مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۳۸/هفته دوم مرداد ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۳/۲۳

اخذ نمونه‌ی خون از خرگوش آزمایشگاهی

دکتر سیاوش احمدی نوربخش[۱]، دکتر عصمت میرابزاده اردکانی[۲]

مقاله کوتاه

چکیده

مقدمه: تکنیک انجام پژوهش از مهم‌ترین امور تأثیرگذار در کیفیت نتایج پژوهش است. خون‌گیری با حجم زیاد از خرگوش‌های آزمایشگاهی، یکی از امور متداول در کار با این حیوان است، اما به دلیل دشواری‌های تکنیکی، خون‌گیری از قلب حیوان هوشیار به عنوان روشی رایج در بسیاری از مراکز پذیرفته شده است. این روش –جدا از غیر اخلاقی بودن– به دلیل استرس زیاد، موجب اختلال در پارامترهای مورد اندازه‌گیری و همچنین بیماری‌ها و تلفات فراوان در حیوانات می‌شود. هدف پژوهش فعلی، ارایه‌ی دقیق تکنیک بهینه‌ای برای اخذ نمونه‌های خونی با حجم زیاد از خرگوش‌های آزمایشگاهی بود.

روش‌ها: پژوهش حاضر در طی فرایند تولید کمپلمان خرگوش، از ۹۱ سر خرگوش سفید نیوزلندی نر و ماده با سن ۳۶–۶ ماه و با وزن ۳/۵–۱/۲ کیلوگرم صورت گرفت. استیل پرومازین به صورت عضلانی به حیوانات تجویز گردید. به منظور جلوگیری از اسپاسم شریانی ناشی از برخورد سرسوزن، اعصاب شریان گوش توسط لیدوکائین بی‌حس شد. دستیابی عروقی توسط سرسوزن پروانه‌ای تغییر شکل یافته صورت گرفت. در نهایت، شریان به روش مناسب خون‌بندی گردید.

یافته‌ها: روش حاضر، ضمن ۱۵۵ مورد خون‌گیری از حیوانات به مدت ۳ ماه، موجب حصول ۲۳۸۴ میلی‌لیتر خون گردید (۳/۵ ± ۱۵/۴ میلی‌لیتر خون به ازای هر سر خرگوش). تعداد تلفات ناشی از خون‌گیری در طول ۶ ماه پس از آغاز مطالعه، معادل صفر بود که ضمن مراجعه به سوابق قبلی مربوط به روش خون‌گیری از قلب حیوانات هوشیار در بازه‌ی زمانی مشابه (۱۹ سر تلفات)، اختلاف آماری معنی‌داری را نشان داد ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: روش ارایه شده، موجب کاهش بیماری و تلفات در خرگوش‌های آزمایشگاهی شده و به عنوان روش ارجح خون‌گیری با حجم زیاد، توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: حیوانات آزمایشگاهی، نمونه‌برداری، نمونه‌ی خون، اخذ خون

ارجاع: احمدی نوربخش سیاوش، میرابزاده اردکانی عصمت. **اخذ نمونه‌ی خون از خرگوش آزمایشگاهی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۳۸): ۹۲۳–۹۱۷

مقدمه

تکنیک صحیح انجام پژوهش، یکی از مهم‌ترین اصول کاهش خطای پژوهشی و دستیابی به نتایج صحیح است. آن جا که موضوع پژوهش یک موجود زنده باشد، این موضوع ظرافت‌های بیشتری را می‌طلبد و در حقیقت گاهی سرنوشت پیشرفته‌ترین پژوهش‌ها نیز در گرو اقدامات تکنیکی به ظاهر ساده نظیر خون‌گیری از حیوان آزمایشگاهی می‌باشد. خون‌گیری ناصحیح نه تنها موجب اغتشاش در پارامترهای مورد اندازه‌گیری می‌شود، بلکه در اکثر موارد برای حیوان

۱- متخصص جراحی دامپزشکی، واحد تحقیقات پیش‌بالینی مراقبت‌های ویژه (PICRU)، دانشکده‌ی آناتومی، فیزیولوژی و بیولوژی، دانشگاه استرالیای غربی، کراولی، استرالیای غربی، استرالیا

۲- مربی، بخش پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر عصمت میرابزاده اردکانی

Email: mirabzadeh@pasteur.ac.ir

نیز رنج‌آور و بر خلاف اصول اخلاقی پژوهش است (۲-۱). عروق قابل دسترس برای خون‌گیری از خرگوش بسیار محدود می‌باشد. برای اخذ نمونه‌های با حجم بیش از ۲-۱ میلی‌لیتر، از ورید ژوگلار (Jugular vein) گردن، قلب (در شرایط بسیار ویژه)، یا شریان مرکزی گوش می‌توان استفاده نمود (۳).

