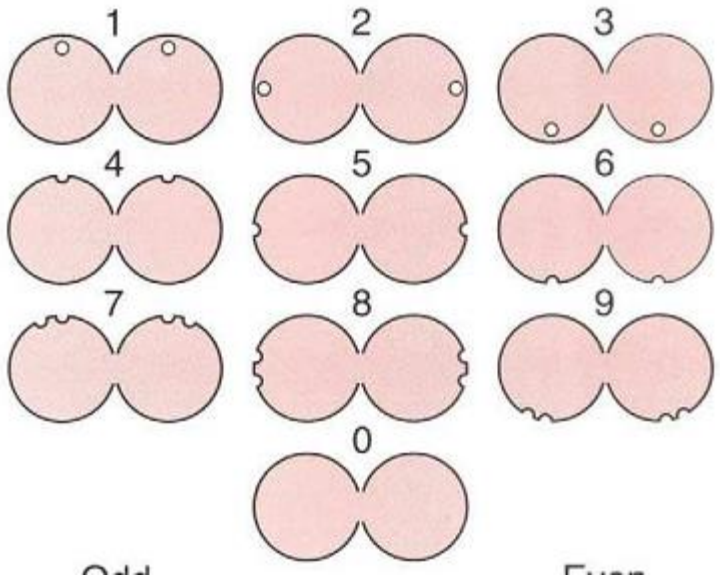
حمل و نقل و گروه بندی

- برای برداشتن حیوان با رعایت احتیاط می توان از دم استفاده کرد.
- برای حمل و نقل موش ها در مسافت های کوتاه، می توان از یک قفس تمیز یا یک کارتن مقوایی استفاده کرد. در مسافت های طولانی هم، از کارتن مقوایی استفاده می شود که داخل این کارتن با ماده ای که در برابر رطوبت نفوذناپذیر باشد، پوشانده می شود. در کارتن حداقل باید 2 منفذ در 2 دیواره روبروئی، به منظور تهویه هوای داخل قوطی ایجاد شود.غذا هم به صورت پلت در دسترس حیوانات قرار می گیرد و برای تأمین آب مورد نیاز می توان از قطعات سیب زمینی، سیب، و یا ژل های آماده استفاده کرد.

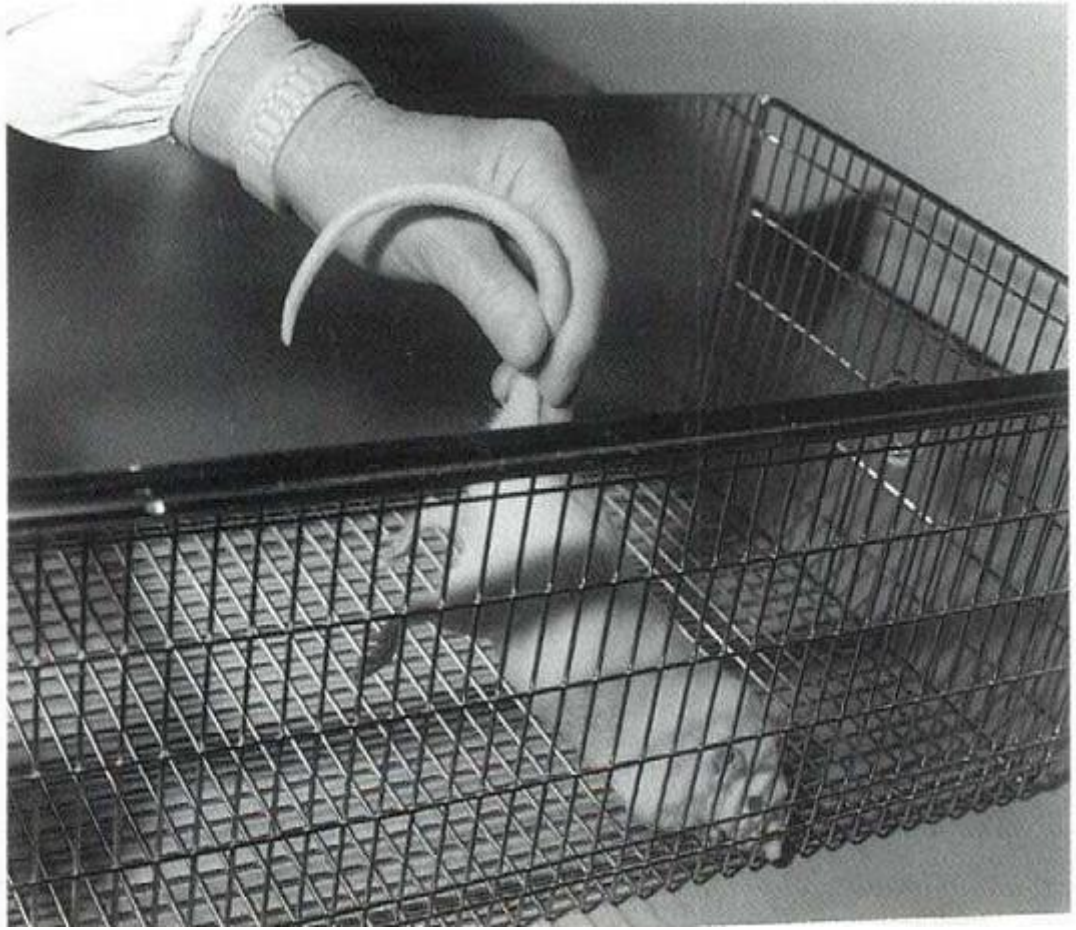
علامت گذاری موش ها



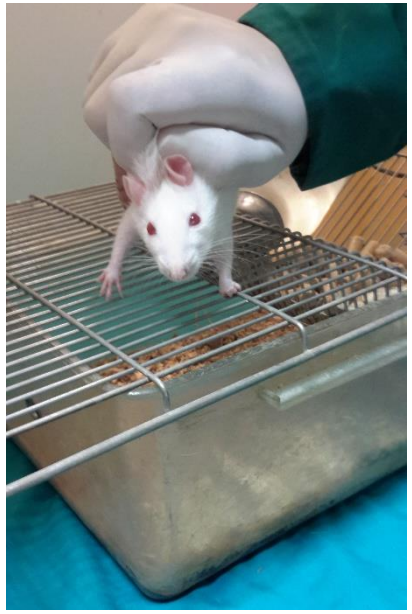
- **الف) روش علامت گذاری دائمی**
- در این روش از خالکوبی بر روی دم یا پنجه پا استفاده می شود،
- تگ کردن یا سوراخ کردن گوش
- **ب)روش های علامت گذاری موقتی**



