



کمیته
تحقیقات دانشجویی

فصلنامه علمی دانشجویی (۱۳۹۰)

سال ۹، شماره ۲۵ و ۲۶، پاییز و زمستان ۸۴



انجمن ملی تخصصات پستانداران

معاونت پژوهشی

مدلهای حیوانی در تحقیقات پزشکی و اصول ایجاد مدلهای دیابت، فشارخون و نارسایی قلب

فرزاد عابدی^۱، پریسا نورآبادی^۲

چکیده

امروزه مدلهای حیوانی یکی از عناصر غیرقابل اجتناب در تحقیقات بیولوژی، پزشکی و دیگر زمینه‌های مطالعاتی از قبیل تولید و کنترل داروها، واکنش‌ها و آنتی‌بادیها هستند. برخی از این فعالیتها قرنهاست که انجام می‌شود اما از حدود ۱۵۰ سال پیش به شکل برنامه‌ریزی شده و سیستماتیک امروزی در آمده است (۱). در واقع مدلهای حیوانی آنالوگی از حالات مسبب بیماری در انسان هستند. دو فیلسوف صاحب نظر در این زمینه (Hugh Lafollate و Nial shemks) معتقدند که مدلهای حیوانی اساساً دو کاربرد اصلی دارند: (۱) پی بردن به پاسخ انسان به محرکهای مختلف از قبیل عفونت، تروما، سموم و یا پروسه‌های درمانی و دارویی (۲) ارائه راههای جدیدی در تفهیم خصوصیات آناتومیک، فیزیولوژیک و پاتولوژیک بیماریها (۲). در ابتدای روند پزشکی مدرن تعداد کمی از حیوانات در مطالعات استفاده می‌شدند و یک سیستم تولید حیوانات آزمایشگاهی به منظور انجام مطالعات پزشکی وجود نداشت. افزایش نیاز و تقاضا یک زمینه کاری را برای تولید هدف دار حیوانات آزمایشگاهی به منظور استفاده در مطالعات بیولوژی، پزشکی و داروشناسی را فراهم آورد. روند توسعه این مطالعات مقارن با توسعه علوم پزشکی و پایه در سراسر دنیا بود اما این روند سرعت متفاوتی در کشورهای مختلف داشت (۱). تعداد کل مطالعات حیوانی در سال ۲۰۰۳ در انگلستان ۲/۸ میلیون بوده که نسبت به سال ۲۰۰۲، دو درصد افزایش داشته است. مطالعات صورت گرفته روی مدلهای ژنتیکی (Genetic Modified Animal) نیز افزایشی معادل ۸ درصد داشته است.

۱- دانشجوی سال ششم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان

۲- دانشجوی سال چهارم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان

طریق قراردادن حیوانات در معرض عوامل سرطانزا از قبیل مواد شیمیایی، رادیاسیون، ویروسها و یا تزریق مستقیم سلولهای تومورال و یا به طریق ژنتیکی ایجاد می کنند. حیوان انتخابی در این زمینه تحقیقاتی Mice است.

(۴) دیابت: مدل‌های حیوانی مورد استفاده شامل جوندگان خصوصاً رات‌ها هستند. مشکلی که با این مدلها وجود دارد این است که اغلب بعد از تزریق استریوزوسین (که با تخریب بتاسل های پانکراس سبب ایجاد دیابت می شود) افزایش سطح گلوکز خون که حال مارک دیابت در انسان است، مشاهده نمی شود. از طرفی به دلیل عمر کوتاه این جوندگان امکان بررسی عوارض دراز مدت دیابت که اساسی ترین مشکلات این بیماری در انسان است، وجود ندارد.

(۵) اختلالات مغز و سیستم عصبی: به منظور بررسی اختلالات نورولوژیک و استروک بیشتر از پریماتها استفاده می شود و بیماریهای هسته‌های قاعده‌ای مثل پارکینسون و هانتینگتون را بیشتر در Marmoset ها مطالعه می کنند.

(۶) بیماریهای روانی: مطالعاتی در خصوص استرس‌های اموشنال، اختلالات اضطرابی، افسردگی و شیزوفرنی بر روی مدل‌های حیوانی صورت گرفته است.

