



دانشگاه جیرفت

دستور کار آزمایشگاه مبانی فیزیولوژی

گروه زیست شناسی

دکتر عزتی

جلسه اول: تهیه انواع بافر فیزیولوژیکی

بافر سیستم یا محلولی است که از یک اسید ضعیف و نمک آن (باز قوی) و یا از یک باز ضعیف و نمک آن (اسید قوی) تشکیل می شود. خاصیت سیستم یا محلول بافری این است که PH آن در اثر افزایش مقدار کم اسید قوی (H^+) و یا باز قوی (OH^-) زیاد تغییر نمی کند.

PH خون و سایر مایعات بدن در مقابل افزایش یون H^+ و یا یون OH^- تغییرات اندکی دارد. به طوری که همواره آن در محدوده ی ثابتی (۷/۳۴ - ۷/۴۳) تغییر می کند از سیستم های بافری بدن می توان موارد زیر را نام برد:

الف-سیستم کربنات-بی کربنات $[HCO_3^-] / [H_2CO_3]$ تنظیم آن توسط تنفس انجام می شود

ب-سیستم فسفات-بی فسفات $[HPO_4^-] / [H_2PO_4]$ تنظیم آن توسط کلیه ها انجام می شود. (PBS)

ج-پروتئین های سلول

مهمترین بافر پلاسما = بی کربنات و پروتئین

مهمترین بافر های گویچه های قرمز = بی کربنات و همو گلوبین

قدرت بافری

حدودی را که یک بافر می تواند مانع از تغییرات PH محیط گردد قدرت بافری می نامند که بستگی به غلظت اجزا سازنده آن بافر دارد. به عبارت دیگر سیستم یا محلول بافری تا حدودی می تواند نسبت به افزایش اسید یا باز مقاومت نموده و PH آن زیاد تغییر نکند. محدوده ای را که یک سیستم بافری می تواند مقاومت نماید محدوده عمل بافر گویند .

طرز تهیه محلول های بافری:

برای درست کردن محلول های بافری عملاً چندین راه وجود دارد بهترین راه استفاده از رابطه هندرسن -هسلباخ می باشد که به صورت زیر نوشته می شود:

$$pH = pK_a + \log \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right)$$

نسبت نمک به اسید را میتوان با داشتن مقادیر pK_a و PH اسید یا باز ضعیف مربوطه به دست آورد. راه دیگر استفاده از جداولی است که به همین منظور تهیه شده و معمولاً برای تهیه یک بافر محلولی با مولاریته معین از اسید و محلول دیگری با مولاریته معین از نمک مربوطه را تهیه کرده سپس با توجه به PH مورد نظر حجم معینی از دو محلول را با هم مخلوط می کنند.

دو بافر مهم آزمایشگاهی عبارتند از:

۱-بافر استات که از دو جزء زیر تشکیل شده است:

اسید استیک: (CH_3COOH) اسید ضعیف یا جز دهنده پروتون

استات سدیم: (CH_3COONa) نمک اسید یا جز گیرنده پروتون

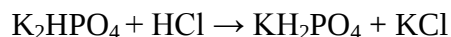
۲-بافر فسفات که از دو جزء زیر تشکیل شده است:

فسفات مونوپتاسیک: (KH_2PO_4) اسید ضعیف یا جز دهنده پروتون

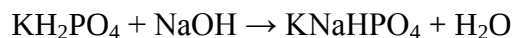
فسفات دی پتاسیک: (K_2HPO_4) نمک اسید یا جزء گیرنده پروتون

مکانیسم عمل بافر فسفات در مقابل اسید ها و بازها:

اگر مقدار کمی از یک اسید قوی مثل HCl را به بافر فسفات اضافه کنیم تغییر زیادی در PH ایجاد نمی شود زیرا اسید کلریدریک با فسفات دی پتاسیک (جزء گیرنده پروتون) ترکیب شده و فسفات مونوپتاسیک تولید می کند که یک اسید ضعیف است و PH زیاد تغییر نمی کند.



همچنین با اضافه کردن سود به بافر فسفات چون سود مونوپتاسیک (جزء دهنده پروتون) ترکیب شده و آب تشکیل می شود در نتیجه PH زیاد تغییر نمی کند.



کاربردها

PBS به علت هم غلظت و هم نوع بودن با مواد بیولوژیکی بدن و نیز غیر سمی بودن آن برای سلول کاربردهای بسیاری دارد. از موارد استفاده از آن می توان به کاربرد آن در رقیق کردن مواد و شستن ظروف محیط کشت اشاره کرد. از **PBS** به همراه **EDTA**

همچنین برای جدا کردن اتصال و توده سلول‌ها استفاده می‌شود. فلزهای دو ظرفیتی مانند روی با اینکه نمی‌توانند به محلول متصل شوند ولی سبب ته‌نشین شدن آن‌ها می‌شود به همین دلیل استفاده از بافر مناسب توصیه می‌شود.