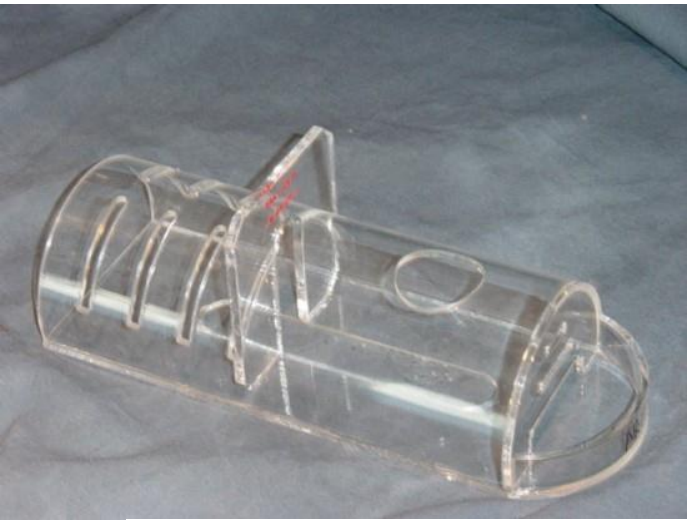
جابجا کردن مناسب حیوان Handling

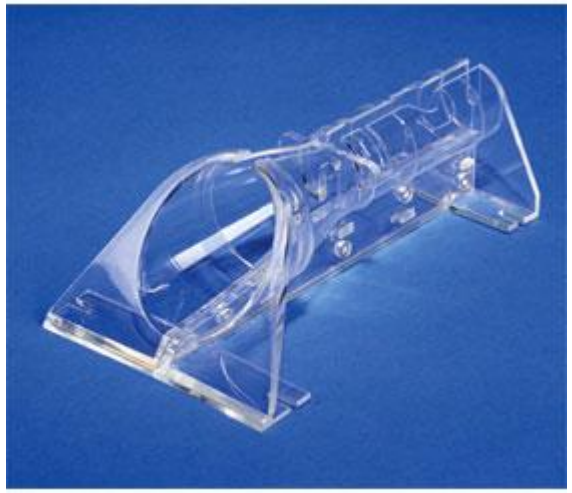


مقید کردن (Restraint) صحیح حیوانات با دست

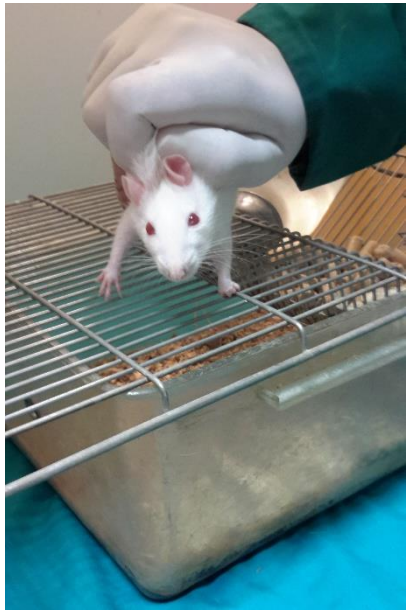


مقید کردن با استفاده از مقید کننده ها

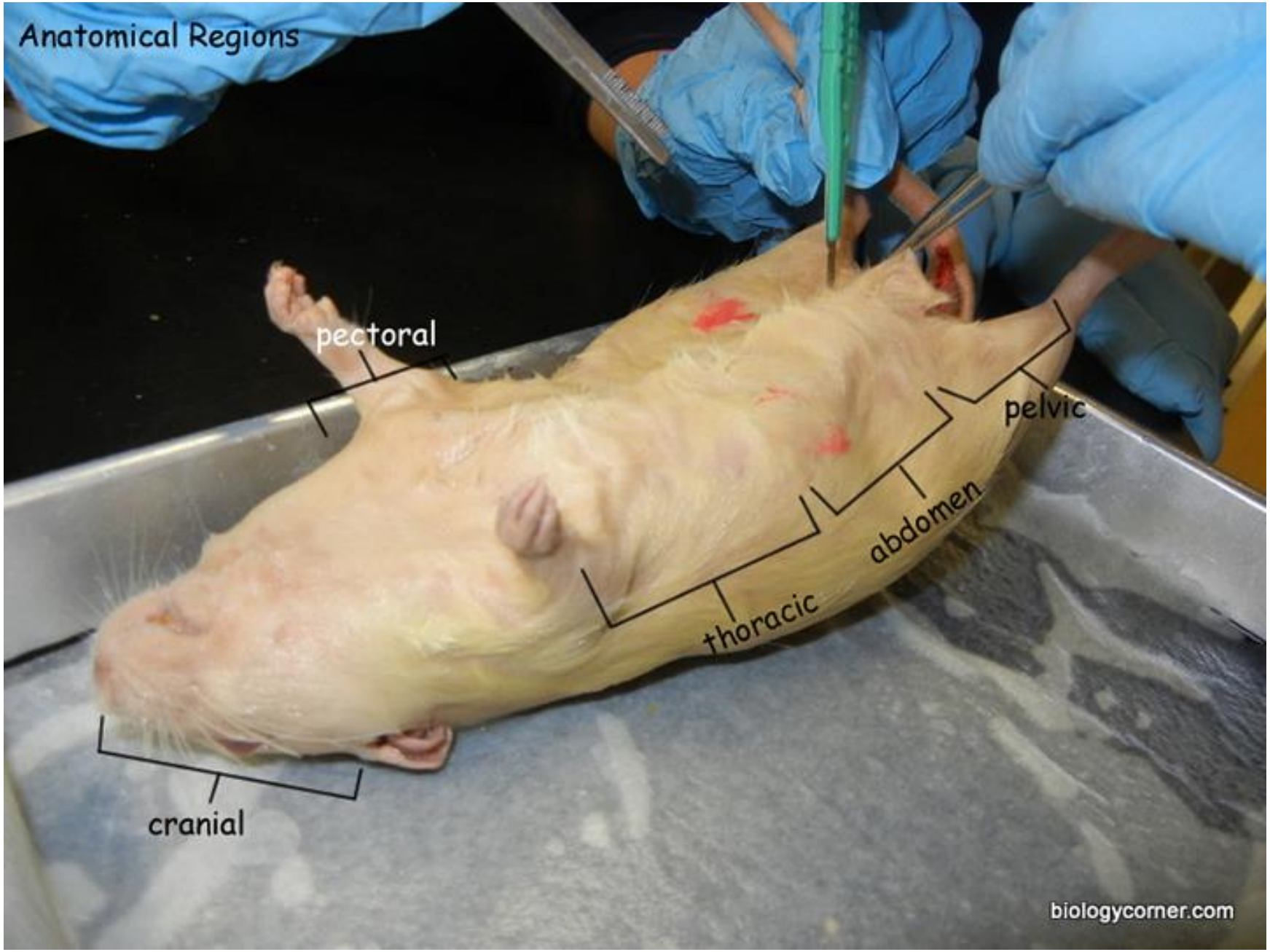




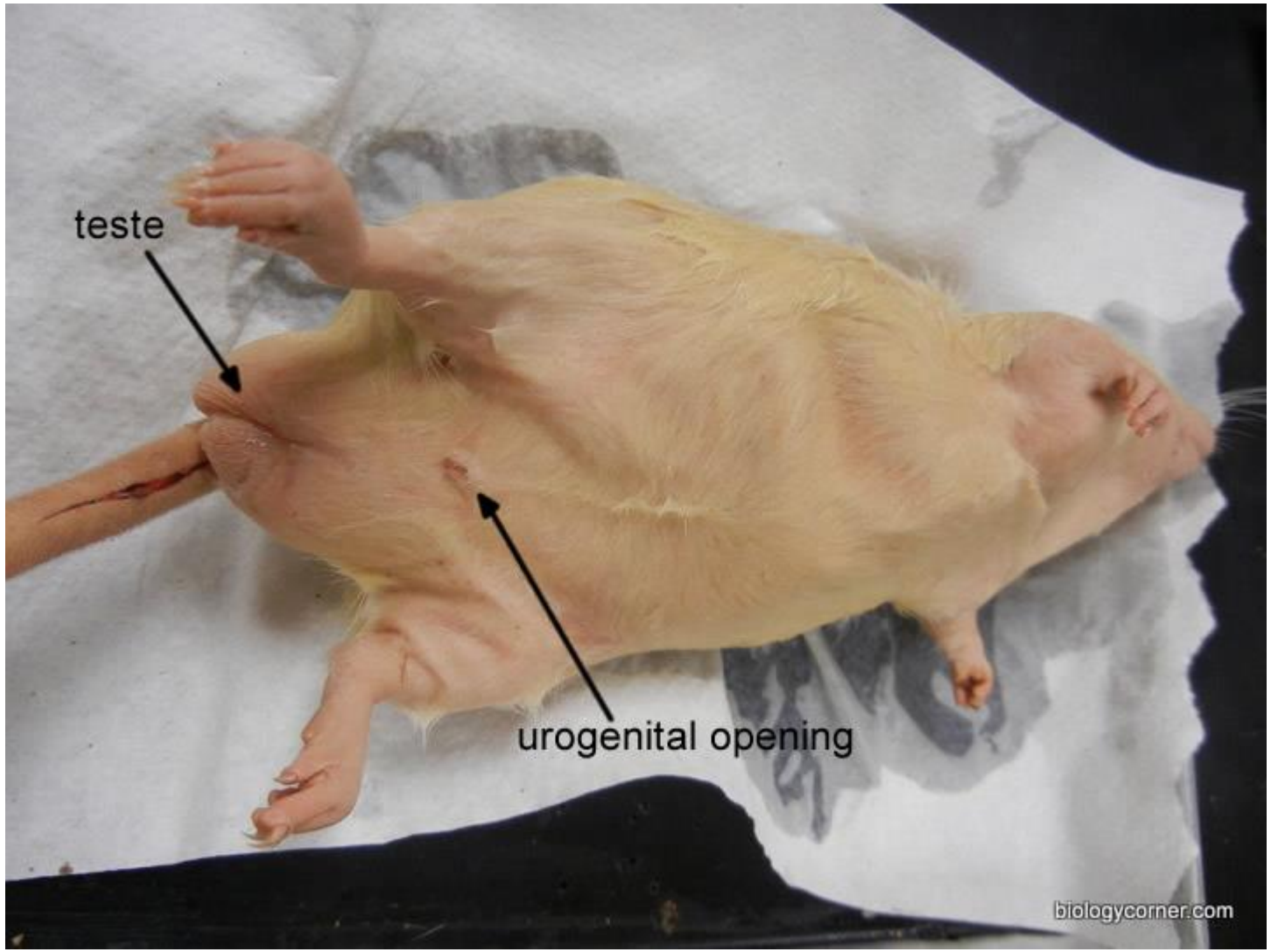
مقید کردن (Restraint) صحیح حیوانات با دست



آشنایی با تشریح وآناتومی موش صحرایی


Anatomical Regions
pectoral
pelvic
abdomen
thoracic
cranial
biologycorner.com

vibrissae (whiskers)