(۷) پروسه‌های جراحی (۳)

بعد از این مقدمه کلی در خصوص مطالعات حیوانی به نحوه ایجاد مدل‌های Genetic

از مدل‌های حیوانی در مطالعات پزشکی در زمینه‌های مختلفی استفاده می شود که مهمترین آنها شامل:

(۱) مطالعات دارویی: طبق آمارهای موجود ۵ درصد از کل بیماران بستری در بیمارستانها بدلیل واکنشهای شدید دارویی بستری می شوند و دو درصد از این افراد هم در نهایت می میرند. همین مسئله سبب شده است از حیوانات مدل در مطالعات داروشناسی استفاده شود. مشکلی که با این مطالعات وجود دارد این است که اولاً عوارضی از قبیل سردرد، اختلالات بینایی، سرگیجه و تهوع را نمی توان به آسانی در حیوانات تشخیص داد؛ در حالی که این عوارض از شایعترین شکایات بیماران در مصرف داروها هستند. ثانیاً به علت این که طول عمر حیوانات مدل ۴/۴ تا ۶۶ برابر کمتر از انسان است امکان بررسی عوارض طولانی مدت که بعضاً بعد از چند سال ظاهر می شود، وجود ندارد. مدل حیوانی انتخابی در مطالعات داروشناسی (واکنش های دارویی) میمونها هستند.

(۲) بیماریهای قلبی و استروک: بیشترین علت این بیماریها در انسان آرتریواسکلروزیس است. مدل حیوانی انتخابی برای مطالعات قلبی - عروقی سگها هستند و برای مطالعات استروک هم بیشتر از رات و گربه استفاده می شود.

(۳) سرطانها: بالغ بر ۲۰۰ سرطان مختلف در انسان وجود دارد. مدل‌های حیوانی سرطان را از

برای ایجاد مدلهای G.M بیشتر از رات، مایس، گربه، سگ و پریمات استفاده می‌شود. به دلیل این که این مدلها ساختار بدنی، بیوشیمی، رفتار، نیازها و پاسخهای متفاوتی با انسان دارند ممکن است گاهی حتی در بهترین حالت هم تشابهی سطحی با وضعیت بیماری در انسان داشته باشند. بنابراین علی‌رغم تمام استفاده‌های مثبتی که از مدلهای حیوانی در تحقیقات پزشکی و بیولوژی می‌شود باید این مسئله را هم مد نظر داشت که هیچگاه این مدلها چهره کاملی از تظاهرات فیزیکی و روانی بیماریهای انسان را نشان نمی‌دهند (۳).

نحوه ایجاد مدل حیوانی پر فشاری خون:

مدلهای حیوانی که در HTN، استفاده می‌شود شامل (۱) مدلهای ژنتیکی که خصوصاً مایسها هستند (۲) مدلهای غیر ژنتیکی که بیشتر راتها هستند.

یک مدل نیده آل HTN مدلی است که از نظر آناتومی کاردیوواسکولار، همودینامیک و فیزیولوژی مشابه انسان باشد که البته مدلی که تمامی این خصوصیات را داشته باشد وجود ندارد (۴).

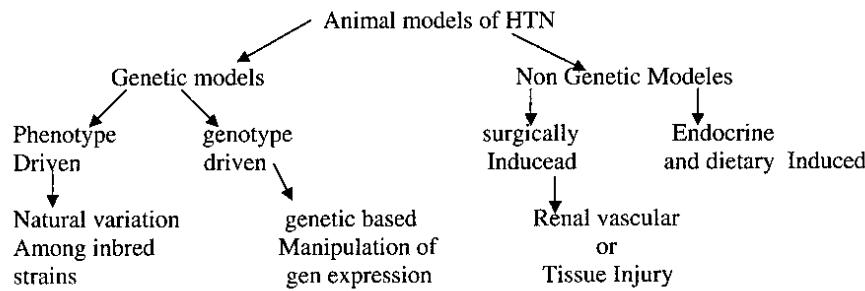
Modified و مدلهای دیابت، *HTN و **H.F می‌پردازیم.

مدلهای ژنتیکی (G.M): آمارهای موجود نشان می‌دهند که استفاده از مدلهای G.M در تحقیقات پزشکی افزایش چشمگیری در سالهای اخیر داشته است، به طوری که در فاصله سالهای ۲۰۰۳-۱۹۹۰ تعداد این مطالعات از ۵۰۰۰۰ به ۷۵۰۰۰۰ رسیده است.