استفاده از ورید ژوگلار، به طور معمول نیازمند مقید نمودن حیوان به پشت است که موجب بروز دیسترس شدیدی در حیوان می‌شود. خون‌گیری از قلب، می‌بایست فقط در شرایط بیهوشی جراحی (Surgical anaesthesia) صورت گیرد و به دنبال آن، می‌باید بدون کاهش سطح هوشیاری، نسبت به کشتن با ترحم (یوتانزی) حیوان به روش صحیح اقدام نمود (۴). در غیر این صورت، خون‌گیری از قلب به دلیل آسیب به عروق کرونر قلبی، بروز آنفارکتوس میوکارد، فیبریلاسیون بطنی، تامپوناد قلبی، پارگی لوب‌های ریه، بروز نوموتوراکس و خون‌ریزی داخل ریوی، می‌تواند باعث آسیب‌های جدی و رنج شدید حیوانات شود (۳).

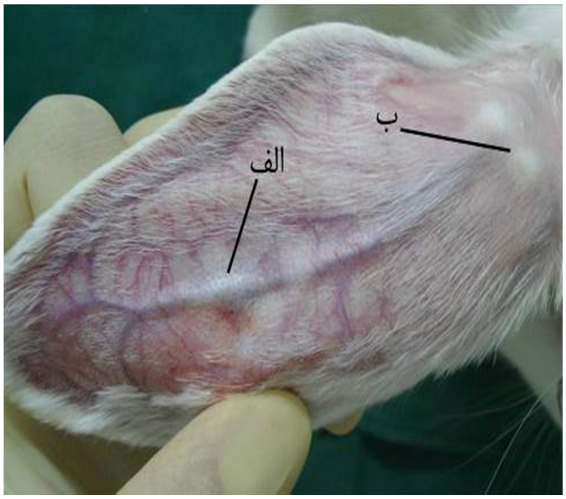
بر پایه‌ی مشاهدات متعدد پژوهشگران، متأسفانه روش خون‌گیری از قلب حیوان آزمایشگاهی بدون بیهوشی/بی‌دردی کافی و در ضمن، زنده نگاه داشتن حیوان، در بسیاری از مراکز رواج دارد. از این رو، پژوهش حاضر در جهت ارایه‌ی تکنیک صحیح خون‌گیری از این حیوان شکل گرفت.

روش‌ها

تکنیک ارایه شده در پژوهش حاضر، بر روی ۹۱ سر خرگوش سفید نیوزلندی نر و ماده با سن ۳۶-۶ ماه و با وزن ۳/۵-۱/۲ کیلوگرم به عنوان بخشی از روند تولید مواد بیولوژیک در شرکت مادر تخصصی پالایش و پژوهش خون استفاده گردید. کار با حیوانات آزمایشگاهی در پژوهش حاضر، بر پایه‌ی ضوابط اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی، صورت گرفت (۶-۵، ۳).

داروی استیل پرومازین به منظور آرام‌بخشی حیوان و متسع شدن شریان لاله‌ی گوش، با دوز ۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن برای هر خرگوش، در محل عضله‌ی کمری تجویز شد (۷، ۳). در طول مراحل بعد، از بروز هر گونه استرس برای حیوانات -نظیر حرکات ناگهانی افراد عامل و صداهای بلند- پرهیز گردید. برای دستیابی عروقی، از سرسوزن پروانه‌ای شماره‌ی ۱۹ (رگ بزرگ)، ۲۰ (رگ متوسط)، یا ۲۱ (رگ کوچک) با لوله‌ی تا حد امکان کوتاه (جهت کاهش مقاومت لوله در مقابل مکش خون) استفاده شد. موهای سطح بیرونی گوش در محل عبور شریان میانی تراشیده شد و لیدوکائین ۱۰ درصد به صورت اسپری روی سطح مورد نظر برای تزریق، تجویز گردید و حدود ۲ دقیقه زمان داده شد.