teste
urogenital opening
biologycorner.com

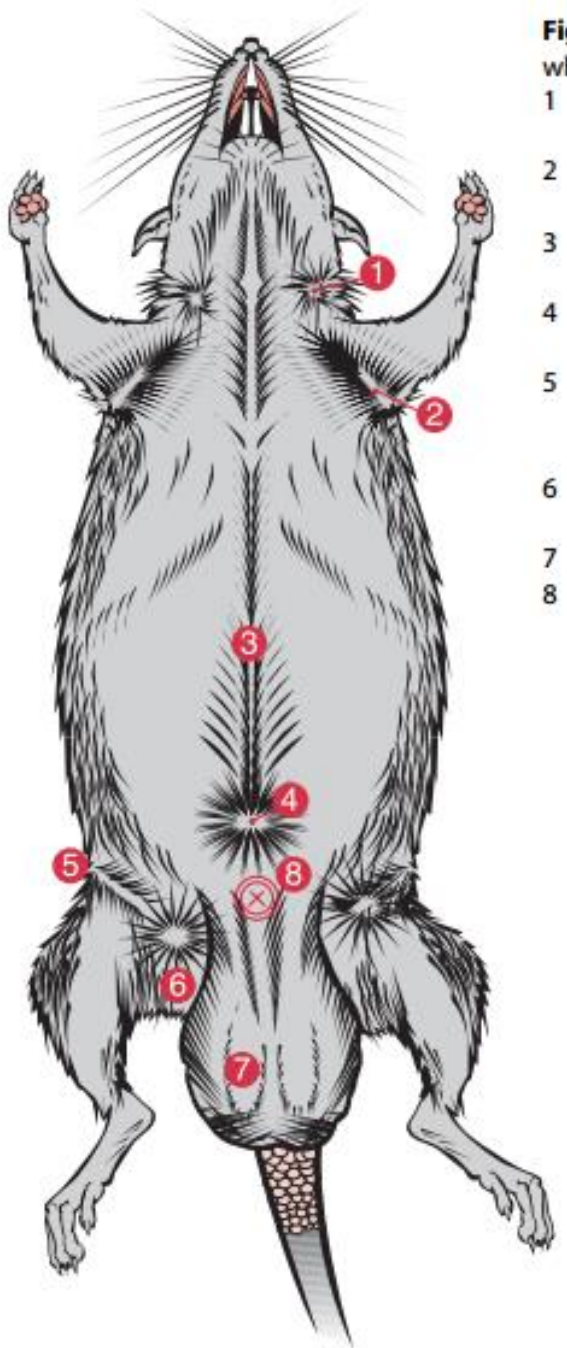


Fig
whi
1

2

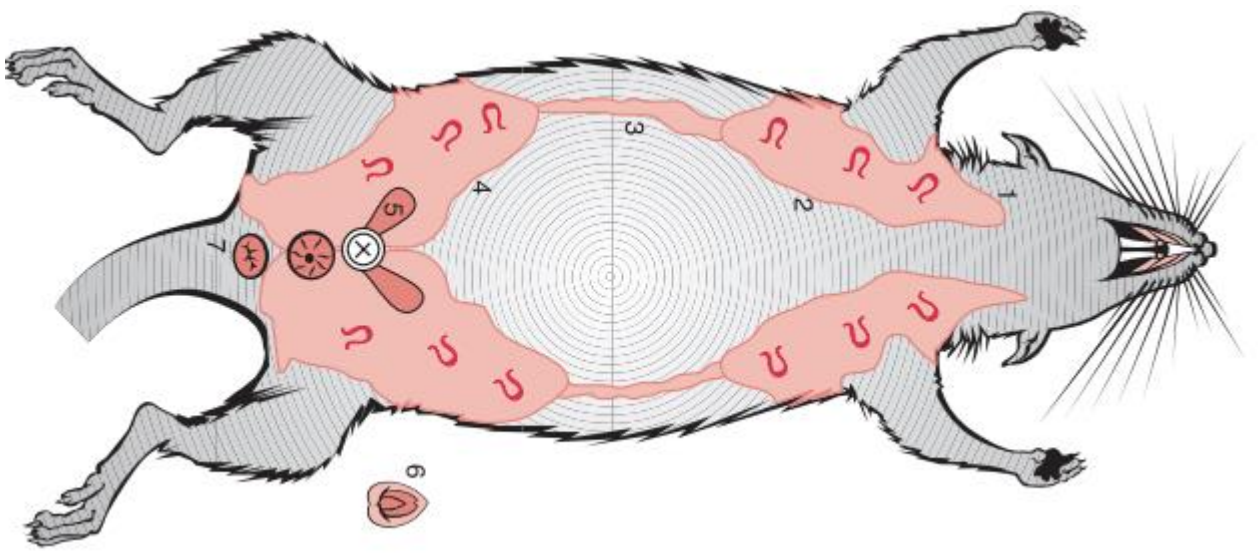
3

4

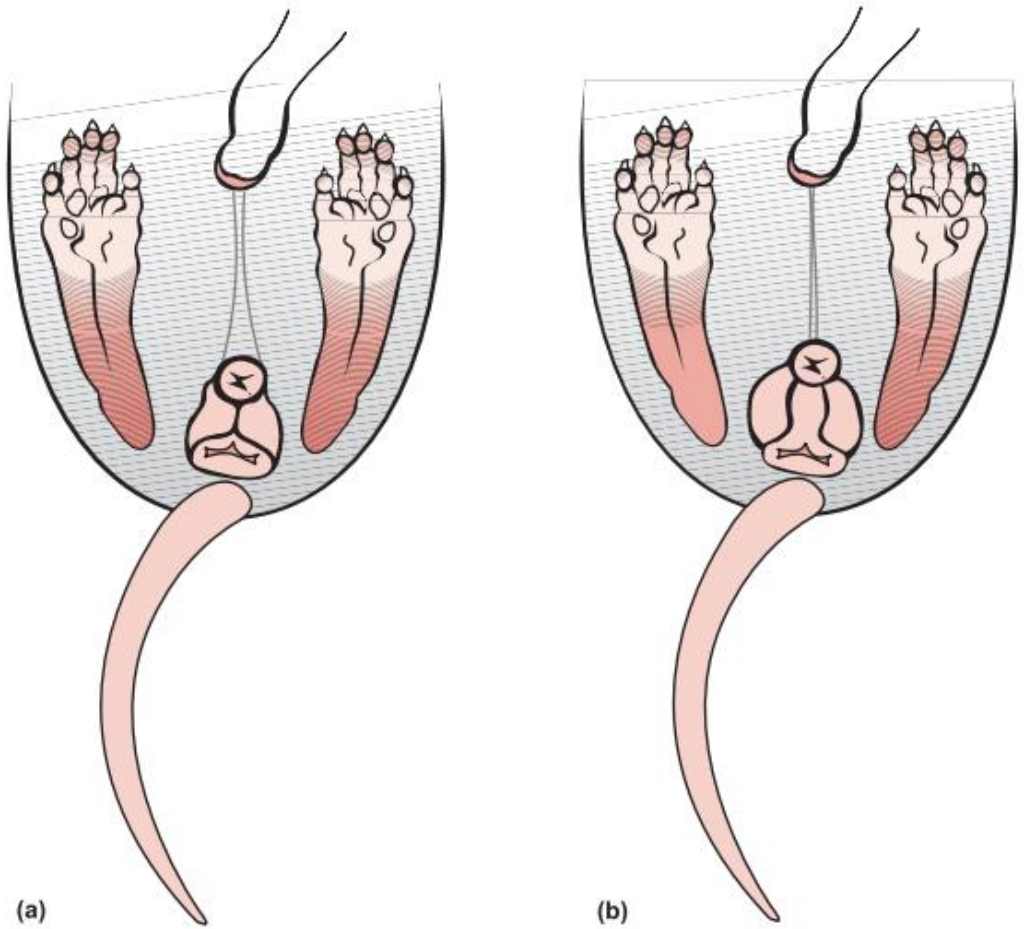
5

6

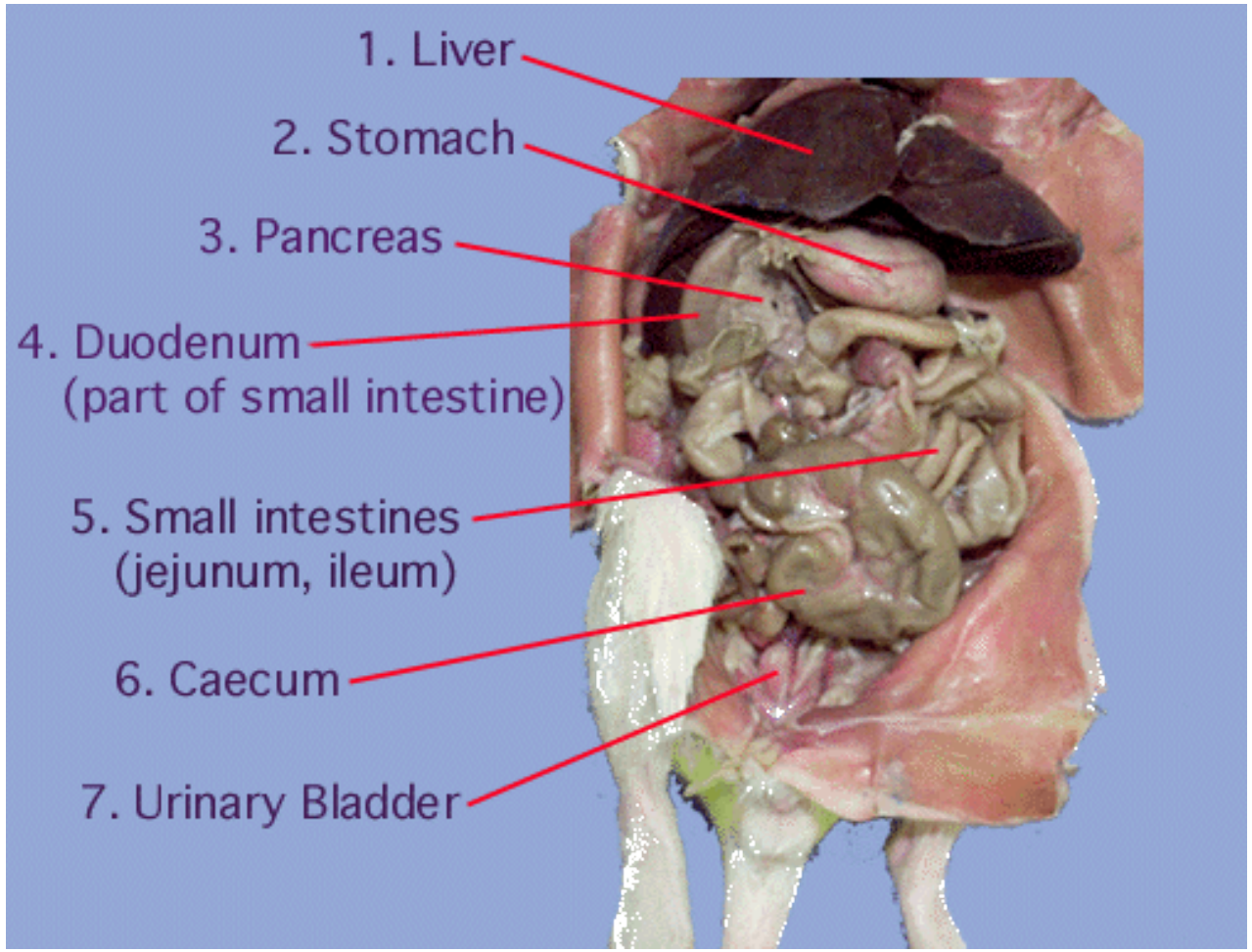
7
8



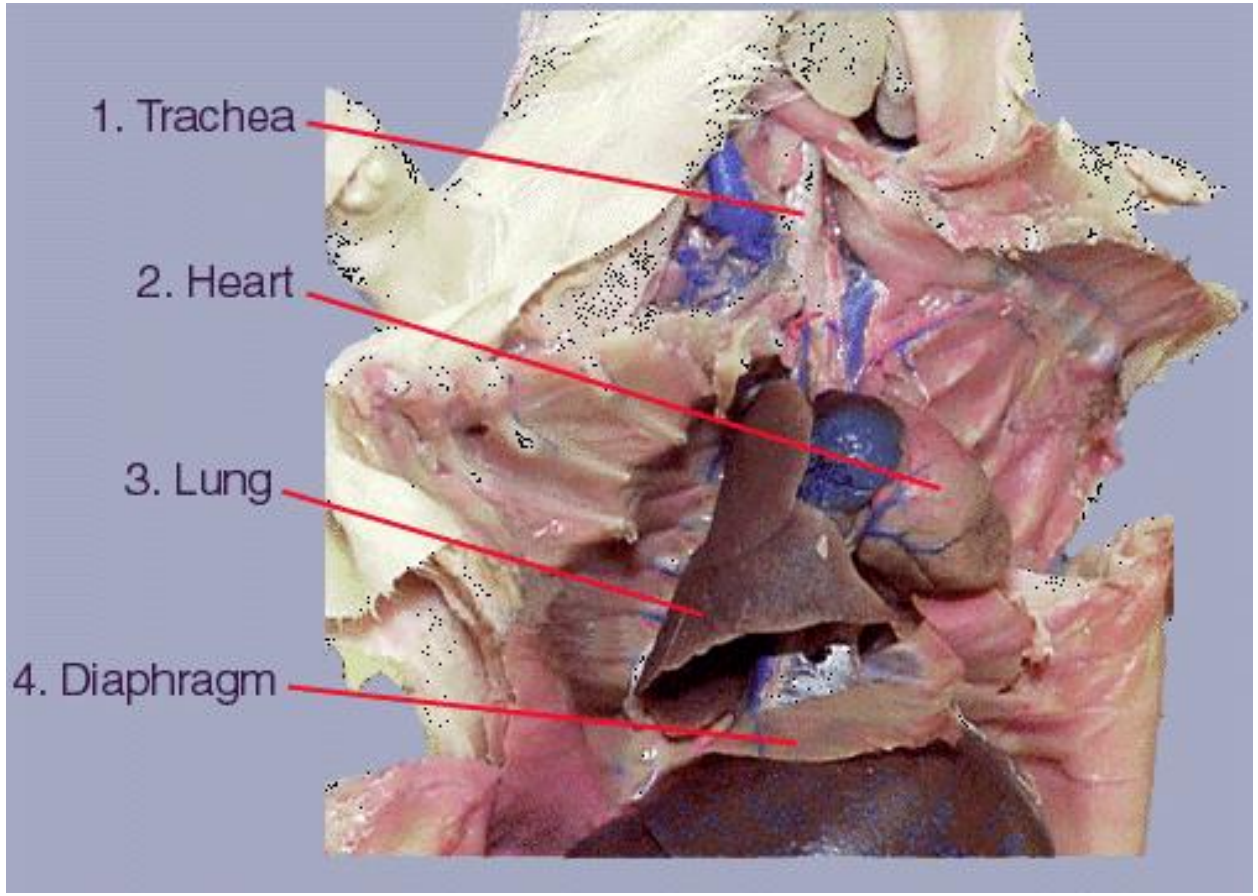
تعیین جنسیت در نوزاد موش صحرایی



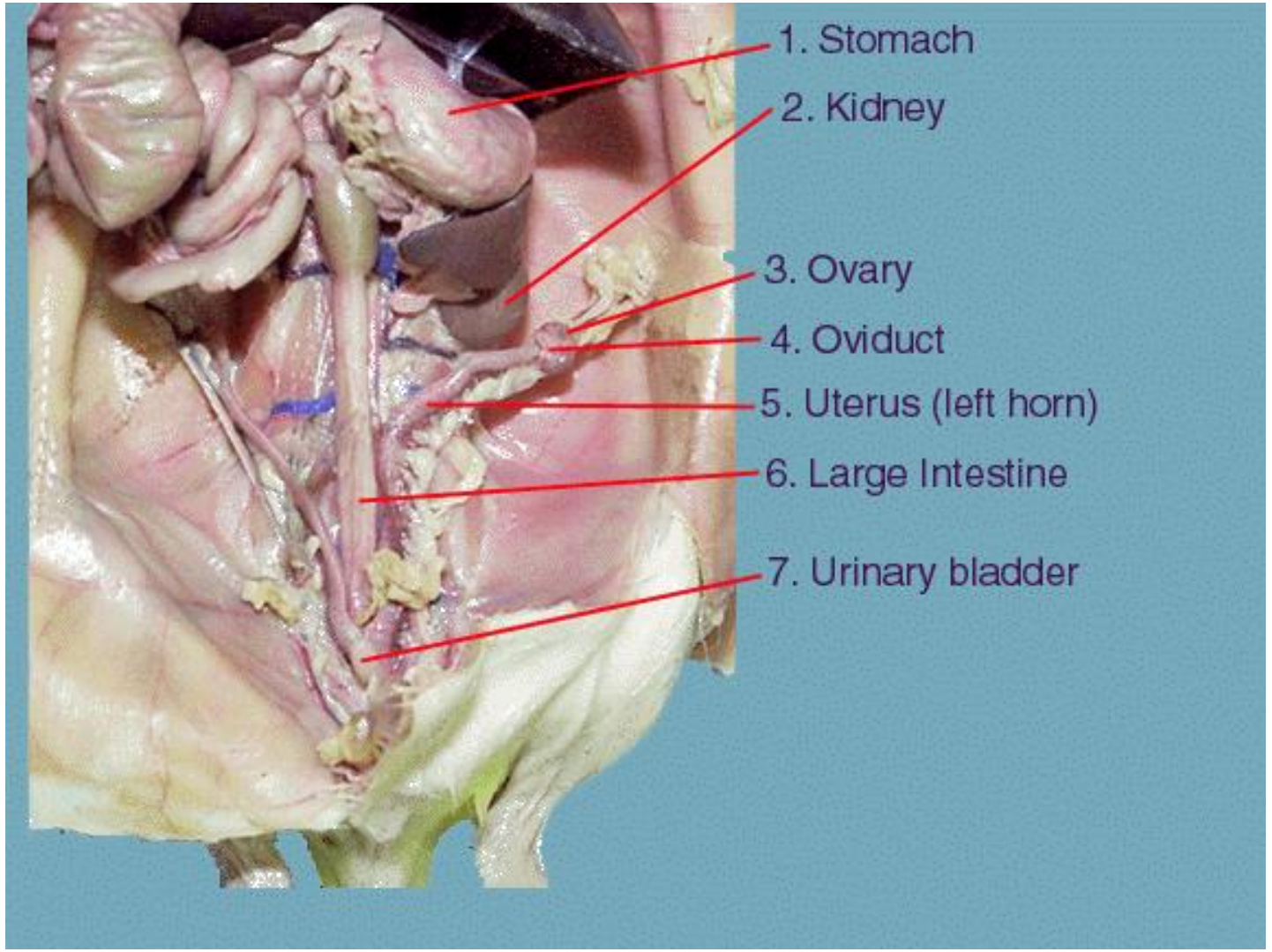
اندام های مهم حفره شکمی

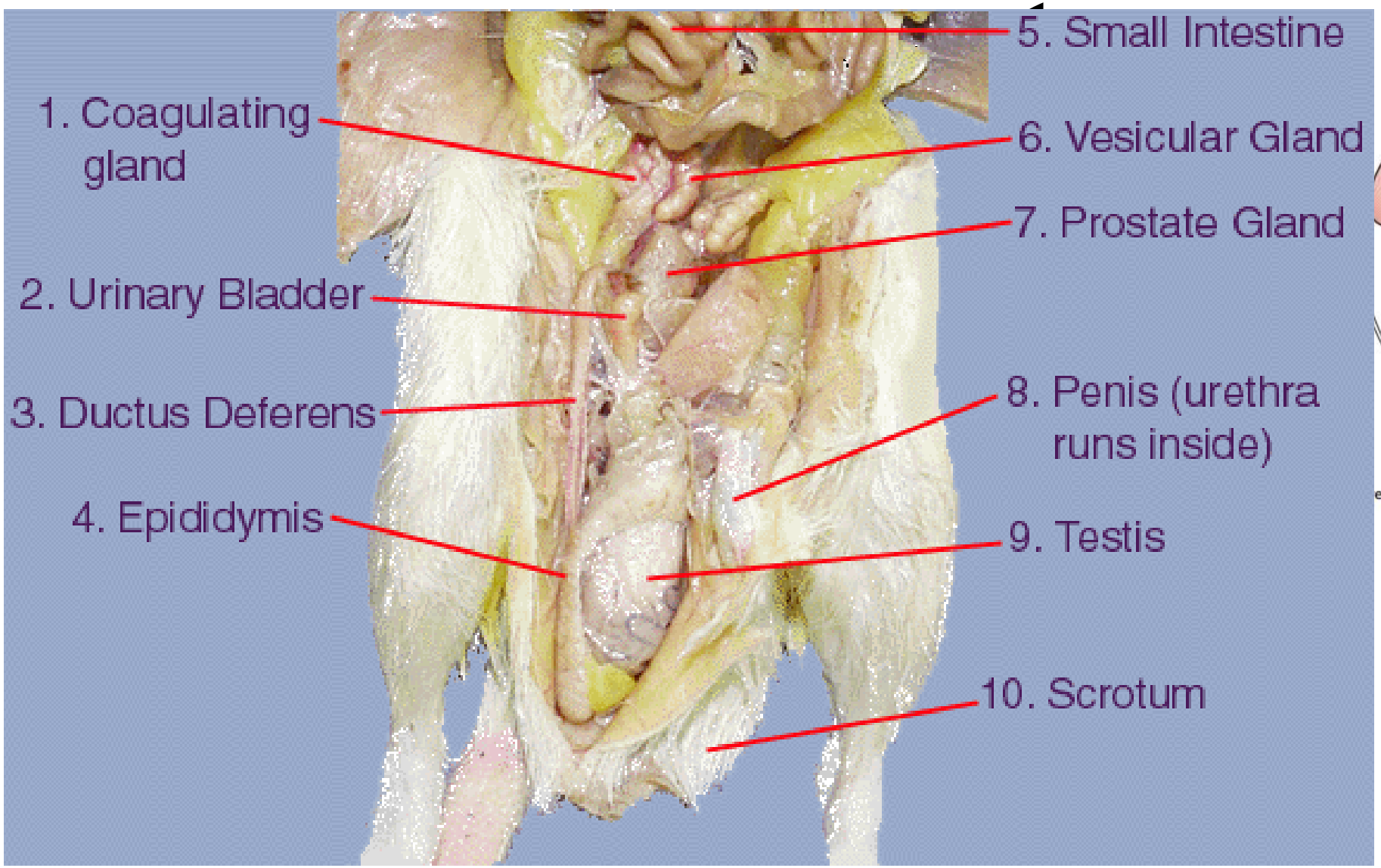


