

آزمایشگاه داروشناسی

تهیه و تدوین: دکتر منظومه شمسی میمندی

دکتر غلامرضا سپهری

واحد عملی داروشناسی دانشجویان پزشکی

دانشکده پزشکی افضلی پور

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

مقدمه:

آثار بسیاری از داروها از طریق آزمایش بر روی حیوانات آزمایشگاهی مشخص می گردد. در واقع شناخت آثار درمانی و عوارض جانبی داروها، ابتدا در حیوانات آزمایشگاهی به اثبات رسیده و سپس روند توسعه داروها و آزمایشات گسترده تری طراحی می گردد. بنابراین طرز کار کردن با حیوانات آزمایشگاهی جزو مواردی است که تمام محققین باید با آن آشنائی داشته باشند. بدین معنی که جهت بررسی اثرات داروها محقق باید بتواند حیوانات فوق را مقید نموده و عملیات آزمایشگاهی را بر روی آنها به انجام رساند. بدین منظور در این قسمت نحوه مقید کردن حیوانات آزمایشگاهی و روش تزریق بر آنها توضیح داده می شود.

الف) مقید کردن حیوانات آزمایشگاهی

هدف: مقید کردن حیوانات آزمایشگاهی و آموزش روشهای تزریق

موش سوری

جهت مقید کردن موش سوری حیوان را از انتهای دم گرفته و از قفس خارج می کنیم سپس حیوان روی توری قرار داده و کمی دم آنرا می کشیم. حیوان بطور رفلکسی با دست و پاهایش محکم به توری می چسبد. در حالیکه حیوان بصورت کشیده قرار دارد با دو انگشت شست و سبابه دست راست از پشت

گوش پوست گردن او را گرفته و با دست چپ دم او را کشیده نگاه می داریم. سپس حیوان را روی دست راست بر می گردانیم بدین طریق حیوان در دست راست بصورت خوابیده به پشت قرار می گیرد. میتوان با انگشت کوچک دست راست دم او را ثابت نگاه داشت تا بتوان به تنهایی به حیوان تزریق کرد.

موش صحرائی (رات):

مقید کردن موش صحرائی از موش سوری دشوارتر است زیرا جثه حیوان بزرگتر است و خطر گاز گرفتن وجود دارد. بدین منظور بایستی از دستکش های ضخیم استفاده نمود. ولی روند مقید کردن همانند موش سوری است. در صورت کمبود دستکش میتوان مانند موش سوری حیوان را از انتهای دم گرفته و روی سطح صافی قرار داد. سپس پارچه کلفتی روی آن انداخت بطوریکه توانایی دید نداشته باشد بعد مانند موش سوری (از روی پارچه) در امتداد دو گوش پوست گردن او را گرفته و حیوان را مقید کرد.

خرگوش

خرگوش اغلب حیوان آرامی است لذا کافی است که دو گوش حیوان را با یکدست بگیریم و با دست دیگر پاهای حیوان را نگه داریم یا اینکه آنرا با دو گوش گرفت و با دست دیگر از ناحیه کمر روی سطح صافی مقید کرد.

ب - روشهای تزریق به حیوانات آزمایشگاهی ID,SC,IV,IP

- **تزریق داخل صفاقی (IP):** تزریق داخل صفاقی معمول ترین روش تزریق به حیوان آزمایشگاهی می باشد پس از مقید کردن حیوان ناحیه شکم حیوان کاملاً در اختیار قرار می گیرد. جهت تزریق بایستی ناف حیوان را پیدا کرد و در امتداد پا دو خط فرضی رسم نمود در وسط خط فرضی میتوان محلول دارویی با زاویه بیش از ۴۵ درجه تزریق کرد برای غیر پستانداران مانند قورباغه بایستی سطح شکم را با سه خط افقی فرضی و یک خط عمودی به سه قسمت مساوی تقسیم کرد و تزریق را در مرکز دو قسمت انتهایی با زاویه بیش از ۴۵° انجام داد.

برای قورباغه و موش سوری تا ۰/۵ cc برای موش صحرای تا ۱ cc و برای خرگوش تا ۵ cc تزریق مطلوب می باشد.