مدلهای G.M تلاش جدیدی در شبیه‌سازی هر چه بیشتر بیماریهای انسان می‌باشند به عنوان مثال در مورد دیابت، آترواسکلروزیس، آسم، فیبروز کیستیک و بسیاری از بیماریهای دیگر به صورت روتین از مدلهای G.M استفاده می‌شود.

نحوه ایجاد این مدلها به این ترتیب است که حیوانات ماده جوان را با تزریق هورمون محرکه فولیکول و لوتئینی سوپراووله کرده تا تعداد بیشتری اووم حاصل شود، سپس اوومها را با اسپرم لقاح داده و داخل رحم می‌فرستند تا به مرحله امبریو برسند در این مرحله امبریو را از رحم خارج کرده و توالی ژنی مورد نظر را به داخل سلولهای امبریو منتقل می‌کنند. در مرحله آخر امبریوی دستکاری شده را وارد رحم حیوان دیگری که از قبل با تزریق هورمون آماده لانه‌گزینی شده است، می‌کنند و بعد از اتمام دوره بارداری مدل را از رحم حیوان خارج می‌کنند.

Hyper Tension *
Heart Failure **



روشهای مختلف ایجاد HTN از طریق جراحی:

الف) بیشترین روش مورد استفاده ایجاد تنگی دو طرفه در شریان کلیوی مدلهاست. از طریق جایگذاری کویل های فلزی در شراین کلیوی یک تحریک مزمن در انتیمای این عروق ایجاد می شود که سبب پرولیفراسیون سلولهای آن و تنگ شدن دیواره عروقی می شود و متعاقب آن جریان خون کلیوی کم شده و ترشح رنین و فعال شدن سیستم RAS (Renin Angiotensin System) سبب افزایش فشارخون می شود (۸). از روشهای دیگر ایجاد تنگی در شریان کلیوی، تنگ کردن شریان با بستن رگ توسط نخ سیلک است به این ترتیب که یک کوآرکتاسیون در خود تائورت درست بالای محل جدا شدن شریان کلیوی ایجاد می کنند. روش کار به این صورت است که بعد از بی هوش کردن حیوان یک آنسزیون در سطح سیزدهمین دنده و با فاصله ۱/۵ cm از ستون

نحوه ایجاد مدلهای ژنتیکی قبلاً ذکر شده است، در این جا به نحوه ایجاد دیگر مدلهای می پردازیم.

1) **Surgically Induced HTN**: اولین مدل HTN ایجاد شده به طریق جراحی را Goldblatt و همکارانش در سال ۱۹۳۴ از طریق تنگ کردن یک طرفه شریان کلیوی در یک سگ ایجاد کردند. به دنبال آن کارهای مشابهی روی رات و خرگوش هم انجام گرفت. (۵۶) HTN ایجاد شده در رات، خیلی بهتر از خرگوش و سگ حفظ می شود. ایجاد یک فشارخون بالا به صورت ثابت در سگ بسیار مشکل است چون ظرفیت سیستم خود تنظیمی کلیه آن بسیار کاراست. با این وجود می توان با جایگذاری یک استنت غیر قابل انعطاف و یا بخیه زدن شریان کلیوی HTN را ایجاد کرد. این فشارخون بالا فقط چند هفته دوام دارد و بعد بدلیل ایجاد کولترال های متعدد مجدداً فشار کاهش پیدا می کند (۷).

ه) ایجاد التهاب و تخریب در پارانشیم کلیه: از طریق تزریق باکتری، جسم خارجی و یا آنتی‌بادی به داخل پارانشیم کلیه است که نتیجه آن تخریب پارانشیم کلیه و HTN است. روشی که امروزه بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد، تزریق فنول در پل تحتانی کلیه است که یک HTN نروژنیک ایجاد می‌کند که احتمالاً از طریق افزایش آنژیوتانسین II عمل می‌کند (۱۳).

۲) Endocrine Induced HTN: ساده‌ترین روش در ایجاد HTN است که تقریباً از ۶۰ سال پیش شناخته شده است. به چند طریق می‌توان HTN را در این روش ایجاد کرد.