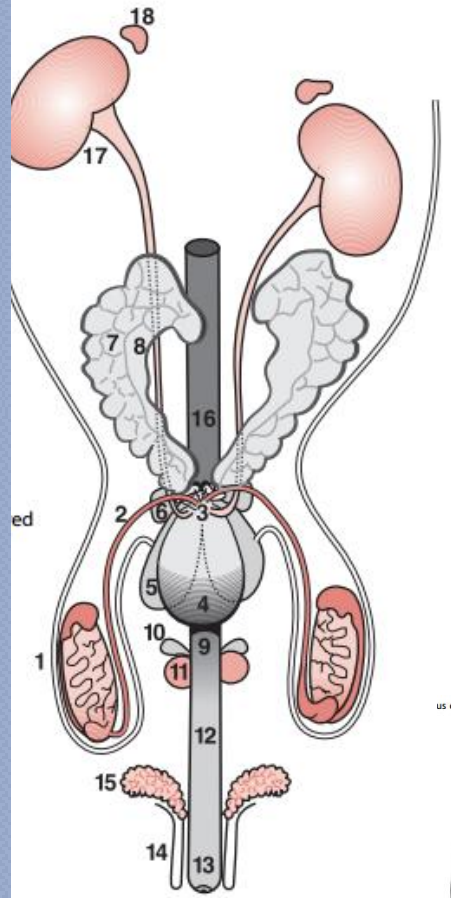
اندام های مهم قفسه سینه

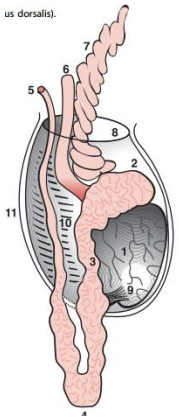


دستگاه تولید مثلی ماده

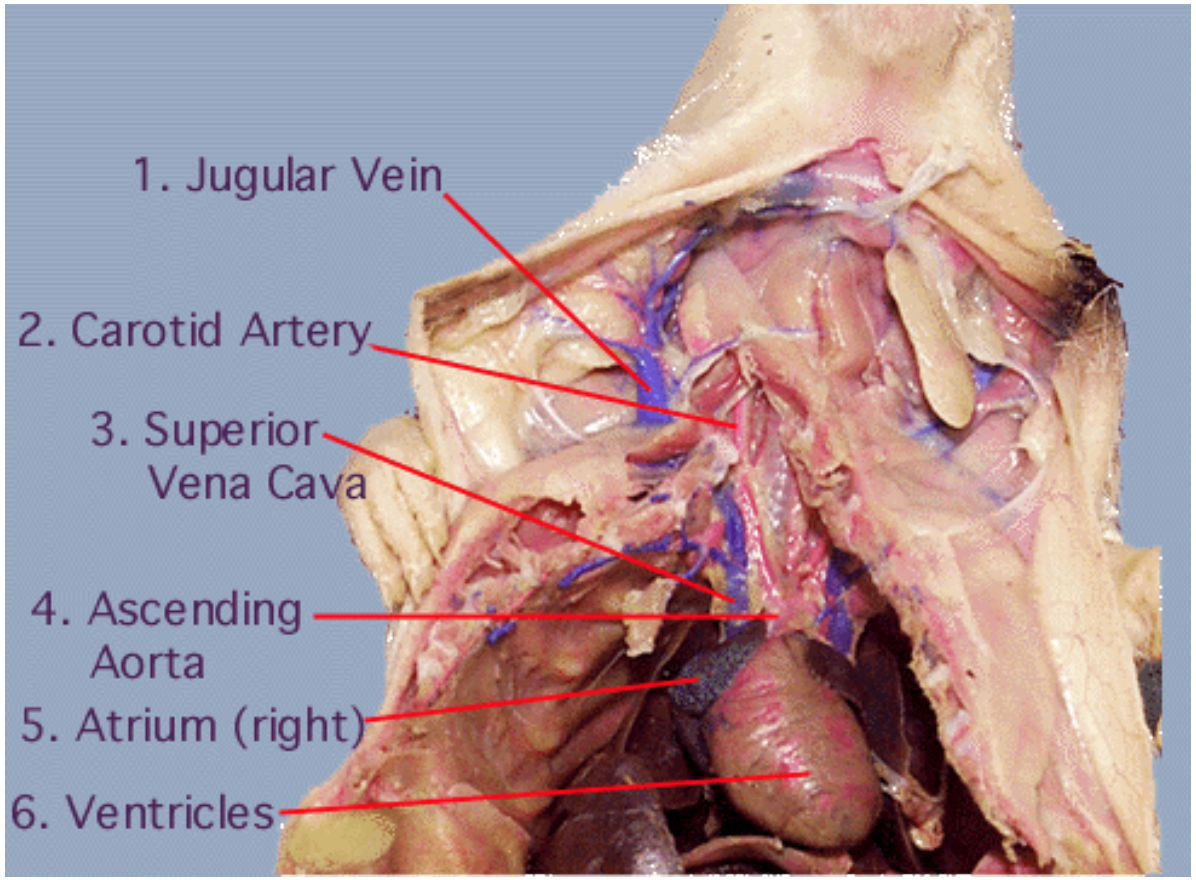


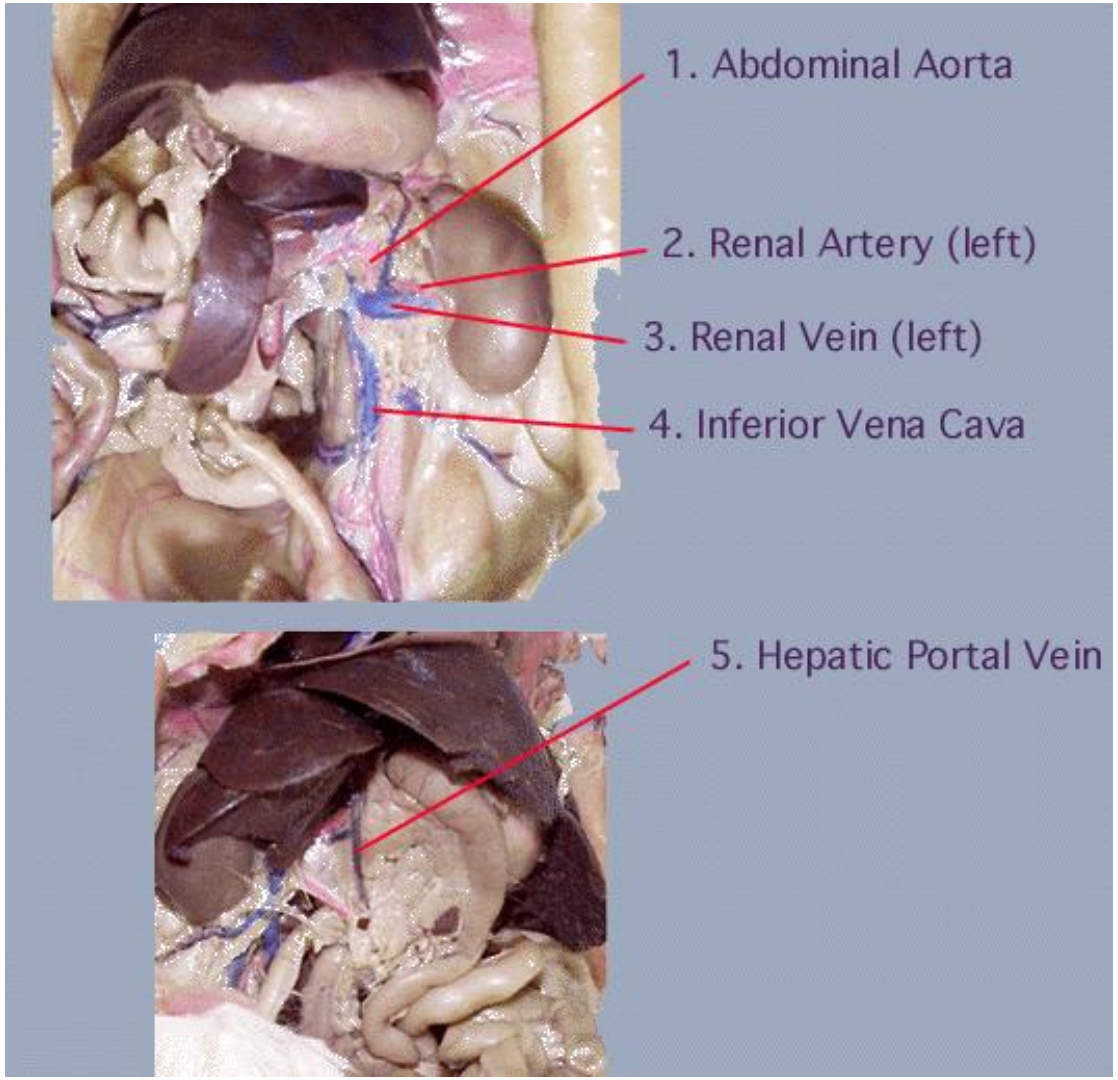

1. Coagulating gland
2. Urinary Bladder
3. Ductus Deferens
4. Epididymis
5. Small Intestine
6. Vesicular Gland
7. Prostate Gland
8. Penis (urethra runs inside)
9. Testis
10. Scrotum