تزریق وریدی (IV): غالبا" برای حیوانات کوچکتر مانند موش سوری و قورباغه این نوع تزریق انجام نمی گیرد. در خرگوش تزریق وریدی در ورید حاشیه ای گوش Marginal vein امکان پذیر می باشد. بدین منظور ابتدا انتهای وریدی گوش حیوان را محکم گرفته تا خون جمع شده و متورم شود. سپس نوک سرنگ انسولین را به اندازه ۱ الی ۲ میلیمتر داخل ورید می کنیم. اگر در ابتدای تزریق محل مربوطه متورم شود سرنگ در ورید نیست. لذا بدون خارج کردن سرنگ آنرا جابجا می کنیم تا وارد ورید شود در صورت ورود به ورید، امتداد ورید بیرنگ می شود سپس به آرامی تزریق صورت می گیرد. بهتر است موهای گوش حیوان در محل تزریق تراشیده و ضد عفونی گردد. هنگام تزریق وریدی یک نفر حیوان را مقید کرده و دیگری تزریق را انجام می دهد. حجم تزریق حداکثر ۰/۵ سی سی می باشد. جهت تزریق وریدی به موش صحرایی میتوان بدین روش عمل کرد. اگر ابتدای دم حیوان را برای مدتی محکم نگهداریم در امتداد ورید دم خط نسبتا" تیره ای ایجاد می شود که تزریق در دم حیوان را انجام پذیر می سازد. در حالیکه دم حیوان ثابت نگهداشته شده است سرنگ انسولین را به اندازه ۱ الی ۲ میلیمتر در ورید فرو برده می شود سپس همانطوریکه در مورد خرگوش ذکر شد از صحت تزریق مطمئن شده و به آرامی تزریق انجام می شود. به موش صحرایی حجم حداکثر ۲^{cc} قابل تزریق می باشد. هنگام تزریق یک نفر حیوان را مقید کرده و دیگری تزریق را انجام می دهد.

تزریق عضلانی (IM):

این نوع تزریق در حیوانات بزرگتر مانند سگ، گربه، خرگوش و رات انجام می گیرد. محل تزریق عضله پشت پا می باشد پس از مقید کردن و ضد عفونی محل سرنگ را تا حدود ۱ سانتیمتر در عضله فرو کرده و تزریق را به آرامی انجام می گیرد.

تزریق زیر پوستی (SC):

در تمام حیوانات آزمایشگاهی انجام می شود پوست پشت ران یا سینه یا شکم را با دو انگشت سبابه و شست کمی بالا می کشیم . بین دو انگشت مثلثی ایجاد می شود مرکز مثلث محل تزریق می باشد که سرنگ را ۱ الی ۲ میلیتر فرو کرده و محلول داروئی تزریق می شود. در موش سوری ۰/۱ تا ۰/۲ میلی لیتر می توان تزریق کرد در حالیکه در حیوانات بزرگتر مانند خرگوش تا ۰/۵ سی سی محلول داروئی قابل تزریق می باشد.

تزریق داخل پوستی (ID):

این نوع تزریق در قسمتهایی که فاقد مو است میسر است بنابر این در کف پا و یا قاعده دم حیوان انجام می شود.

تزریق با سرنگ انسولین انجام می شود برای حیوانات کوچک مانند موش سوری حداکثر حجم تزریق ۰/۱ سی سی می باشد در حالیکه در رات و خرگوش تا ۰/۳ الی ۰/۴ سی سی نیز انجام پذیر است. از این رو سرنگ حدود ۰/۵ میلی لیتر در پوست حیوان بطور مورب فرو کرده و به آرامی حجم تزریق را داخل می کنیم. این تزریق بایستی به آرامی صورت گیرد و بهتر است محل تزریق ضد عفونی شود.

تمرین: دانشجویان بایستی مقید کردن حیوانات موجود در آزمایشگاه را انجام داده و حداقل تزریق داخل صفاتی و عضلانی را انجام دهند.

وسایل مورد نیاز – محلول فیزیولوژیک به تعداد دانشجویان سرنگ انسولین و سرنگ ۲^{cc}, ۵ جفت دستکش باغبانی کلفت جهت گرفتن موش صحرائی

مقدمه :

در بسیاری از آزمایشات لازم است که داروئی با غلظت های معین تهیه و مورد استفاده قرار گیرد. لذا آشنائی با نحوه تهیه محلولهای مختلف می تواند کمک مؤثری در امر فوق بنماید. بدین منظور روش های مختلف تهیه محلولهای داروئی در این مبحث بیان می گردند.