الف) تزریق منیرالو کورتیکوئیدها: خصوصاً از دزوکسی کورتیکواسترون استات (DOCA) استفاده می‌شود. این روش در رات و سگ کاربرد دارد ولی در مورد خوک قابل استفاده نمی‌باشد. البته این روش به تنهایی خیلی مؤثر نیست و باید همراه برداشتن قسمتی از بافت کلیه و یا رژیم پر نمک باشد (۱۴).

ب) از تزریق گلوکو کورتیکوئیدها هم برای ایجاد HTN در رات‌ها و مایس‌ها می‌توان استفاده کرد که البته خیلی روش مناسبی نمی‌باشد (۱۵).

ج) انفوزیون مداوم المانهای سیستم RAS هم در ایجاد HTN موفقیت‌آمیز بوده است که سبب ایجاد یک HTN از نوع رنواسکولار می‌شود. انفوزیون مداوم این المانها سبب

مهره‌ها زده می‌شود. ثائورت شکمی را expose کرده و سپس بالاتر از شراین کلیوی هر دو طرف در ثائورت شکمی یک تنگی ایجاد می‌کنند به این ترتیب که یک نیدل با سایز ۲۳ را داخل ثائورت در محل مد نظر قرار می‌دهند و سپس با یک نخ سیلک ثائورت را از روی سوزن می‌بندند، سپس سوزن را از محل خارج کرده و شکم را می‌بندند. تنگی ایجاد شده سبب کاهش جریان خون کلیه می‌شود (۹).

ب) روش دیگری که کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد انسداد کامل هر دو شریان کلیوی است که بیشتر در سگ و خرگوش به هدف افزایش سریع و شدید فشارخون استفاده می‌شود. انسداد شراین کلیوی از طریق فرایند امبولیزاسیون است (۱۰).

ج) پیچیدن کلیه‌ها در یک پوشش سلفان یا سیلک: در این روش اطراف کلیه را سیلک یا سلفان می‌پوشانند که سبب ایجاد پری نفریت و فشار روی بافت پارانشیم کلیه می‌شود. احتمالاً این روش هم از طریق افزایش RAS عمل می‌کند (۱۱).

د) نفرکتومی توتال یا ساب توتال: از روشهای دیگر ایجاد HTN است. میزان دریافت سدیم، مقدار پروتئین رژیم غذایی، میزان دریافت آب و باقی گذاشتن یا نگذاشتن غده فوق کلیوی روی نتیجه حاصله بسیار مؤثر است (۱۳).

سدیم متوهگزیئال استفاده شده باشد مورتالیته در عرض ۲۴h اول ۲۰٪ است (۱۹).

(۲) روش دیگری که در ایجاد نارسایی قلب معمول است ایجاد Aortic Stenosis است که بعد از انسزیون توراکس یک هموکلپ فلزی را در محل نائورت صعودی قرار می دهند. حدود ۴ هفته بعد از عمل مدلها به یک نارسایی قلبی مزمن مبتلا می شوند. بستن شریان نائورت سبب یک کاردیومیوپاتی هایپروتروفیک و سپس نارسایی قلب می شود (۲۲).

در برخی از مطالعات برای ایجاد نارسایی قلبی از سگ استفاده شده است روش کار به این ترتیب است که ابتدا ۱۲ ساعت قبل از جراحی ۵۰ mg/kg فتانیل را به صورت ترانس درمال به سگ تزریق می کنند. بعد از ۱۲ ساعت ۳۰-۲۰ mg/kg فنوباریتال سدیم را به صورت اینتراپرتونال تزریق کرده و در نهایت برای تکمیل بی هوشی ۲۰-۱۰ mg/kg تیوپنتال سدیم را به صورت داخل وریدی تزریق می کنند. بعد از اتوبه کردن حیوان، بی هوشی ایجاد شده را با تجویز ایزوفلوران ۱/۵-۰/۵ درصد از طریق ونتیلاتور حفظ می کنند. به منظور پروفیلاکسی عفونت هم درست قبل از جراحی، ۱ گرم سفازولین به صورت IV تزریق می گردد.

روش جراحی به این ترتیب است که ابتدا از طریق پنجمین فضای بین دنده ای چپ توراکس را باز می کنند، سپس پریکارد را باز

Vascular Remodeling در عروق پری گلومرولار و نهایتاً ایجاد HTN می شود (۱۶).