سپس داروی لیدوکائین ۲ درصد بدون آدرنالین به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر در محلی که قرار بود سرسوزن وارد رگ شود، به صورت زیرجلدی در اطراف رگ تزریق گردید (شکل ۱- الف). مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر داروی لیدوکائین نیز در اطراف شریان در محل قاعده‌ی گوش به صورت زیرجلدی تزریق شد (شکل ۱- ب) و ۵-۳ دقیقه جهت تأثیر مناسب دارو زمان داده شد. گوش حیوان خشک شد و برای افزایش حجم عروق، کمی ماساژ داده شد؛ سپس ضمن پرهیز از بروز سوختگی، با یک سشوار یا کیسه‌ی آب گرم کوچک گرم شد.



شکل ۱. محل‌های تزریق لیدوکائین. الف) تزریق در اطراف شریان میانی گوش. ب) تزریق در قسمت پروکسیمال شریان

محل ورود سرسوزن به شریان، تا حد امکان در سمت دیستال شریان (دور از سر حیوان) در نظر گرفته شد و دقت گردید که تا حدود ۲ سانتی‌متر در پروکسیمال آن شریان دارای خمیدگی نباشد. پس از ضد عفونی پوست و ثابت نگاه داشتن رگ زیر پوست با انگشت دست غیر غالب، سرسوزن پروانه‌ای با زاویه‌ی بسیار اندک (به طور تقریبی موازی پوست) در محل قبلی تزریق لیدوکائین، وارد رگ گردید. با مشاهده‌ی خون داخل لوله‌ی سرسوزن، سرسوزن اندکی جلو رانده شد و پیستون سرنگ به آرامی عقب کشیده شد. لازم به ذکر است که کشیدن سریع پیستون سرنگ، موجب مکیده شدن دیواره‌ی رگ به داخل سرسوزن می‌شود و خون‌گیری را ناممکن می‌سازد.

چنانچه جریان خون به داخل سرنگ متوقف می‌شد، عقب کشیدن پیستون متوقف می‌گردید و سپس چنانچه رگ دچار اسپاسم نشده و سرسوزن آزادی حرکت نسبی داشت، سرسوزن با احتیاط داخل رگ اندکی به سمت عقب یا جلو حرکت داده می‌شد و خون‌گیری ادامه می‌یافت.

چنانچه باز هم جریان خون برقرار نمی‌شد، احتمال انسداد مسیر توسط لخته یا اسپاسم شریان –به دلیل بی‌حسی ناکافی اعصاب رگ– وجود داشت. در صورت اسپاسم رگ، سرسوزن نباید داخل شریان به جلو حرکت داده شود. در غیر این صورت، رگ دچار آسیب جدی خواهد شد. در چنین مواردی، لازم است ضمن خارج نمودن سرسوزن و خون‌بندی مناسب، خون‌گیری از گوش دیگر یا از نواحی پروکسیمال شریان صورت گیرد.

حجم مجاز خون‌گیری از خرگوش آزمایشگاهی سالم در فواصل زمانی هر دو هفته یک بار، کمتر یا مساوی ۵ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان –بدون احتساب وزن چربی در حیوانات چاق– می‌باشد (۸، ۱). حجم مجاز خون‌گیری در حیوانات دچار عارضه یا بیماری، به مراتب کمتر است (۸). پس از خاتمه‌ی خون‌گیری، مقداری محلول سالین ایزوتونیک یا رینگر با حجم معادل حجم خون اخذ شده، از طریق ورید حاشیه‌ای گوش به حیوان تزریق می‌شد (۸).

پس از خاتمه‌ی خون‌گیری، سرسوزن از رگ بیرون آورده شد و ضمن ضد عفونی محل، سریع مقداری پنبه‌ی خشک و تمیز، بر روی محل سوراخ پوستی قرار گرفت و با یک کلیپس –به نحوی که فشار مناسبی برای خون‌بندی در محل سوراخ پوستی وارد شود– به مدت ۱۵ دقیقه در محل تثبیت گردید (شکل ۲). در پایان، پنبه به صورت عمود از روی محل برداشته می‌شد. کشیدن پنبه بر روی محل، موجب کنده شدن لخته‌های موجود در محل و آغاز خون‌ریزی مجدد می‌شد.