هدف آشنائی با مراحل استاندارد کردن داروها و تهیه محلولهای دارویی بر اساس درصد حجمی $V/V\%$ و یا درصد وزنی $W/W\%$

الف: استاندارد کردن داروها

ب: تهیه محلولهای داروئی

تهیه این محلولها بسیار ساده بوده و معمولاً مقدار مشخص توزین شده و سپس به حجم مورد نظر رسانده می شود. تهیه این محلولها بسیار ساده بوده و معمولاً "به مقدار مشخص توزین شده و سپس به حجم مورد نظر رسانده می شود.

جهت تهیه محلولهای رقیق از محلولهای غلیظ از فرمول $C_1V_1=C_2V_2$ استفاده می شود

مثال: جهت ۲۰CC محلول آب اکسیژنه ۱۰٪ چه حجمی از آب اکسیژنه ۴۰٪ مورد نیاز است؟

$$\begin{array}{lcl} C_1V_1=C_2V_2 & V_2=x & C_2=40\% \rightarrow V_1=20cc \quad C_1=10\% \\ V_2=5^{cc} & 10 \times 20 = 40 \times V_2 & \end{array}$$

بنابر این ۵ CC محلول آب اکسیژنه ۴۰٪ را با افزودن آب مقطر به حجم ۲۰CC می رسانیم

در تهیه محلولهای داروئی برای حیوانات آزمایشگاهی در نظر گرفتن حجم تزریق حداکثر اهمیت بارزی دارد.

مثال: دوز مورد نیاز تیوپنتال برای ایجاد بیهوشی در موش سوری ۳۰-۵۰mg/kg می باشد. داروی فوق

بصورت ویال های ۵۰۰ میلی گرمی در ۱۰ سی سی محلول در بازار داروئی موجود است . با توجه به اینکه

حداکثر ۰/۵ سی سی از داروی فوق را می توان جهت ایجاد بیهوشی در موش سوری استفاده نمود. لذا اگر

وزن موش سوری بین ۲۵ تا ۵۰ گرم در نظر گرفته شود میزان داروی مورد نیاز جهت ایجاد بیهوشی ۲/۵ میلی گرم می باشد. لذا با توجه به مطالب فوق محلول تزریقی مورد نیاز در موش صحرایی بایستی حاوی ۵ میلی گرم تیوپنتال د رهر سی سی باشد. جهت تهیه محلول فوق می توان بدین صورت عمل کرد. ابتدا یک سی سی از محلول $10^{cc}/mg$ ۵۰۰ داروی فوق را به حجم ۱۰ سی سی می رسانیم که در این صورت غلظت محلول $50 mg/ml$ می شود و سپس می توان با تزریق حدود ۰/۵ سی سی از این محلول حیوان را بیهوش نمود. حال اگر موش سوری ۴۰ گرم وزن داشته باشد حجم تزریق ۰/۴ سی سی می باشد.

تمرین :

- (۱) برای تهیه ۵۰ سی سی از محلول اپی نفرین $1/10000$ چه مقدار اپی نفرین $1/1000$ مورد نیاز است.
 - (۲) با یک شیشه ۵۰ میلی لیتر حاوی محلول ساو لن ۳۰ درصد چه میزان ساو لن ۵ درصد می توان تهیه نمود.
 - (۳) برای ایجاد بیهوشی با تیوپنتال در موش صحرایی چگونه محلول مورد نیاز را باید تهیه نمود . وزن موش صحرایی ۲۵۰ گرم و دوز داروی بیهوش کننده $50 mg/kg$ می باشد.
- اگر مقدار مورد نیاز جهت بیهوش کردن موش صحرایی $40 mg/ml$ تیوپنتال باشد . با توجه به وزن موشهای صحرایی که از $200-400 g$ می باشد و حداکثر حجم تزریقی به طریق I P یک سی سی بوده محلول مناسب را تهیه کنید.
- وسایل مورد نیاز: ۵ لیتر سرم فیزیولوژیک ، ۱۰ بشر ۱۰ سی سی و ۵۰ سرنگ انسولین و تیوپنتال ، اپی نفرین $1/1000$ محلول ساو لن ۳۰ درصد