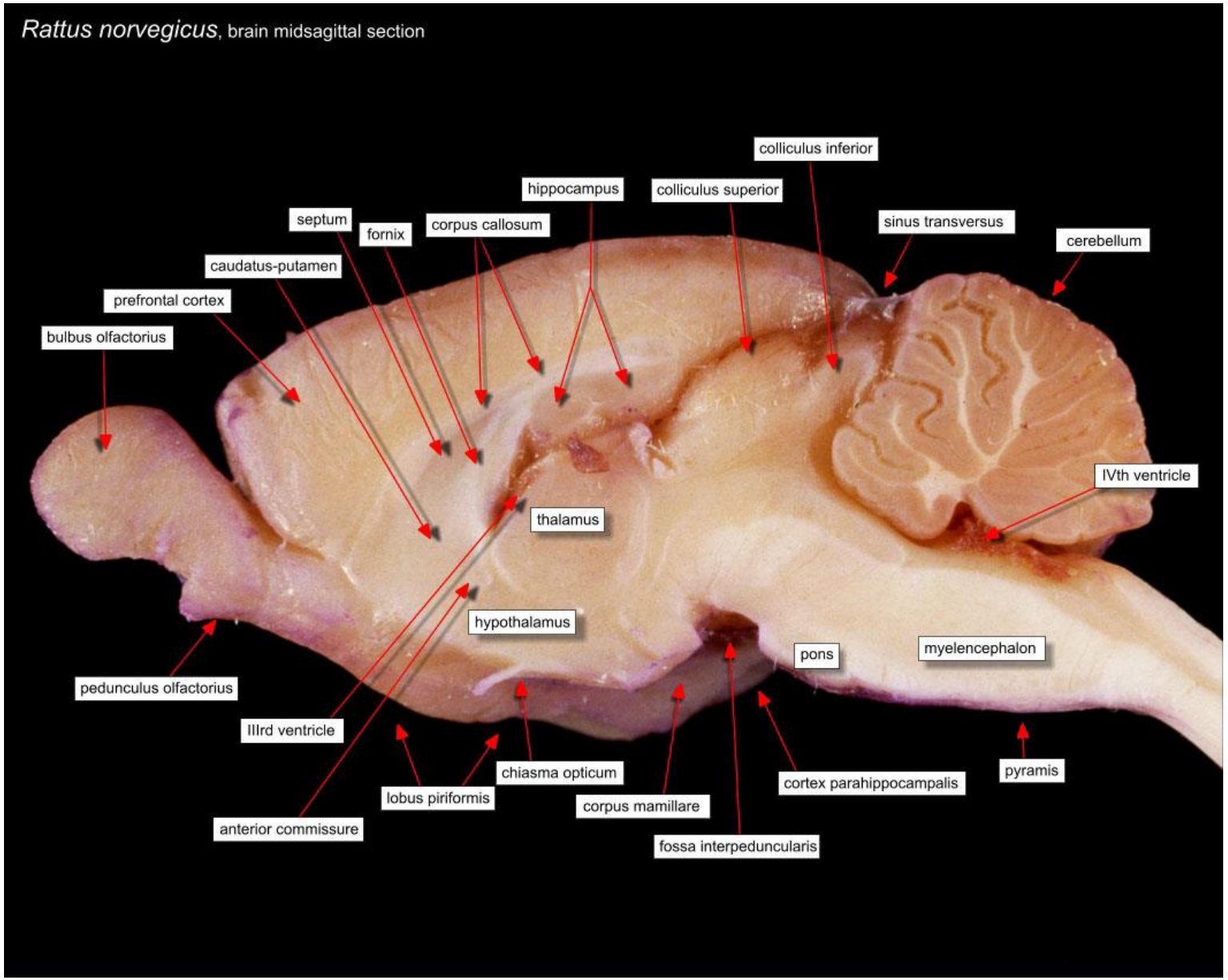

18
17
7
8
16
2
6
3
5
4
10
9
1
11
12
15
14
13



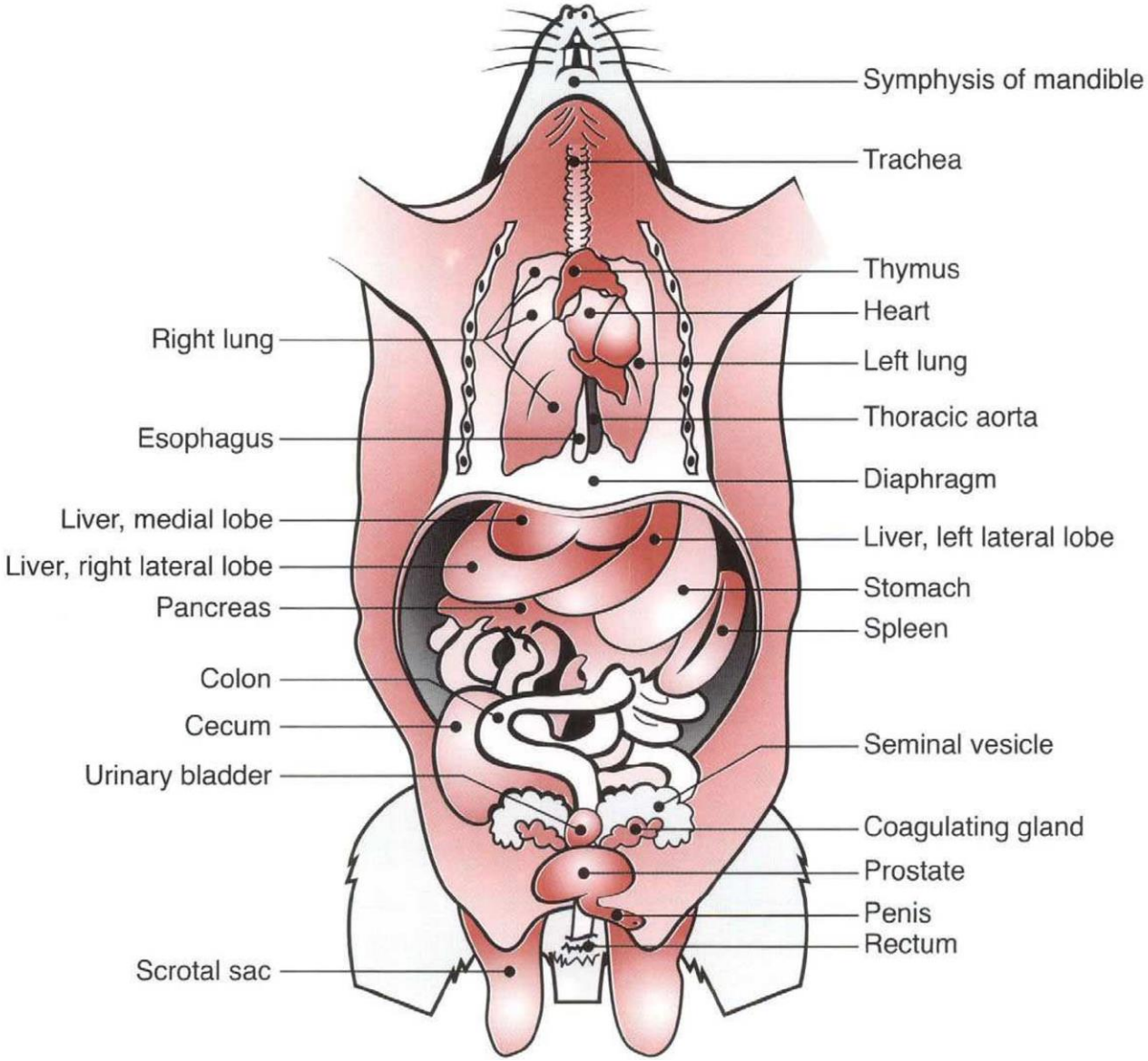
ساختمان قلب و دستگاه گردش خون



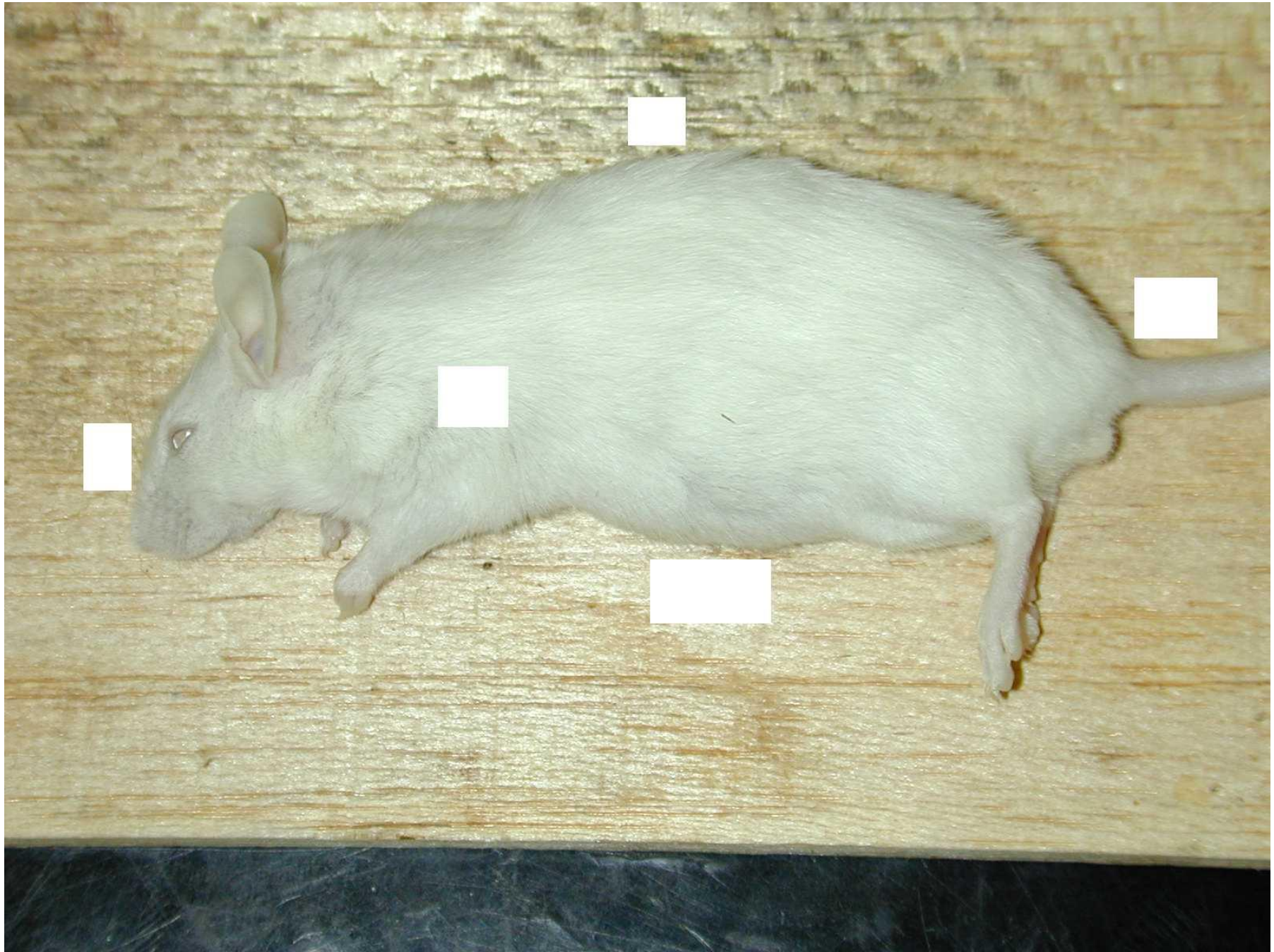


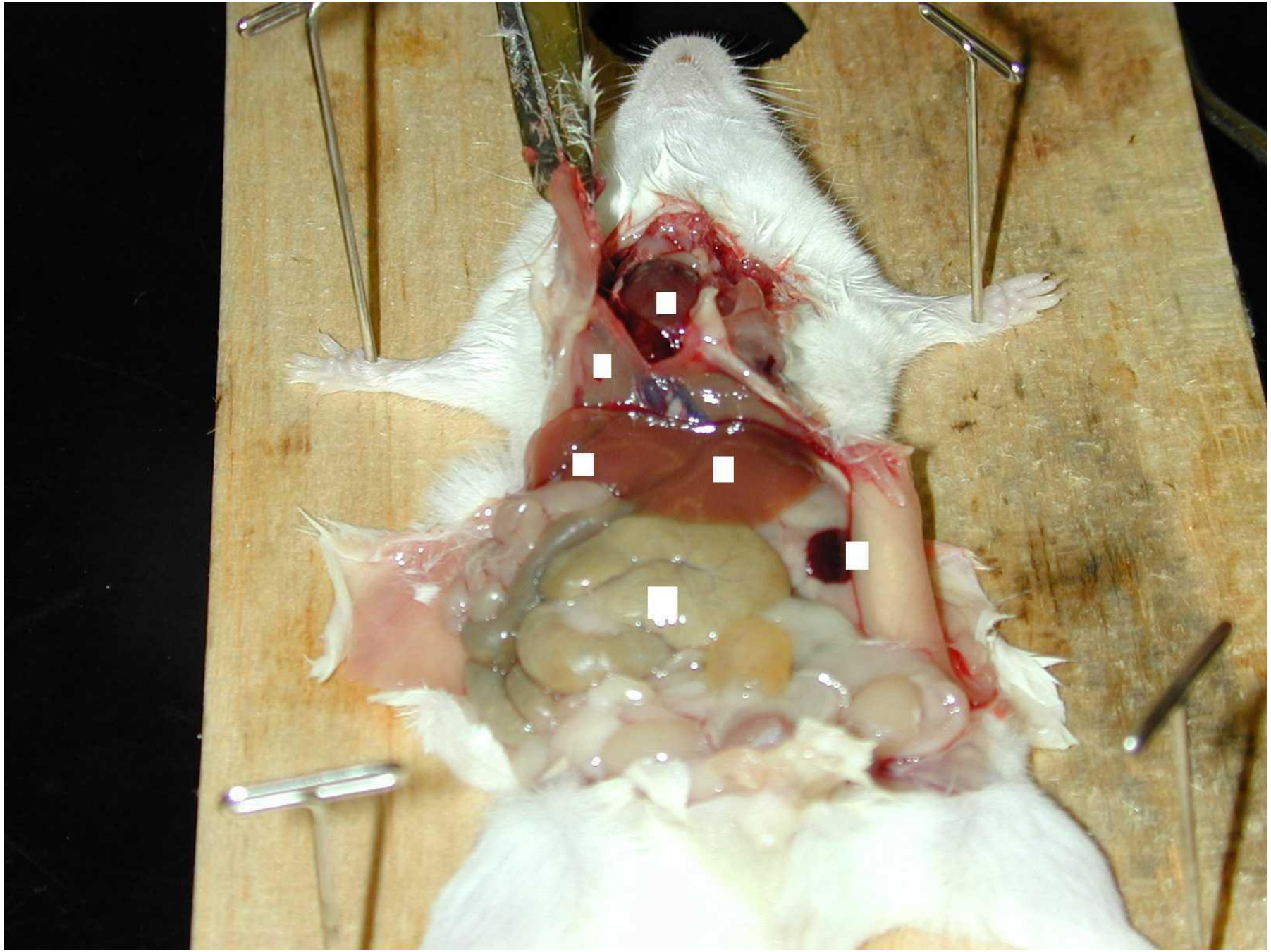

Rattus norvegicus, brain midsagittal section
colliculus inferior
hippocampus
colliculus superior
septum
fornix
corpus callosum
sinus transversus
cerebellum
caudatus-putamen
prefrontal cortex
bulbus olfactorius
IVth ventricle
thalamus
hypothalamus
pons
myelencephalon
pedunculus olfactorius
IIIrd ventricle
chiasma opticum
pyramis
lobus piriformis
cortex parahippocampalis
corpus mamillare
anterior commissure
fossa interpeduncularis

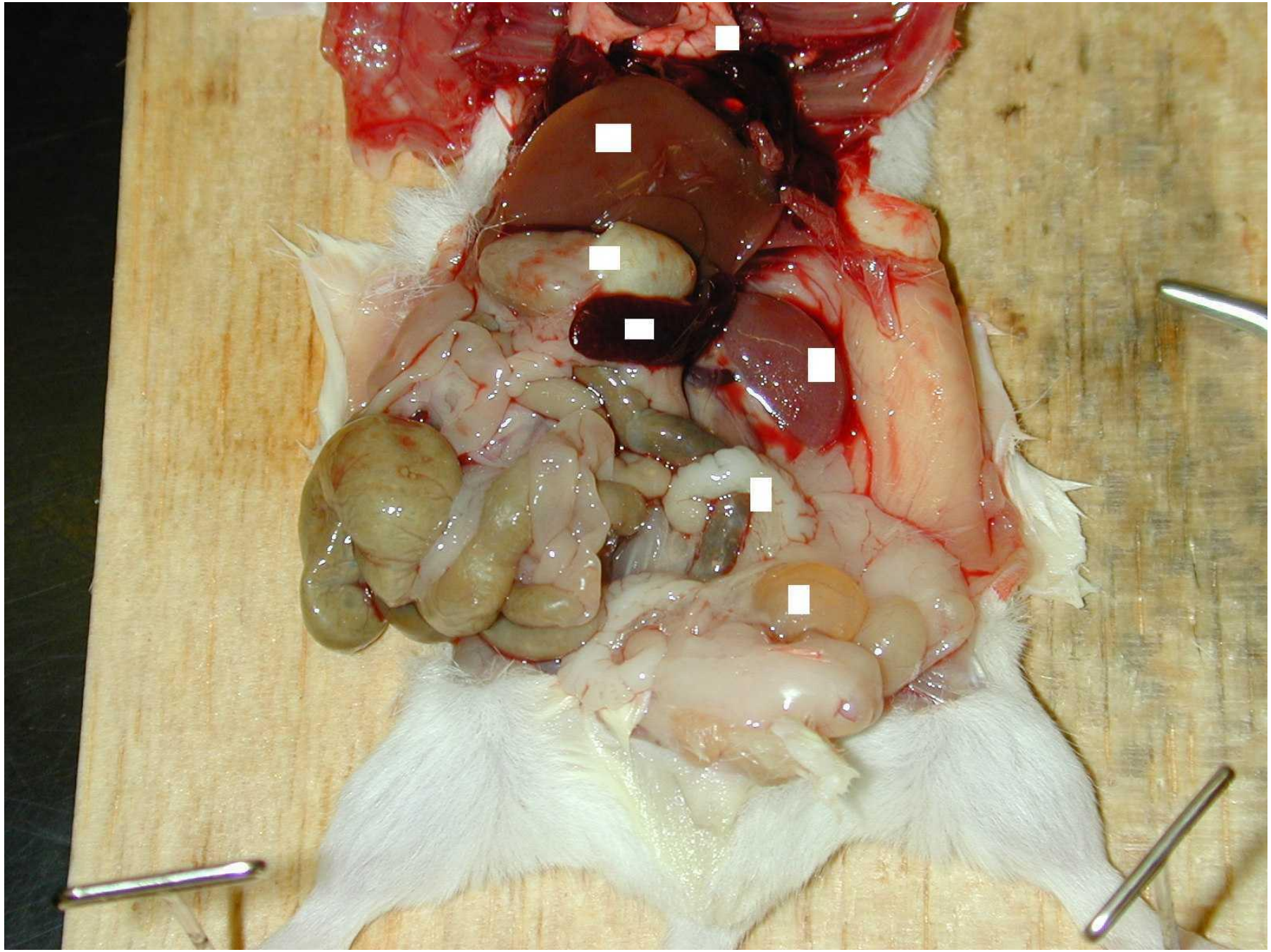
نمونه برداری از بافت های مختلف بدن موش صحرایی