شکل ۲. کلیپس کاغذی جهت فشردن مؤثر پنبه بر روی محل خون‌گیری از شریان

تعداد کلیپس‌ها قبل و پس از استعمال ثبت گردید و در پایان مقایسه شد. باقی ماندن کلیپس بر روی گوش حیوان، بسیار دردناک است و منجر به آسیب جدی بافت‌ها می‌شود. با برداشتن کلیپس، گوش خرگوش در جهات مختلف به آرامی حرکت داده می‌شد و احتمال حضور خون‌ریزی فعال زیرجلدی یا خارجی بررسی می‌شد. در صورت وجود خون‌ریزی، بار دیگر پنبه و کلیپس به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه بر روی محل قرار داده می‌شد.

خون‌ریزی شریان گوش و ایجاد لخته‌ی حجیم زیرجلدی در محل، می‌تواند منجر به تخریب و نکروز بافتی نواحی دیستال گردد. به منظور جبران استرس وارده به حیوان، مقداری غذای تشویقی (نظیر یونجه، هویج، کلم‌پیچ، یا انواع تجاری غذاهای تشویقی مخصوص خرگوش) در اختیار حیوان گذاشته می‌شد. خون‌گیری متناوب و/یا با حجم زیاد، موجب بروز کم‌خونی مزمن می‌شود که علایم اولیه‌ی آن در پارامترهای هماتولوژیک مشهود است و برخی علایم بالینی متأخر آن شامل رنگ‌پریدگی غشاهای مخاطی، ضعف، کاهش تحرک، عدم تحمل فعالیت، کاهش حجم توده‌ی عضلانی و افزایش تعداد تنفس می‌باشد (۸).

در این حیوانات لازم است سریع خون‌گیری متوقف شود و اقدامات درمانی زیر نظر دامپزشک صورت گیرد. ادامه‌ی خون‌گیری از این حیوانات، باید با حجم کمتر و با فواصل زمانی بیشتر صورت گیرد (۸). حیواناتی که به طور دایم از آن‌ها خون‌گیری می‌شود، لازم است جیره‌ی غذایی غنی‌تری نسبت به حیوانات معمولی دریافت نمایند (۹). افزودن مکمل‌های تغذیه‌ای محرک خون‌سازی به غذای خرگوش‌ها (مانند آغشته نمودن پلت خوراکی حیوان به شربت مکمل)، می‌تواند از بروز آنمی مزمن جلوگیری نماید.

یافته‌ها

تکنیک ارایه شده در مقاله‌ی حاضر برای تولید کمپلمان خرگوش بر روی ۹۱ سر خرگوش سفید نیوزلندی نر و ماده در طی یک دوره‌ی ۳ ماهه اجرا گردید. در این دوره، در مجموع ۱۵۵ مرتبه خون‌گیری در ۱۰ نوبت انجام شد که در هر نوبت، به طور متوسط ۱۷ (۲/۹ ± ۱۷/۲) سر خرگوش خون‌گیری شدند. برای رعایت حداقل فاصله‌ی زمانی مجاز بین دفعات خون‌گیری از هر حیوان، خرگوش‌ها شماره‌گذاری شدند و خون‌گیری از خرگوش‌ها به ترتیب از کمترین شماره آغاز و تا پایان ادامه می‌یافت. سپس خون‌گیری مجدد از خرگوش نخست آغاز می‌گردید. در مجموع ۲۳۸۴ میلی‌لیتر خون (۳/۵ ± ۱۵/۴ میلی‌لیتر خون به ازای هر سر خرگوش) بدین طریق حاصل گردید.