در بسیاری از آزمایش های فارماکولوژیک لازم است که حیوانات مورد بررسی بیهوش باشند. بطور مثال جهت بررسی آثار داروها بر سیستم اعصاب مرکزی، قلب و گوارش آزمایشات بر حیوانات بیهوش انجام می گیرد. داروهای بیهوش کننده به دو دسته داروهای بیهوش کننده استنشاقی و بیهوش کننده تزریقی تقسیم می شوند.

مراحل مختلف بیهوشی با مشاهده تغییرات در رفلکسها و اعمال حیاتی مانند تنفس و ضربان قلب قابل تشخیص است. این مراحل شامل:

- مرحله اول: یا مرحله بی دردی، در این مرحله تمام رفلکسهای ارادی و غیر ارادی وجود دارند فقط قطر مردمک کمی افزایش یافته و تنفس نامنظم می شود.
- مرحله دوم: یا هیجان، تحریک، دلیریوم، رفلکسهای غیر ارادی وجود دارند اما ضربان قلب و تنفس افزایش می یابد در این مرحله نیستگموس یا حرکات تند کره چشم قابل مشاهده است.
- مرحله سوم: یا مرحله بیهوشی جراحی، در این مرحله امکان عمل جراحی وجود دارد. متناسب با عمق بیهوشی این مرحله به چهار پلان تقسیم می گردد. که بهترین پلان برای انجام اکثر اعمال جراحی پلان دوم است. در پلان سوم و چهارم بیهوشی عمیق است.
- مرحله چهارم: مرحله دپرسیون بصل النخاع در این مرحله بصل النخاع از کار می افتد. بنابر این اعمال حیاتی مانند تنفس و قلب مختل شده و حیوان می میرد و مرگ او به علت فلج بصل النخاع برگشت ناپذیر است.

روش ایجاد بیهوشی:

مشاهده برخی از رفلکسها و مراحل بیهوشی:

رفلکس پلکی: این رفلکس در رات و در خرگوش بهتر دیده می شود. از اینرو پنبه ای را بصورت یک نخ باریک در آورده و به گوشه داخلی چشم حیوان نزدیک می کنیم. بدون برخورد به چشم، حیوان بصورت رفلکسی پلک خود را می بندد.

رفلکس قرنیه ای: پنبه باریکی را روی سطح قرنیه قرار می دهیم و در مراحل مختلف بیهوشی عکس العمل حیوان را یاد داشت می کنیم. (در حیوان هوشیار این رفلکس اندازه گیری نمی شود).

تعداد ضربان قلب: تعداد ضربان قلب این حیوانات بالا می باشد از اینرو شمارش تعداد ضربانات قلب در حیوانات آزمایشگاهی مشکل است. با وجود این در بیهوشی کامل نیز افزایش می یابد.

تعداد تنفس: در مراحل مختلف بیهوشی تعداد تنفس و نوع تنفس تغییر می کند. اگر حیوان را به پهلو بخوابانیم تعداد تنفس را در هر مرحله میتوان اندازه گیری کرد. بعلاوه در مراحل مختلف نوع تنفس میتواند سینه ای و یا شکمی باشد.

رفلکس پدال: اگر تاندون آشیل پای حیوان را با یک پنس فشار دهیم بطور رفلکسی پای خود را عقب می کشد در برخی از مراحل بیهوشی این رفلکس از بین می رود.

قطر مردمک: از ابتدای بیهوشی قطر مردمک شروع به افزایش می کند و در اغلب مراحل بعدی افزایش می یابد در صورت فلج بصل النخاع اتساع کامل می باشد.

داروهای بیهوش کننده استنشاقی جهت بیهوش کردن حیوان می توان از اتر و یا کلروفرم بصورت استنشاقی استفاده کرد. بدین منظور ابتدا پنبه ای را به اتر آغشته نموده و حیوان را با این پنبه زیر بشر بیهوش کرد می توان از ماسک نیز استفاده کرد.