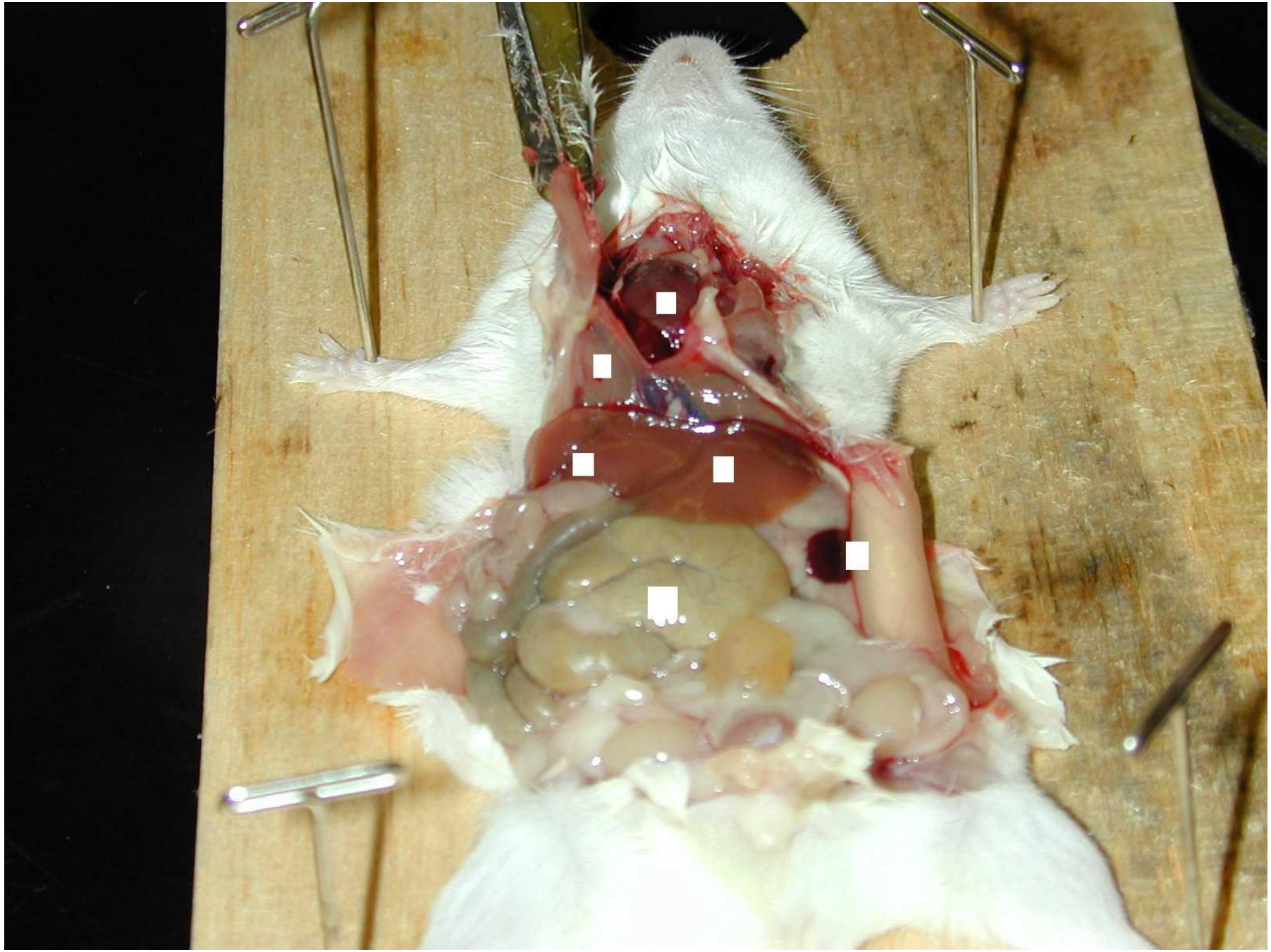


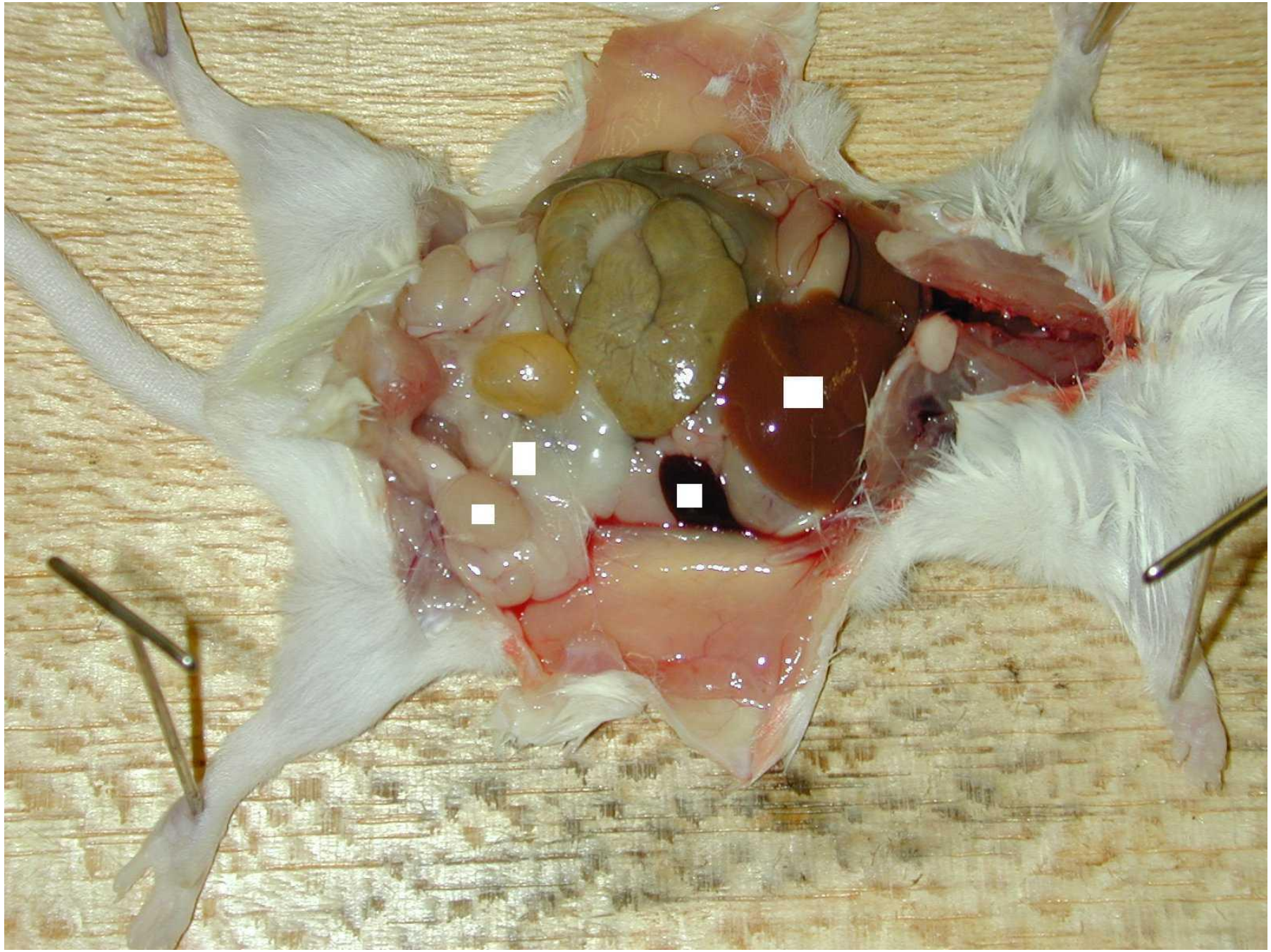
- استفاده از فیکساتیوهای مناسب
  - فرمالین 10 درصد
- انجماد
  - نیترژن مایع

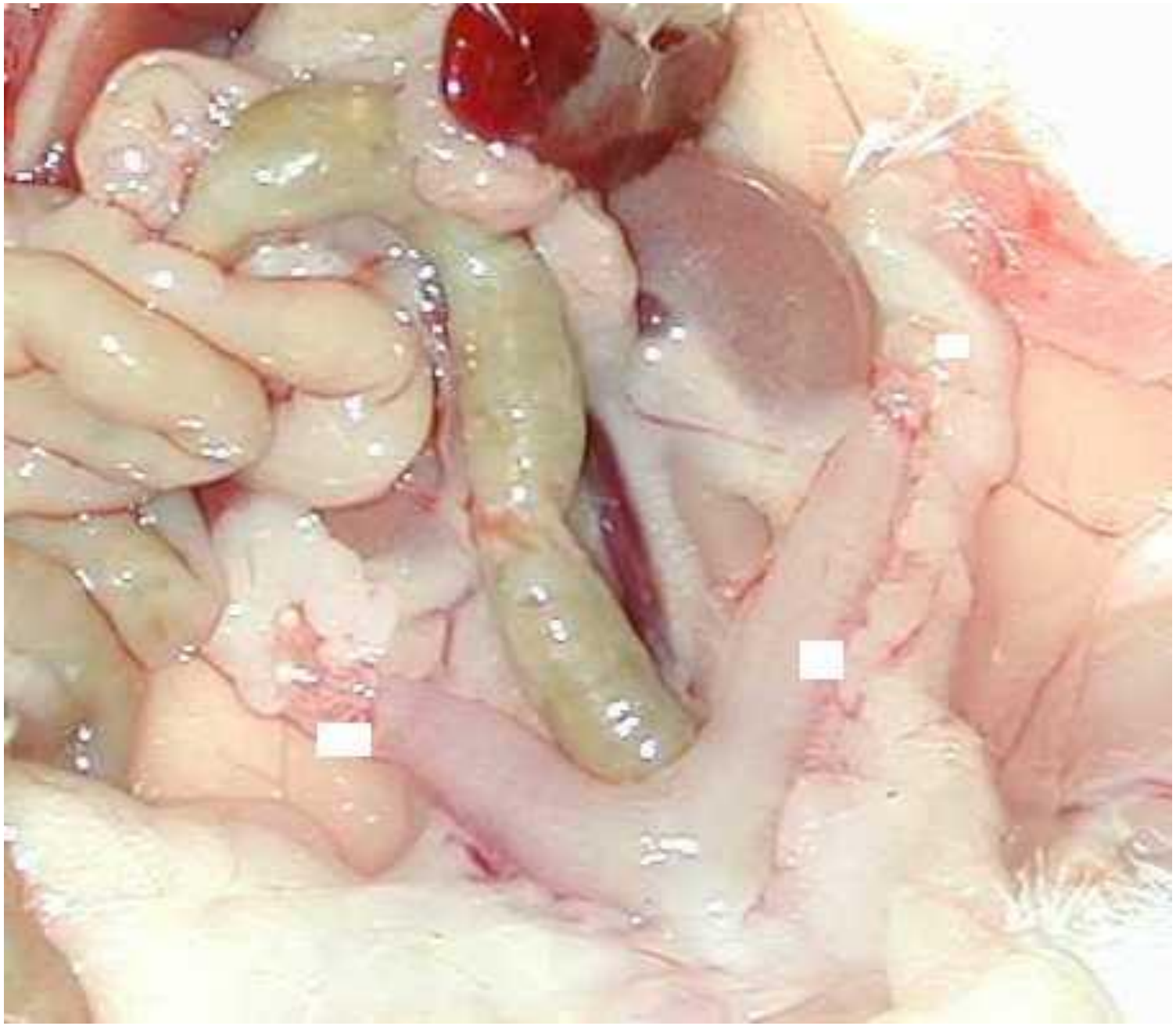












روش های بی هوش کردن حیوانات آزمایشگاهی

- Sedation
- Analgesia
- Anesthesia

- بی هوشی تزریقی
- استنشاقی

انواع داروهای بی هوشی تزریقی

Table 26.2 Agents used for injectable anesthesia in rats

Agent(s)	Dosage	Anesthesia time
Thiopental	20 mg/kg, i.v.	< 10 min
Pentobarbital	50 mg/kg (male), 25 mg/kg (female), i.v. or i.p.	15 min
Fentanyl-fluanisone + diazepam	0.3 ml/kg, i.p. 2.5 mg/kg, i.p.	20 min
Chloral hydrate	300–400 mg/kg, i.p.	1 h
Fentanyl + Medetomidine	0.3 mg/kg, i.p. 0.2–0.3 mg/kg, i.p.	> 1 h
Urethane	1000–1200 mg/kg, i.p.	> 6 h
α-Chloralose	55–65 mg/kg i.p.	8 h

انواع داروهای بی هوشی استنشاقی

Table 26.3 Agents for inhalation anesthesia

Agent	Vapor pressure	% Saturation at 22°C	MAC (v/v %)	Blood–gas partition coefficient	Induction/ recovery	% to be metabolized
Halothane	242	32	0.95	2.3	Fast	15
Enflurane	171	23	2.21	1.9	Fast	2–5
Isoflurane	240	32	1.20–1.57	1.3	Fast	<1
Methoxyflurane	23	3	0.22	13	Slow	50–70
Diethyl ether	443	58	3.0	15	Slow	5–10
Nitrous oxide	39 500	100	250	0.4	Fast	–

اصول تزریق در موش صحرایی

- محل تزریق مناسب
- آماده کردن محل تزریق
- اطمینان از حلالیت و ایمنی ماده تزریق شده
- تعیین pH ماده تزریقی (۸-۴.۵)
- مشخص کردن حجم مجاز و دفعات تزریق
- توجه به سرعت جذب و پخش ماده تزریقی

اصول تزریق در موش صحرایی

محل تزریق مناسب

آماده کردن محل تزریق

اطمینان از حلالیت و ایمنی ماده تزریق شده

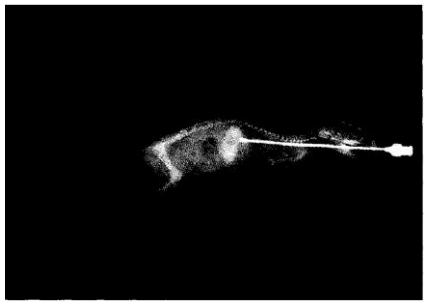
تعیین pH ماده تزریقی (4.5-8)

مشخص کردن حجم مجاز و دفعات تزریق

توجه به سرعت جذب و پخش ماده تزریقی

روش های تزریق در موش صحرایی

- Oral administration (per os)
- Intragastric administration by gavage
- Intradermal ad (i.d.)
- Topical application
- Subcutaneous injection(s.c.)
- Intramuscular injection (i.m.)
- Intraperitoneal injecton (i.p.)
- Intravenous injection (i.v.)
- Intrathecal injection(i.t.)
- Intracranioventricular injection (i.t.)



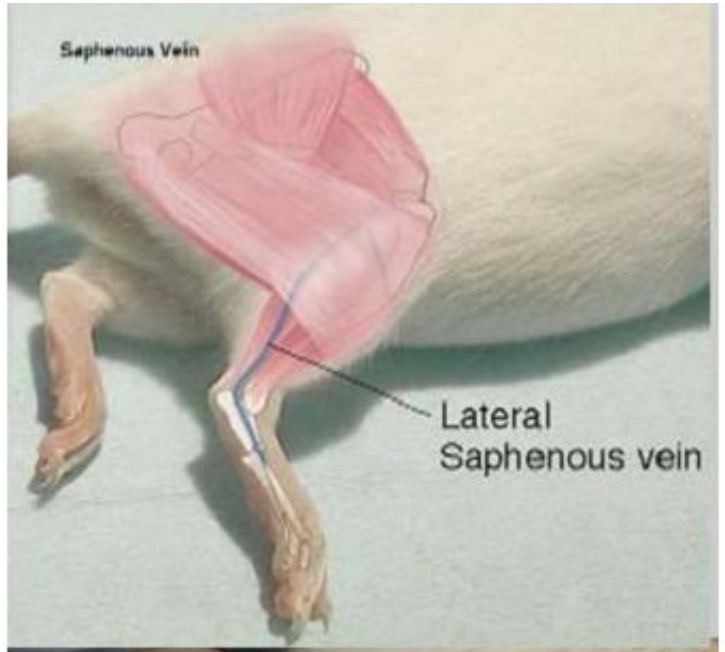
اصول خونگیری در حیوانات آزمایشگاهی

- از پروتوکل های شناخته شده و تایید شده استفاده شود.
- نباید دردناک و استرس زا باشد.
  - استرس روی فاکتورهای بیولوژیک تاثیر می گذارد.
- آموزش های لازم برای روش های مختلف و در حیوانات مختلف ضروری است.
- خونگیری می تواند از شریان ورید و یا قلب انجام شود.
- وضعیت جسمانی و سلامتی حیوان باید مد نظر قرار گیرد.
- فرکانس خونگیری مهم است.
- حجم خونگیری باید مورد توجه قرار گیرد.
- حجم خون در حیوانات بین ۶ تا ۷ درصد وزن بدن است.
- در صورتی که حجم خونگیری زیاد است بهتر است از رینگر لاکتات به عناون جایگزین استفاده کرد.