حسب نتایج آزمایش‌های کنترل کیفی، کیفیت کمپلمان تولیدی دچار تغییر قابل مشاهده نشد و در سطح استانداردهای مطروحه بود. تعداد تلفات ناشی از خون‌گیری در خرگوش‌ها در طول دوره‌ی خون‌گیری و تا سه ماه پس از آن معادل صفر بود. برای ارزیابی نتایج مطالعه‌ی حاضر، به سوابق خون‌گیری‌های قبلی به عمل آمده در مرکز مراجعه و مشاهده شد خون‌گیری از قلب در مدت مشابه قبلی دارای ۱۹ سر تلفات بود که از این جهت، روش نوین اختلاف معنی‌داری با روش قبلی داشت ($P < ۰/۰۰۱$).

دستیابی عروقی در تکنیک ارایه شده، در بیش از ۹۰ درصد موارد طی نخستین اقدام موفقیت‌آمیز بود. مهم‌ترین دشواری تکنیکی در انجام این روش، بروز اسپاسم عروقی بود که گاهی انجام خون‌گیری را ناممکن می‌نمود. در تعداد محدودی از خرگوش‌ها، دوز ارایه شده‌ی داروی استیل پرومازین جهت آرام‌بخشی کافی نبود و تجویز دوز اضافه لازم بود.

در مجموع، در ۱۷ مورد از حیوانات خون‌گیری شده، خون‌ریزی خفیف زیرجلدی پس از خون‌گیری رخ داد و لخته‌ی خونی در محل تشکیل گردید که با تشخیص به موقع و مداخله‌ی لازم، حجم خون‌ریزی محدود گردید و در نهایت، موردی از نکروز بافت گوش دیده نشد. در ۴ مورد، شکل‌گیری عروق جدید در اطراف شریان اصلی مشهود بود که حکایت از عدم کفایت نسبی شریان در خون‌رسانی به نواحی دیستال داشت. در هیچ یک از خرگوش‌های خون‌گیری شده، تخریب عروقی به نحوی که شریان در دوره‌ی بعدی خون‌گیری (حداقل ۱ ماه بعد) قابل استفاده نباشد، دیده نشد. به ندرت برخی خرگوش‌ها نسبت به وجود کلیپس بر روی گوش عدم تحمل نشان دادند و سعی در جدا نمودن آن داشتند. در چنین مواردی، حیوان در مدت خون‌بندی تحت نظر بود. همچنین، گاهی پوشاندن سطح پنبه و کلیپس با چسب پانسمان مؤثر واقع می‌شد.

بحث

در مقاله‌ی حاضر، تکنیک خون‌گیری از شریان میانی گوش خرگوش بر پایه‌ی تجربیات کسب شده شرح داده شد. روش ارایه شده در مقایسه با روش ناصحیح و رایج خون‌گیری از قلب، از لحاظ کاهش بروز بیماری/تلفات حیوانات، تفاوت معنی‌داری را نشان داد. چنانچه برخی آثار جانبی داروی استیل پرومازین جهت یک مطالعه‌ی خاص مطلوب نمی‌باشد، لازم است داروی تسکین دهنده/آرام‌بخش (Sedative/tranquiliser) مناسب‌تری نظیر فنتانیل- فلوآنیزون (Hypnorm) استفاده شود (۱۰) یا در نهایت، در صورت عدم امکان استفاده از دارو، از روش‌های صحیح انقیاد فیزیکی خرگوش استفاده گردد (۳) و برای بی‌حس نمودن بهتر پوست و اعصاب شریان گوش، حدود ۱۵ دقیقه قبل از خون‌گیری، مقدار مناسبی کرم لیدوکائین- پریلوکائین بر روی پوست محل عبور شریان میانی گوش تجویز و با بانداژ در محل تثبیت گردد و به دنبال آن، به تجویز داروی لیدوکائین زیرجلدی به روش پیش‌گفته نیز اقدام شود.

در پایان، بر پایه‌ی تجربیات کسب شده در رابطه با تکنیک خون‌گیری از شریان گوش خرگوش‌های آزمایشگاهی، این روش به عنوان روش ارجح خون‌گیری با حجم زیاد از این گونه‌ی حیوانی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسؤولین محترم شرکت مادر تخصصی پالایش و پژوهش خون که امکان اجرای این پژوهش را فراهم آوردند، قدردانی می‌گردد.