داروهای بیهوش کننده تزریقی: داروهای بیهوش کننده تزریقی رایج برای حیوانات آزمایشگاهی کتامین و یا باربیتوراتها می باشد. دوز مورد نیاز در خرگوش 45mg/kg به طریق داخل عضلانی می باشد. در حالیکه

دوز مورد نیاز موش صحرایی 50-100mg/kg و موش سوری 20-30mg/kg بصورت داخل صفاقی می باشد. جهت ایجاد بیهوشی با تیوپنتال در خرگوش 30-50mg/kg به طریق داخل وریدی و در موش صحرایی 30-40mg/kg و موش سوری 40-80mg/kg از طریق داخل صفاقی تزریق می شود.

دستور کار: هر گروه ۷ نفری از دانشجویان به یکی از روشهای فوق حیوان آزمایشگاهی را بیهوش کرده و تغییرات اعمال حیاتی در رفلکسها را با ذکر مراحل بیهوشی مطابق جدول زیر پر می کنید.

مرحله	تونوس عضله	تعداد تنفس در دقیقه	تعداد ضربان در دقیقه	قطر مردمک	رفلکس پلکی	رفلکس قرنیه	نیستایگموس

وسایل مورد نیاز: اتر، کلروفرم، سرنگ، تیوپنتال، کتامین

سیستم خود مختار یا سیستم اتونومیک و یا سیستم خودکار شامل دستگاه سمپاتیک و پاراسمپاتیک می باشد. اعمال حیاتی فرایند تضاد این دو سیستم می باشد. در برخی از قسمتها ی بدن دستگاه سمپاتیک و در برخی دیگر پاراسمپاتیک تون غالب دارد. بطور مثال در دستگاه گوارش هر گاه سیستم سمپاتیک فعال شود کاهش فعالیت های گوارشی از جمله حرکات دودی روده و معده مشاهده می شود در حالیکه فعال شدن سیستم پاراسمپاتیک منجر به افزایش این فعالیتها می شود. بنابراین در دستگاه گوارش پاراسمپاتیک تون غالب دارد در حالیکه در عروق، سیستم سمپاتیک تون غالب را ایجاد میکند. در این آزمایش آثار داروهای محرک سمپاتیک و پاراسمپاتیک را در دستگاه گوارش موش سوری و رات و در چشم خرگوش بررسی می شود.

هدف بررسی آثار داروهای مؤثر بر سیستم عصبی خودکار:

حیوان : خرگوش

داروهای مورد نیاز ، پیلو کارپین ۱ درصد، (آدرنالین ۰/۱ درصد)، آتروپین ۱ درصد

روش آزمایش ، چشم راست خرگوش را از نظر قطر مردمک مشاهده می کنیم سپس چند قطره پیلوکارپین ۱

درصد در کیسه پلک زیرین او می ریزیم و چند دقیقه پلک را می بندیم . قطر مردمک را بین دو چشم

مشاهده و مقایسه می کنیم سپس رفلکس نور با چراغ قوه را نیز انجام داده و مجدداً " قطر مردمک را بین

دو چشم بررسی می کنیم . در مرحله بعدی در هر دو چشم همان حیوان چند قطره

آتروپین ۱٪ ریخته و مشاهدات را مقایسه می کنیم مجدداً " سه قطره در چشم راست ریخته و مشاهدات را

مقایسه می کنیم.

جدول زیر را پر کنید

چشم راست		چشم چپ		مرحله
قطر قرنیه	رفلکس نوری	قطر قرنیه	رفلکس نوری	
				۱) پیلوکارپین در چشم چپ
				۲) پیلوکارپین + آتروپین در چشم چپ
				۳) آتروپین در هر دو چشم

جهت بررسی اثرات داروها بر حرکات دستگاه گوارش و عضلات صاف از محلول ۱ درصد اتروپین و محلول نئوستیگمین ۲,۵mg/ml از طریق داخل صفاقی استفاده می کنیم و علایم تحریک موسکارینی که شامل افزایش ترشح بزاق، اشک و افزایش حرکات روده، تکرر ادرار می باشد در موش سوری، رات و خرگوش بررسی می کنیم.

سپس با تزریق نئوستیگمین در موش سوری و یا موش صحرایی مشاهدات خود را بصورت گزارش کار تهیه کنید.