روش های خونگیری

روش های خونگیری بدون نیاز به بی هوشی

- **Saphenous vein (rat, mice, guinea pig)**
- **Dorsal pedal vein (rat, mice)**



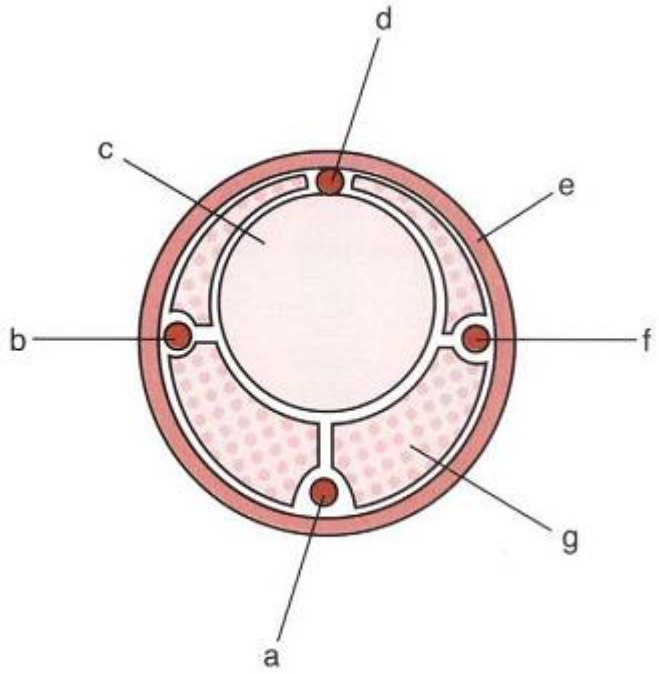
روش های خونگیری که نیاز به بی هوشی دارند

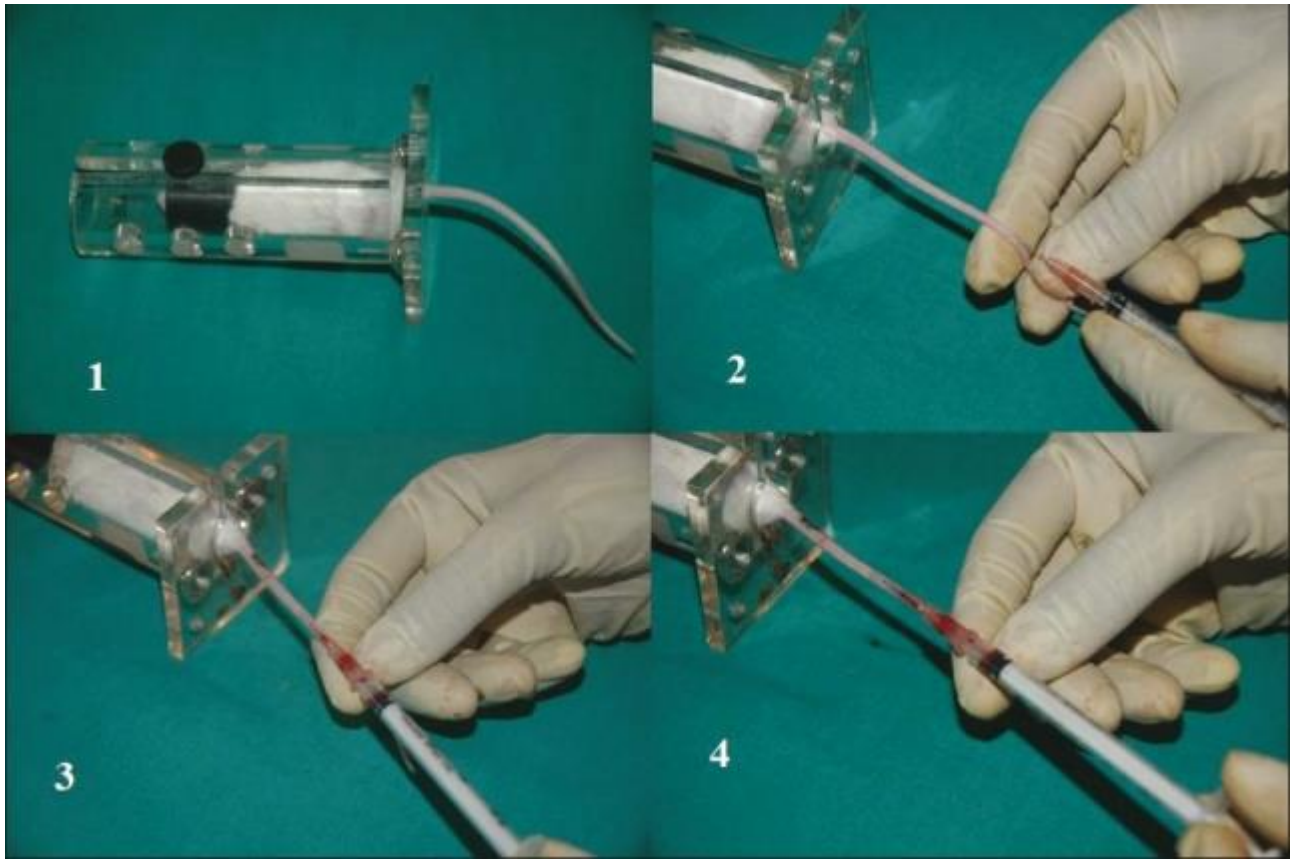
- Tail vein (rat, mice)
- Tail snip (mice)
- Orbital sinus (rat, mice)
- Jugular vein (rat, mice)
- Temporary cannula (rat, mice)
- Blood vessel cannulation (rat, guinea pig, ferret)
- Tarsal vein (guinea pig)
- Marginal ear vein/artery (rabbit)

روش های خونگیری در پایان کار (Terminal procedure)

- Cardiac puncture (rat, mice, guinea pig, rabbit, ferret)
- Orbital sinus (rat, mice)
- Posterior vena cava (rat, mice)

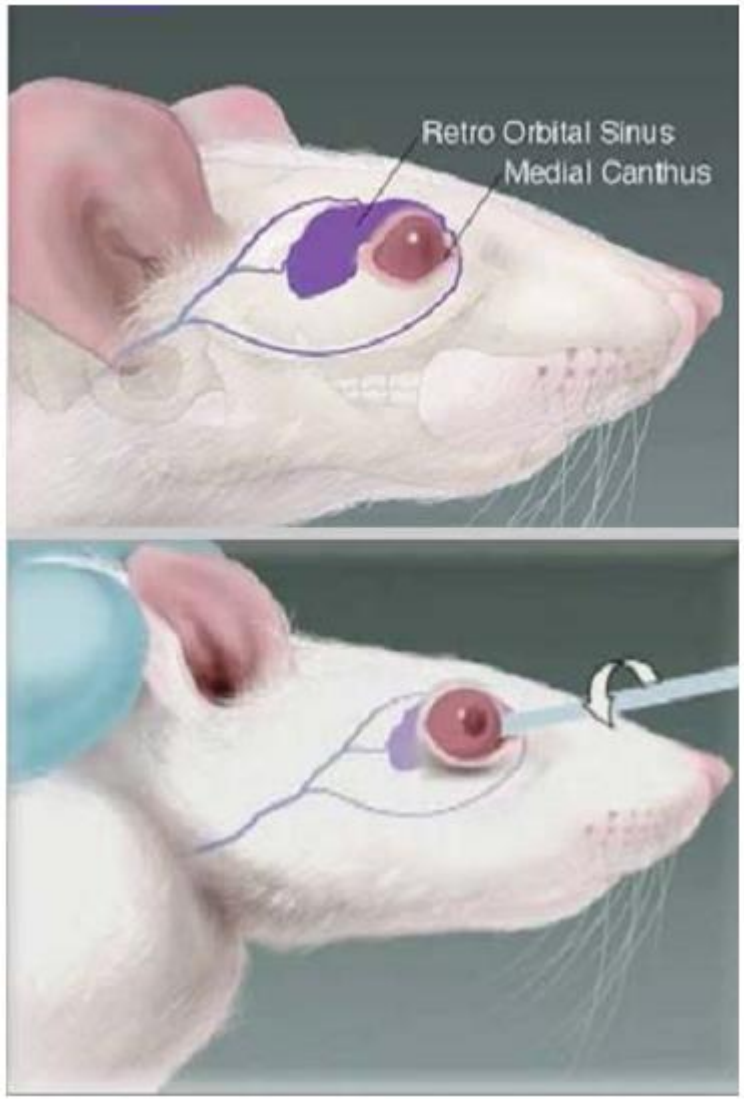
Blood sample collection from mouse tail vein

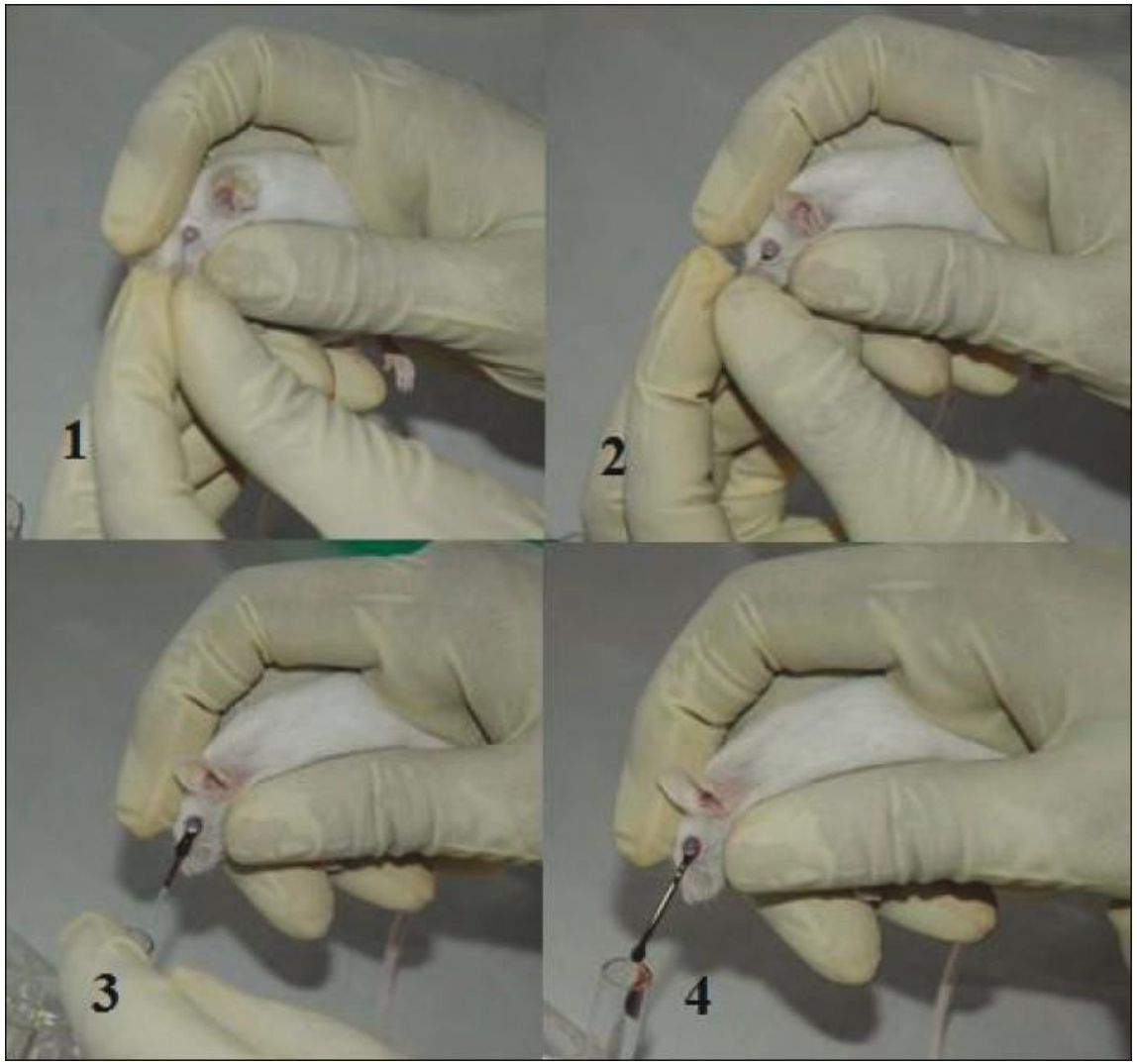




Blood sample collection from rat orbital sinus

Blood sample collection from mouse orbital sinus





Blood vessel cannulation of rat femoral vein

Needle size used for blood vessel cannulation in different species

Species	Needle to be used	Maximum collection volume
Mice	23 – 25G	1 ml
Rat	19 – 21G	10 – 15 ml
Rabbit	19 – 21G	60 – 200 ml
Guinea pig	20 – 21G	1 – 25 ml

Table 2: Summary of Rodent Blood Sampling Techniques									
Route	**General Anesthesia Required**	**Speed & Efficiency**		**Sample Quality**		**Repeated Sampling**	**Relative Volumes Obtainable**	**Species**	**Comments**
		Mouse	**Rat**	**Mouse**	**Rat**				
Retro-orbital	Mouse - Recommended[1] Rat - Yes[2]	+++	++	+++	++	Should alternate eyes.	Medium to Large	Rat, Mouse	Rapid. Potential for complications.
Facial Vein	No	+++	N/A	+++	N/A	Yes	Medium to Large	Mouse	Rapid, easy, & repeated samples possible.
Saphenous Vein	No	++	++	++	++	Yes	Small to Medium	Rat, Mouse	Not as rapid as other techniques. Low potential for tissue damage.
Tail Vein or Artery	No	++ Vein +++ Artery	++ Vein +++ Artery	+ to ++[3]	++ to +++	Yes	Small to Medium (vein) Medium to Large (artery)	Rat, Mouse	Repeatable & simple. Variable sample quality.
Tail Clip	No	+++	+++	+/-	+/-	Yes	1-2 drops	Rat, Mouse	Repeatable if gently pull scab.
Jugular	Recommended	N/A	+/++	N/A	+++	Difficult	Large	Rat	Limited application. Poor for repeated sampling.