(۳) Diet Induced HTN: معمولاً صرف به کارگیری یک رژیم پر نمک سبب ایجاد HTN در مدل های حیوانی نمی شود مگر در مواردی که مدل از قبل یک اختلال ژنتیکی (مثل راتهای حساس به نمک) داشته باشند (۱۷). رژیم با سطح بالای فروکتوز هم از طریق down regulation رسپتور انسولین و Up Regulation رسپتور آنژیوتانسین I، سبب HTN می شود (۱۸).

نحوه ایجاد مدل های آزمایشگاهی نارسایی قلب:

(۱) شایعترین روش مورد استفاده در ایجاد نارسایی قلبی ایجاد انفارکتوس در بافت عضله قلب است که از طریق بستن شریان کرونری میسر می شود. روش کار به این ترتیب است که ابتدا راتها را با فنوباریتال (۵۰ mg/kg) تزریق داخل صفاقی (۱۹) و یا Na. methohexital بی هوش می کنند. گاهی برای بی هوش کردن رات ها از xylazine (۱۰ mg/kg) (۲۰) و یا Katamin (۵۰ mg/kg) (۲۱) استفاده می شود. بعد از بی هوشی، حیوان را اتوبه کرده و به ونتیلاتور وصل می کنند و سپس شریان کرونری چپ را از فاصله ۲mm اوریزین آن با نخ سیلک 5.0 سوچور زده و می بندند. میزان مورتالیته در این روش اگر برای بی هوش کردن رات از پنتو باریتال استفاده شده باشد در عرض ۴۸h اول ۴۰ درصد است. اما اگر از

شب کامل ناشتایی به صورت *Intra peritoneal* تزریق می کنند. *STZ* سبب تخریب سلولهای بتای پانکراس می شود. بعد از ۲۴ ساعت مقدار گلوکز خون را اندازه گیری می کنند که اگر بیشتر از 200 mg/dlit باشد دیابت تلقی می شود (۲۵). داروهایی که در ایجاد دیابت مورد استفاده قرار می گیرند باید در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شوند تا از دژنراسیون آنها جلوگیری شود (۲۶). می توان استرپتوزوسین را به صورت داخل وریدی هم تزریق کرد که به مقدار 65 mg/kg از استرپتوزوسین را در بافر سترات سدیم $0/1$ مولار سرد با $\text{PH} = 4/5$ حل کرده و سپس تزریق می کنند.

۳) تجویز دیگر داروهای دیابتوزیک
مثل دیتی زونا، آلوکسان، سرم آنتی انسولین. آلوکسان یک مشتق اسیداوریک است که در استفاده از آن مورتالیتی رات ها کمتر از دیگر داروها است. این دارو ۲۴ ساعت بعد از تزریق یک دیابت غیرقابل برگشت ایجاد می کند. روش کار به این ترتیب است که بعد از ۴۸ ساعت ناشتایی رات را بی هوش کرده و سپس 40 mg/kg آلوکسان را که در سالی ۰/۹ درصد رقیق شده است به صورت تک دز به داخل ورید *Penis* تزریق می کنند. در این روش ۴۰٪ رات ها مبتلا به دیابت مزمن شده و ۲۰ درصد یا اصلاً مبتلا نمی شوند و یا دیابت خفیفی می گیرند و ۴۰

کرده و آویزان می کنند. اولین شاخه دیاگونال شریان کرونری پائین رونده چپ را به اندازه حدود ۲ cm آزاد کرده و ناحیه دیستال آن را لیگاتور می کنند. در مرحله بعدی قبل از بستن *chest tube* یک *32-F* را در محل ششمین فضای اینترکوستال سمت راست در محل خط آگزیلاری قدیمی قرار داده و به ساکشن متصل می کنند. برای ثابت کردن دنده ها در محل خود از ۳-۴ سوچور *O.vicryl* استفاده می شود و استرونوم را هم از طریق سیم استیل 4.0 می بندند. (۲۳).

نحوه ایجاد مدلهای آزمایشگاهی دیابت

دو روش اصلی برای ایجاد دیابت در حیوانات آزمایشگاهی وجود دارد.