داروهایی که از سد خونی مغزی عبور کرده و وارد سیستم اعصاب مرکزی می شوند ممکن است آثار متعددی را بر قسمت های مختلف مغز بگذارند. بعضی از این آثار به عنوان اثر درمانی و بعضی از آثار جزو عوارض نامساعد داروها محسوب می گردند. دلیل این امر وجود نوروترانسمیترهای مختلفی است که در مناطق مختلف مغز وجود دارند و تحت تأثیر داروهای مختلف اثر این نوروترانسمیترها تشدید و یا تضعیف میگردد. لذا آزمایشات مختلفی صورت می گیرد تا آثار متعدد داروهای مؤثر بر سیستم اعصاب مرکزی مورد مطالعه و ارزیابی قرار گیرد. داروهای ضد درد مخدر (از جمله مرفین) جزو پر مصرفترین داروهایی هستند که جهت تسکین دردهای شدید و همچنین در بیهوشی مورد استفاده قرار می گیرند ولی آثار دیگری را نیز ایجاد می کنند که ربطی به اثرات درمانی آنها ندارد. در این آزمایش تعدادی از این آثار مرفین (اثر کاتالپتوئیدی) در موش های سوری مورد مطالعه قرار می گیرند و سپس اثرات ضد دردی مرفین توسط آزمون های رایج اندازه گیری درد مورد بررسی قرار می گیرند.

مطالعه اثر کاتالپتوئیدی مرفین

به سه عدد موش سوری مقادیر $15, 5, 1 \text{ mg/kg}$ مرفین سولفات از طریق زیر جلدی تزریق می شود. بعد از چند دقیقه آثار زیر مشاهده میشود.

۱) Ataxia: یا عدم تعادل در حرکات (مانند تلو تلو خوردن) مشاهده می شود

۲) Catatonia: حیوان را در هر حالتی که قرار دهیم در همان حالت می ماند

۳) Straub Tail: دم حیوان بصورت عمود بر بدن افراشته می ماند

دلیل هر یک از این آثار را بنویسید.

پس از تزریق مرفین و مشاهده آثار فوق یکی از تستهای درد Tail f lick و یا Hot plate و یا

آزمون اسید استیک را بر حیوان انجام دهید.

مواد مورد نیاز: مرفین خالص، دیکلوفناک: محلول سرم فیزیولوژی، سرنگ

مقدمه:

درد جزو علائم بیماری است و تسکین آن از حقوق اساسی بیمار محسوب می شود. دردها را می توان بر اساس دردهای حاد و مزمن طبقه بندی کرد و یا می توان به دردهای التهابی، نوروزنیک، سوماتیک، حرارتی و فشاری و غیره... تقسیم بندی کرد.

جهت ایجاد درد در حیوانات آزمایشگاهی روش های مختلفی استفاده می شود که در این آزمایش شرح داده می شوند و سپس چگونگی اثر ضد دردی داروها مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

هدف: یادگیری آزمونهای درد و اندازه گیری اثر داروهای ضد درد با این آزمونها

جهت ایجاد درد التهابی میتوان از فرمالین تست استفاده کرد در حالیکه با بستن عصب سیاتیک درد نوروزنیک ایجاد می شود.

ایجاد و اندازه گیری درد احشایی:

درد احشایی با تزریق داخل صفاقی مواد محرک مانند محلول فرمالین ۱٪ و یا محلول اسید استیک ۱/۲٪ ایجاد میشود. از اینرو به یک موش سوری بالغ 0.1mg/kg از محلول اسیداستیک فوق بصورت IP تزریق میشود. پس از چند دقیقه رفتار writhing در حیوان ظاهر میشود. این رفتار شامل انقباضات شکمی خاص می باشد و حیوان شکم خود را موازی با سطح افق می کشد در حالیکه همزمان دستها را به جلو و پاها را به عقب می کشد. گاهی همراه با کشیدگی بدن به یک طرف خم میشود. میزان درد احشایی با تعداد این انقباضات در بلوکهای زمانی اندازه گیری میشود.