Appropriate Recovery Periods

Single Sampling		Multiple Sampling (e.g. pharmacokinetic study)	
% circulating blood volume removed	Approximate recovery period	% circulating blood volume removed in 24h	Approximate recovery period
10 %	2 weeks	10-15%	2 weeks
15 %	4 weeks	20%	3 weeks
20 %	Under anesthesia, only as a terminal procedure		

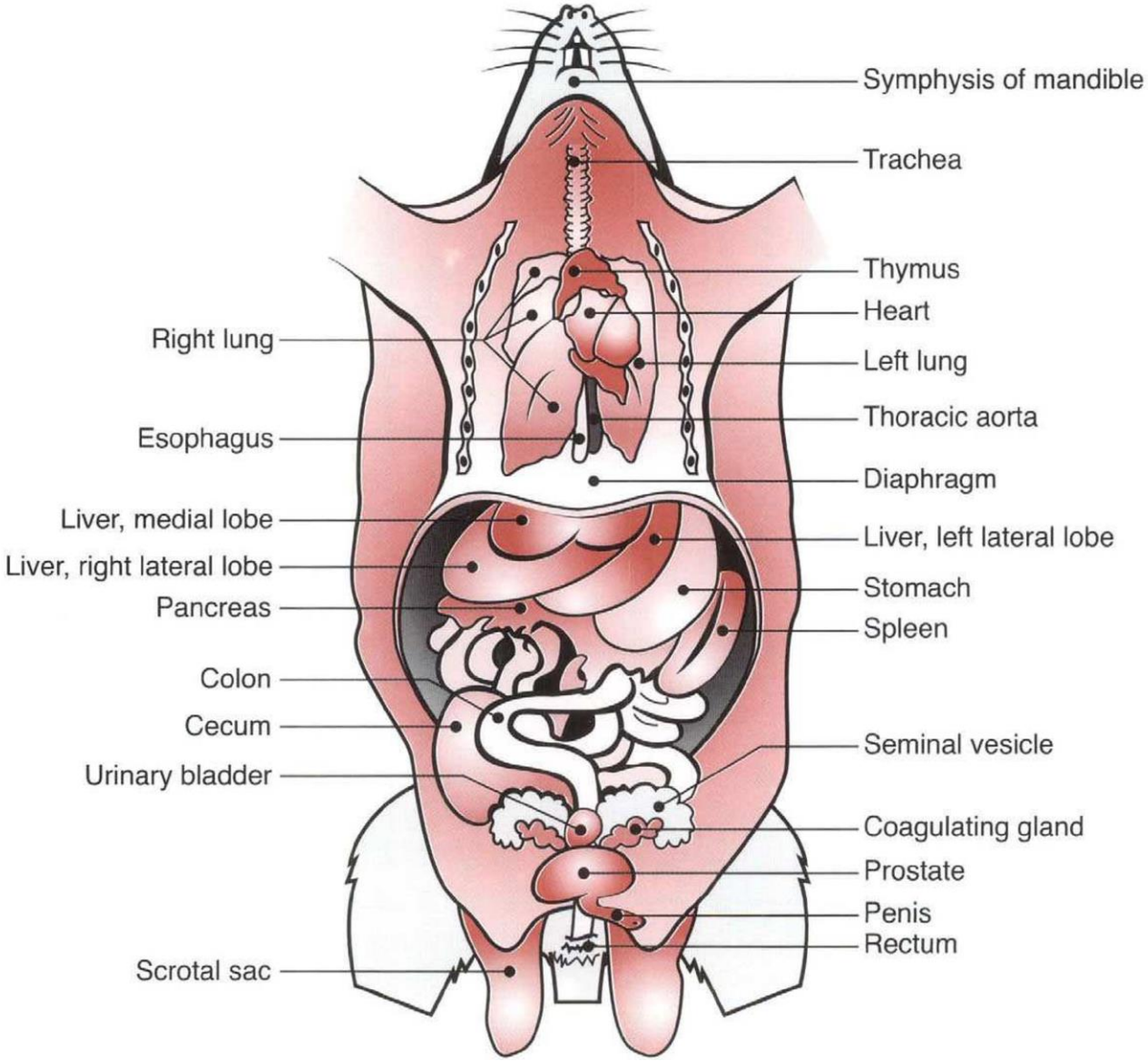
Recommended Blood Sampling Sites by Species

Species	Recommended Sampling Location
Mouse	Saphenous vein, facial vein
Rat	Lateral tail vein, jugular vein, saphenous vein, facial vein
Gerbil	Saphenous vein, facial vein
Hamster	Jugular vein, marginal ear vein
Guinea Pig	Saphenous vein
Rabbit	Central ear artery, jugular vein, marginal ear vein
Cat	Cephalic vein, jugular vein
Dog	Cephalic vein, jugular vein, saphenous vein
Pig	Jugular vein, cranial vena cava (blind stick)
Cattle	Tail vein, jugular vein
Sheep/Goat	Jugular vein, cephalic vein
Horse	Jugular vein
Snake	Palatine vein, ventral tail vein, heart
Lizard	Ventral tail vein (large lizards), toe nail clip and micro capillary tube (small lizards)
Turtle	Jugular vein, brachial vein, heart
Fish	Anterior vena cava
Frog	Median abdominal vein
Bird	Brachial vein, cutaneous ulnar vein, right jugular vein, medial metatarsal vein

جمع آوری سایر مایعات بدن

- ادرار
- بزاق
- صفرا
- ترشحات پانکراسی
- منی (semen)
- شیر
- لنف
- مایع مغزی نخاعی

نمونه برداری از بافت های مختلف بدن موش صحرایی



روش های آسان کشی و معدوم کردن حیوانات آزمایشگاهی
Euthanasia

دارو یا روش	حیوان
اتر	جوندگان، گربه، سگ، پرندگان کوچک
هالوتان	جوندگان، گربه، سگ، پرندگان کوچک
دی اکسید کربن	جوندگان، گربه، سگ، پرندگان کوچک
باربیتورات	همه گونه حیوانات
جابجایی مهره های گردن	حیوانات کمتر از 200 گرم وزن
گیوتینه کردن (بریدن سر)	جوندگان و خرگوش های جوان

معدوم کردن باید به دقت و با رعایت نکات اخلاقی و ایمنی لازم صورت گیرد.

دفن کردن

استفاده از چاه مخصوص

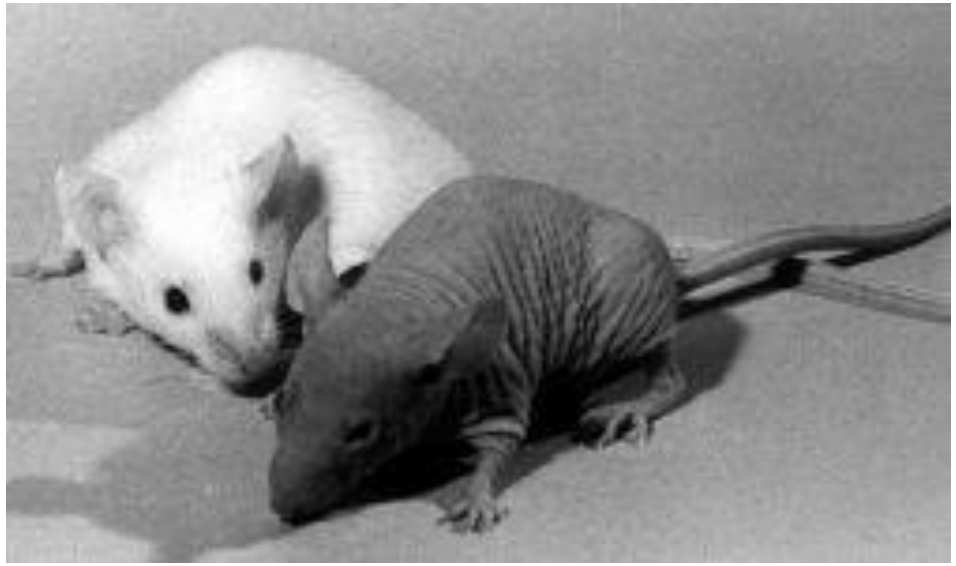
استفاده از مدل های حیوان در مطالعات علوم پایه پزشکی

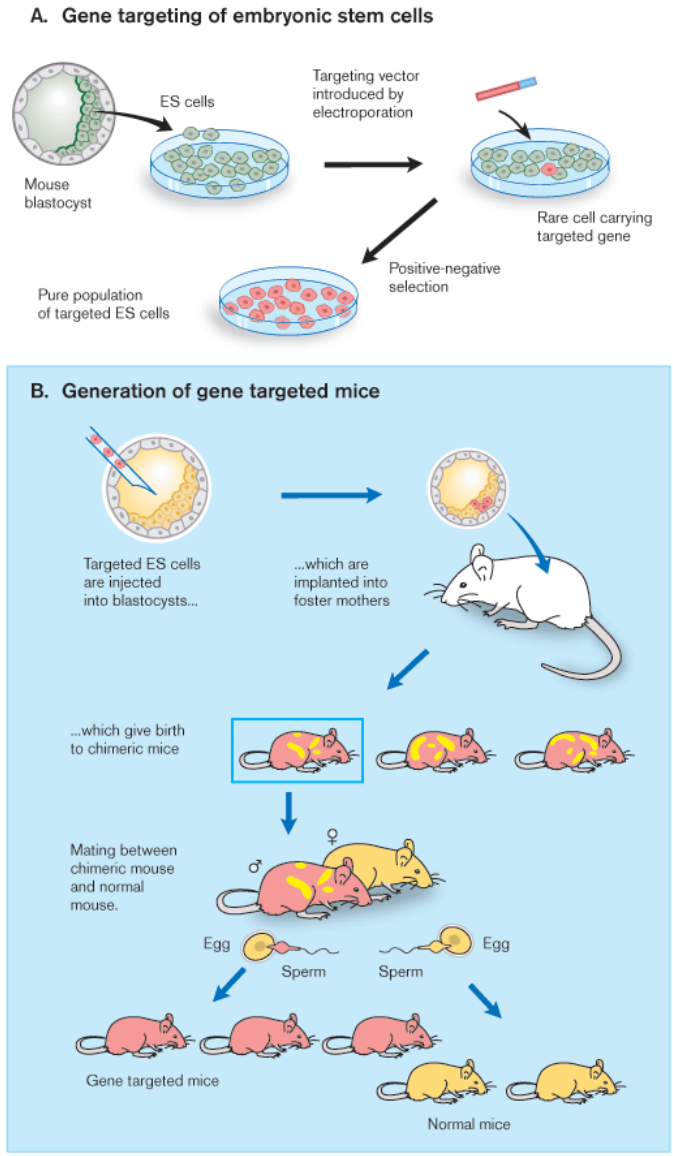
- Animal Models in Pharmacology and Toxicology
- Animal Models in Fetal Growth and Development
- Animal Models of Nephrological Disorders
- Animal Models in Neuroscience
- Animal Models for Psychological Disorders
- Animal Models in Mycology
- Diabetic Animal Models
- Animal Models of Skeletal Disease
- Animal Models in Cancer Research
- Animal Models in Oral Health Sciences

A Revolutionary laboratory animal Model

- **knockout mice**

- **Nude mice**




A. Gene targeting of embryonic stem cells
ES cells
Targeting vector introduced by electroporation
Mouse blastocyst
Rare cell carrying targeted gene
Positive-negative selection
Pure population of targeted ES cells
B. Generation of gene targeted mice
Targeted ES cells are injected into blastocysts...
...which are implanted into foster mothers
...which give birth to chimeric mice
Mating between chimeric mouse and normal mouse.
♀
♂
Egg
Sperm
Egg
Sperm
Gene targeted mice
Normal mice
ANNIKA RÖHL

اشنایی با روش ایجاد مدل های درد نوروپاتی

- درد های نوروپاتی دردهایی هستند که در اثر آسیب به سیستم عصبی ایجاد می شوند
  - هایپرآلژزیا
  - آلودینیا
  - درد خودبخودی
  - ویدئو

- **آشنایی با روش ایجاد مدل های صرع و تشنج در حیوانات**
- کیندلینگ
- الکتریکی
- شیمیایی
- **آشنایی با مدل حیوانی ایجاد دیابت**
- تزریق مواد شیمیای که موجب تخریب سلول های بتای جزایر لانگرهانس می شوند.
- استرپتوزوتوسین

مسائل اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی

- ***بر اساس این قوانین محقق تنهادر محدوده های خاص و در ارتباط با امر تحقیق می تواند روی حیوان آزمایش نمایدو آسایش حیوانات اولین چیزی است که در چگونگی اداره آزمایشات باید مورد توجه قرار گیرد .***
- اولین قانون تحت عنوان ANIMAL ACT در سال 1976 در انگلستان

برای رعایت اصول اخلاقی کار با حیوان آزمایشگاهی بایستی به موارد زیر توجه داشت

- کاهش تعداد حیوانات مورد استفاده
  - با طراحی صحیح روش‌های تحقیق و استفاده از روش های آماری نوین
- کاهش درد و رنج حیوانات در طول پژوهش
- استفاده از روش های جایگزین به جای استفاده از حیوان آزمایشگاهی

خانه حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

انواع حیوانات آزمایشگاهی

- موش صحرایی
- موش سوری
- خوکچه هندی؟؟
- خرگوش؟؟

Thanks for Your Attention

- انسان هنوز راهی طولانی در کشف حقایق فیزیولوژیک و چگونگی رخداد بسیاری بیماریها در بدن خود، در پیش دارد و در بعضی موارد تنها راه برای کسب اطلاعات مطالعه مدلهای حیوانی است.