References

1. McGuill MW, Rowan AN. Biological effects of blood loss: implications for sampling volumes and techniques. ILAR J 1989; 31(4): 5-20.
2. Parasuraman S, Raveendran R, Kesavan R. Blood sample collection in small laboratory animals. J Pharmacol Pharmacother 2010; 1(2): 87-93.
3. Sarrafzadeh-Rezaei F, Ahmadi-Noorbakhsh S. Management, anesthesia, and surgery of laboratory animals. 1st ed. Urmia, Iran: Urmia University Press; 2010. p. 31-173, 180, 378-81, 403, 414-44, 453-7, 550-64. [In Persian].
4. Mirabzadeh-Ardakani E, Ahmadi-Noorbakhsh S. Euthanasia of laboratory animals. 1st ed. Tehran, Iran: Pasteur Institute of Iran; 2014. p. 147-168. [In Persian].
5. Mobasher M, Aramesh K, Aldavoud SJ, Ashrafganjooei N, Divsalar K, Phillips CJC, et al. Proposing a national ethical framework for animal research in Iran. Iranian J Publ Health 2008; 37(1 (Suppl)): 39-46.
6. Mobasher M, Sasani P, Aldavood SJ, Aramesh K, Larijani B. A Review on Laboratory Animals Work Ethical Guideline. Iran J Med Ethics Hist Med 2012; 5 (Suppl): 70-111. [In Persian].
7. Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA, Lumb WV. Lumb and Jones' veterinary anesthesia and analgesia. 4th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publication; 2007. p. 767.
8. Australian Government, National Health and Medical Research Council. Guidelines to promote the wellbeing of animals used for scientific purposes: the assessment and alleviation of pain and distress in research animals. Canberra, Australia: Australian Government National Health and Medical Research Council Publication; 2008. p. D1-D11.
9. de Blas C, Wiseman J. Nutrition of the rabbit. 2nd ed. Cambridge, MA: CABI Publication; 2010. p. 222-32.
10. Varga M, Harcourt-Brown F. Textbook of rabbit medicine. 2nd ed. New York, NY: Elsevier; 2013. p. 178-201.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 30.03.2015
Vol. 33, No. 338, 2nd Week, August 2015
Accepted: 13.06.2015

Blood Sampling from Laboratory Rabbits

Siavash Ahmadi-Noorbakhsh DVSc[1], Esmat Mirabzadeh-Ardakani DVM[2]

Short Communication

Abstract

Background: Proper method of blood collection (BC) has significant consequences in many biological productions and research activities. Due to the challenges of blood collection from laboratory rabbits, cardiac puncture is routinely performed as the routine method of blood collection in many biological material production and research centres. Besides being ethically unacceptable, this method causes high morbidity and mortality. Furthermore, cardiac puncture is very distressful for anaesthetised animals and greatly disturbs the measured data. The aim of the current study was to provide detailed technical instructions for a superior method of large volume blood collection from laboratory rabbits.

Methods: This study was performed during the course of the complement production from 91 white New Zealand rabbits aging 6-36 months and weighing 1.2-3.5 kg. Acetylpromazine was injected intramuscularly. To avoid vasoconstriction caused by needle puncture, nerves of the central ear artery were blocked via local infiltration of lidocaine. Arterial access was established using modified Butterfly catheters. At the end of the blood collection, arterial haemostasis performed appropriately.

Findings: During 3 months and 155 episodes of blood sampling, 2384 ml blood was collected via this method (15.4 ± 3.5 ml/rabbit). The mortality rate related to the blood sampling method was nil until 3 months following completion of the study which showed significant statistical difference ($P < 0.001$) in comparison to the data retrieved from the archives of the centre regarding previous method of cardiac puncture (mortality = 19 rabbits).

Conclusion: Due to the significantly lower morbidity/mortality of the presented technique, we recommend it as the proper method of large volume blood sampling in laboratory rabbits.

Keywords: Laboratory animals, Sampling, Blood collection

Citation: Ahmadi-Noorbakhsh S, Mirabzadeh-Ardakani E. **Blood Sampling from Laboratory Rabbits.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(338): 917-23

1- Manager, Preclinical Intensive Care Research Unit, School of Anatomy, Physiology and Human Biology, The University of Western Australia, Crawley, WA, Australia
2- Lecturer, Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Centre, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Corresponding Author: Esmat Mirabzadeh-Ardakani DVM, Email: mirabzadeh@pasteur.ac.ir