ایجاد و اندازه گیری درد حرارتی

الف - آزمون هات پلیت هات پلیت صفحه داغی است که دمای آن بوسیله یک ترموستات حساس ثابت نگه داشته میشود. روی این صفحه داغ یک محفظه شفاف قرار دارد تا از فرار حیوان جلوگیری کند. برای اندازه گیری درد حرارتی می توان دمای دستگاه را در فاصله ۵۰ تا ۶۵ درجه سانتیگراد تنظیم کرد.

وقتی دمای صفحه ثابت شد حیوان (موش سوری، رات) را روی صفحه داغ گذاشته و مدت زمانی که طول می کشد تا حیوان به محرک دردناک پاسخ دهد اندازه گیری می شود. لذا ابتدا دم حیوان را گرفته و آنرا در محفظه مذکور قرار می دهیم و زمان را ثبت می کنیم. سپس زمان لازم تا حیوان به محرک درد پاسخ دهد که اندازه گیری میشود. پاسخ به محرک دردناک شامل لیسیدن دست و پا، پریدن از محفظه و یا بلند شدن حیوان می باشد. دستگاه هات پلیت مجهز به ثانیه شمار بوده و به محض مشاهده یکی از علائم زیر میتوان کورنومتر آن را متوقف کرد. یقیناً "هر چه زمان عکس العمل کوتاهتر باشد درد حرارتی شدیدتر بوده است.

ب- Tail flick:

ابتدا حیوان در یک محفظه بنام Restrainer ببحرکت شده بطوریکه فقط قادر است دم خود را آزادانه حرکت دهد سپس به یک ناحیه مشخص از دم (که معمولاً ۱/۳ ابتدایی دم می باشد) اشعه نوری با شدت خاصی تابیده میشود و مدت زمان لازم تا حیوان به محرک حرارتی پاسخ دهد و بطور رفلکسی دم خود را تکان دهد اندازه گیری میشود بدین منظور در امتداد دم یک چشم الکترونی تعبیه شده است که در صورت حرکت دم حیوان بطور اتوماتیک کورنومتر دستگاه را متوقف می کند بنابراین زمان عکس العمل اندازه گیری می شود آزمون Tail flick بر روی موش سوری و موش صحرایی انجام می شود.

تمرین:

۱) اندازه گیری اثر ضد درد دیکلوفناک توسط Hot plate و Tail flick

به موش سوری یا صحرایی ۱۵mg/kg دیکلوفناک بصورت IP تزریق می شود. زمان عکس العمل را توسط هات پلیت و Tail flick قبل و در زمانهای بعد از تزریق اندازه گیری کنید.

۲) ایجاد درد احشایی و اندازه گیری آن: محلول اسید استیک را بصورت IP تزریق کرده و تعداد انقباضات

شکمی را در ۵ دقیقه ثبت کنید. همین اعمال را در یک موش سوری یا صحرایی که دیکلوفناک دریافت

کرده بود انجام دهید. نتایج و برداشت خود را بصورت گزارش کار تهیه کنید.

بعضی از بیماریها در انسان وجود دارند که روند ایجاد آنها کند و طولانی است و در طی یک پروسه طولانی مدت در انسان ایجاد می شوند. از جمله این بیماریها هیپرتانسیون، هیپرتانسیون، هیپرلیپیدمی، آتروسکلروز و نوروپاتی محیطی هستند که در حیوانات آزمایشگاهی بطور معمول یافت نمی شوند. لذا جهت بررسی اثرات داروهایی که در بیماریهای فوق مورد استفاده قرار می گیرند باید مدل‌های حیوانی مناسب را بوجود آورد. به همین منظور روش های مختلفی وجود دارد که با ایجاد بیماریهای خاص در حیوانات آزمایشگاهی می توان اثرات درمانی داروهای مورد نظر را ارزیابی نمود. امروزه مدل‌های حیوانی برای هیپرتانسیون، هیپرلیپیدمی، و نوروپاتی محیطی وجود دارد که با استفاده از آنها می توان اثرات داروهای مورد نظر را ارزیابی نمود. همچنین برای مطالعه اثرات داروها بر ارگانهای مختلف لازم است که از بافت مورد نظر نمونه مناسب تهیه گردد و یا در مواردیکه کار تحقیق بر روی حیوانات آزمایشگاهی پایان یابد حیوانات مورد آزمایش بایستی کشته شوند. لذا در این مبحث ابتدا روش ایجاد درد نوروپاتیک (درد مزمن) با استفاده از بستن یکطرفه عصب سیاتیک توضیح داده می شود و سپس روشهای متداول جهت کشتن حیوانات آزمایشگاهی به منظور برداشت نمونه مناسب بطور اختصار توضیح داده می شوند.