۱) جراحی: در این روش *Partial pancreatectomy* می کنند. ابتدا رات ها را بوسیله ترکیبات بی هوش کننده (پنتوباریتال یا ایزوفلوران) بی هوش می کنند و بعد از یک انسزیون مدلاین شکم، پانکراس در دسترس قرار می گیرد. باید در حدود ۷۰-۶۰ درصد بافت پانکراس به آرامی با *cotton swab* برداشته شود. به عبارتی تنها قسمتی از بافت که بلافاصله مجاور دئودنوم است را باقی می گذارند، سپس دیواره شکم را با سیلک 5.0 می دوزند (۲۴).

۲) تجویز استرپتوزوسین: در این روش 200 mg/kg استرپتوزوسین را پس از یک

درصد هم در طول هفته اول بعد تجویز دارو، عموماً به دلیل اسیدوز تلف می‌شوند (۲۸-۲۷).

References:

1. Andre M, Animal experiments, march 2005, ISBN: 0-9545115-9-x
2. Stephen R,: perspectives on medical Research, rolume 4, 1993.
3. Stian E,: History of the Inter National council for laboratory animal science, 2004.
4. White CJ, ... : an atherogenic Model to assess early patency Rats of an endovascular stent
5. Wilson C,: Renal changes in malignane Hyper tension, lan cet: 1939: 1: 136-9
6. Pickering G,: Experimental Hypertension of Renal origion in Rabbit, clim sci 1937, 3: 327-68
7. Watkins BE, ... INcidense and pathophysiological changes In chronic tow-kidney Hypertension in the dog, Am J physiol, 1976, 231: 954-60
8. Lerman L,: Increased oxidative stress in experimental Reno rascular Hyper tension, 2001, 34: 541-6.
9. Nod virrizi,: Expression of Nox-I in the Aorta segments abore and below coarctation, Biochimica Biophysica Acta, 2005, 321-327
10. Moore S,: Micro embolic Renal Ischemia- Hypertension and Nephro sclerosis, Arch pathol 1968, 85: 623-30
11. Diamond JA,: Hypertension due to prinephric compression, Am J Hyperten, 2001, 14: 305
12. Katki KA, ... : Substance p in subtotal Nephrectomy Hypertension, 2002: 39: 389-93
13. Ye S,: Losartan Reuce central and peripheral sympathetic nerre Actevity in a rat model of HTN, 2002: 39: 1101-6
14. Terris JM,: Deoxy corticosterone HTN in the pig, clin sci 1979: 3
15. Dahl LK,: Effects of chronic excess salt Ingestion, J Exp med, 1965: 222: 533-45
16. Reckellhof JF,: Sub pressor dose of AT II, HTN 2000, 35: 476-9.
17. Dahl LK,: salt and HTN, Clin Nucev, 1972.
18. Hwang IS,: Fructose Induced HTN IN Rats, 1987: 10: 512
19. YOuhua Z,: Sympathetic Inhibition with clonidine in experimental chronic Heart failure, J cardiol 2000, 157-162.
20. Paul M,: Selective ETA receptor blockade prevcnt left renticular remodeling , cardio vascular Research 39 (1998) 600-608.
21. Cheuk M,: Normalization of Renal aquaporinez water channel expression by fosino pril, valsartan in congestive heart failure, j mol cardiol, 2004, 445-453.
22. Elvira D,: Cardiaie and skeletal muscle energy metabolism in heart failure, cardio vascular Research (2002) 260-268.
23. Mikhail V, ... : Telemetrically monitored arrhythcmogenic effects of doxorubicin in a dog model of H. failure , patho physiol, (2003) 241-248.

24. Andreas L, ...: No evidence for significant transdifferentiation of Bone marrow into pancreatic B-cells in vivo
25. M. Maghrani, ...: study of hypoglycemic activity of fraxinas excelsior in an animal model of type 1 diabetes mellitus, J ethnopharma, 2004, 309-310.
26. Address A, ...: Regeneration of pancreatic BCells from intra-islet precursor cells in an experimental model of Diabetes.
27. Ahren R, ...: Long term effects of Aloxan induced hyperglycemia in rats, int J pancreatol, 1995: 2: 197-201.
28. Bhattacharya SK, ...: Activity of shilligit on aloxan Induced hyperglycemia in Rats, 1995, 116: 328-32.