هدف: تشریح حیوان آزمایشگاهی مشاهده جداسازی ارگانهای مختلف:

جهت بررسیهای پژوهشی، آموزش برخی روشهای متداول مطالعات تجربی مشاهده تشریح موش سوری و خارج ساختن طحال، کبد، روده بزرگ، روده کوچک، لوزالمعده، قلب، ششها، تخمدان، غدد لنفاوی، صفاق و...

جهت بررسیهای سیتولوژیک و آثار پاتولوژیک داروها

برخی از روشهای متداول مطالعات تجربی

- روش بستن عصب سیاتیک

بستن یکطرفه عصب سیاتیک یکی از روشهای ایجاد درد نوروپاتیک است که از دردهای مزمن به حساب می

آید. بدین منظور ابتدا حیوان توسط 80mg/kg تا ۶۰ تیوپنتال IP بیهوش می شود و موهای پوست پای چپ

رامیتراشیم. محل عبور عصب سیاتیک از ناحیه فرورفتگی بین استخوان ران و شیار نخاعی می باشد بنابراین برشی

بطور موازی با استخوان ران و کمی پایین تر در عضله حیوان ایجاد می شود. پس از جدا کردن بافت پیوندی

و عضله یک رشته سفیدرنگ که عصب سیاتیک می باشد مشاهده می شود. دور عصب را با یک رشته سیم مسی

بسته و مجدداً "عضلات و پوست رابخیه می زنیم. محل بخیه باید ضد عفونی می شود.

روش برداشتن غدد جنسی یا گنادکتومی :

حیوان با 60 الی 80mg/kg تیوپنتال IP بیهوش می شود. در موشهای نر برشی به طول ۲-۳ سانتیمتر بین

اسکرتوم و پوست شکم ایجاد می شود. مجزا و پایه عروقی از ناحیه پروکزیمال با نخ جراحی مسدود و از ناحیه

دیستال قطع می شود. سپس غشای بین دو بیضه بریده و همین عمل بر بیضه دیگر تکرار می شود در انتها پوست

اسکرتوم بخیه و محل با محلول بتادین ضد عفونی می شود.

در موشهای ماده قسمت تحتانی شکم تراشیده شده و برش افقی به طول ۳-۴ سانتیمتر ایجاد می شود. پوست فاسیا

و عضلات شکم را باز کرده و چربیها و روده کنار زده می شود تا رحم و لوله های آن دیده شوند. لوله رحم و

پایه عروقی تخمدان با نخ جراحی در ناحیه پروکزیمال مسدود و از ناحیه دیستال قطع می شود همین عمل در

تخمدان دیگر تکرار می شود در انتها چند میلی لیتر محلول نرمال سالین داخل حفره شکمی ریخته و عضلات و

پوست بخیه زده می شوند و محل زخم ضد عفونی شود.

روش کشتن حیوان پس از اتمام آزمایش

(۱) قطع نخاع

(۲) تزریق مستقیم کلرور پتاسیم به داخل قلب

(۳) گیوتین

کشتن حیوان بدون ایجاد درد :

(۱) قطع نخاع : حیوان را نوازش کرده در یک سطح صاف قرار می دهیم در حالیکه گردن او را ثابت نگه

داشته دم آن را گرفته و بایک حرکت سریع می کشیم بهتر است ابتدا حیوان با لایتر بیهوش شود.

(۲) تزریق محلول Kcl را مستقیماً" در ناحیه قلب تزریق کرده قلب حیوان از کار می ایستد. البته ابتدا حیوان با

ایتر بیهوش می شود.

(۳) روش گیوتین : حیوان در یک محفظه ثابت نگه داشته می شود بطوریکه سر آن از ناحیه گردن بی

حرکت باشد. تیغه گیوتین با سرعت موجب جدا شدن سر از تنه می شود

این قسمت بطور عملی آموخته می شود

تمرین : هر دانشجو یکی از روشهای فوق را انجام می دهد.