مواد وسایل مورد نیاز

pH سنج، بشر، NaCl، KCl، $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ، KH_2PO_4 ، Na_2CO_3 ، NaHCO_3

روش کار

روش‌های متفاوتی برای تهیه PBS وجود دارد. بعضی از فرمول‌ها حاوی پتاسیم نیستند درحالی که در برخی دیگر کلسیم یا منیزیم وجود دارد. معمولاً PBS حاوی مؤلفه‌های زیر است:

Concentration	Concentration	سالت
(gr/Lit)	(mmol/Lit)	(----)
۸۰۰۱	۱۳۷	NaCl
۰٫۲۰	۲٫۷	KCl
۱۰۷۸	۱۰	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
۰٫۲۷	۲٫۰	KH_2PO_4
۷٫۴	۷٫۴	pH

(Carbonate/Bicarbonate Buffer Preparation) بافر کربنات/بیکربنات

روش کار

برای تهیه ۵۰ میلی مولار بافر کربنات/بیکربنات مقادیر Na_2CO_3 ۱/۵۹ گرم و NaHCO_3 ۲/۹۳ گرم را در ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده، pH آن را توسط NaOH به ۹/۶ برسانید. سپس حجم نهایی محلول را با اضافه نمودن آب مقطر به یک لیتر افزایش دهید.

جلسه دوم: گلبول قرمز

خون و لنف و آب میان بافتی، محیط داخلی موجود زنده را تشکیل می دهند و با تمام سلولها در تماس دائمی هستند، محیط داخلی دارای ترکیب و خواص فیزیوشیمیایی نسبتا ثابتی است و در سایه این خاصیت محیط داخلی سلولهای موجود زنده در یک شرایط نسبتا ثابت بسر می برند. این پدیده که به نام هموستازی معروف است برای ادامه حیات تک تک سلولها و کل بدن موجود زنده ضروری است.

خون با متعادل نگاهداشتن مقدار آب، الکترولیتها و عوامل دیگر نقش مهمی را در برقراری هموستازی دارد. خون وظیفه انتقال مواد غذایی و اکسیژن به اندامها و انتقال مواد زائد به اندام های دفع کننده را دارد. خون از دو بخش پلاسما و عناصر شناور تشکیل شده است. وزن کلی خون در انسان ۶-۷/۵ درصد وزن بدن است.

یکی از سلولهای خونی گلبول قرمز است. عمل عمده آن انتقال هموگلوبین است که به نوبه خود اکسیژن را از ریه ها به بافتها حمل می کند. در بعضی از جانوران پست هموگلوبین به صورت آزاد در پلاسما گردش می کند و در داخل گویچه های سرخ محبوس نیست. اما هنگامیکه هموگلوبین بصورت آزاد پلاسمای انسان وجود داشته باشد، هر بار که خون از مویرگها عبور می کند، تقریبا ۳ درصد آن از غشاء مویرگ بداخل فضاهای بافتی یا گلمرولی کلیه عبور می کند. بنابراین برای اینکه در داخل گردش خون باقی بماند باید در گلبول سرخ قرار گیرد.

گلبول قرمز حاوی مقدار زیادی آنزیم انیدریدکربنیک و آب نقش کاتالیزور را داشته و سرعت واکنش را چندین هزار برابر زیاد می کند. سرعت این واکنش این امکان را می دهد تا مقادیر زیاد دی اکسیدکربن را به شکل یون بیکربنات از بافتها به ریه ها انتقال دهد. هموگلوبین همچنین یک بافر اسید-باز است که مسئول ۵۰ درصد قدرت بافری کل خون است.

گلبولهای قرمز طبیعی صفحات مقعرالطرفینی به قطر تقریبا ۸ میکرون و ضخامت ۲ میکرون در ضخیم ترین قسمت و ۱ میکرون یا کمتر در مرکز هستند. حجم متوسطه گویچه های سرخ ۸۳ میکرون مکعب است. تعداد گویچه های سرخ در هر میلی متر مکعب خون یک مرد طبیعی در حدود ۵۲۰۰۰۰۰ و در یک میلیمتر مکعب خون یک زن طبیعی در حدود ۴۷۰۰۰۰۰ است. مقادیر بالاتر از ارقام طبیعی فوق را اریتروسیتوزولی سیستمی و مقادیر کمتر را اریتروپنی می نامند.

هموسیتومتر

هموسیتومتر لامی است که برای شمارش گلبولها بکار می رود. لامهای متفاوتی برای شمارش وجود دارد مانند نئوبار و توما است که دقیقترین آن لام نئوبار است.

لام نئوبار

در وسط لام بخش H وجود دارد که دارای دو صفحه است که توسط یک شیار عرضی از هم جدا شده اند. در هر صفحه ۹ خانه به ابعاد ۳ در ۳ میلیمتر وجود دارد. ابعاد هر مربع ۱ در ۱ میلیمتر مربع است و زمانی که لامل روی آن قرار گیرد ارتفاع هر صفحه تا

لامل ۰/۱ میلیمتر خواهد بود. و در هر مربع بزرگ ۰/۱ میلیمتر مکعب حجم دارد. خانه شماره ۵ یا مرکزی به ۲۵ خانه تقسیم می شود و هر مربع به ۱۶ خانه در نتیجه مربع مرکزی شامل ۴۰۰ مربع کوچک است. مجموع هر ۱۶ خانه توسط خطوط مضاعف محصور شده است.

لام توما

برخلاف نئوبار، تنها دارای خانه مرکزی است و حجمش با لامل برابر ۰/۱ × ۱ × ۱ میلیمتر مکعب است. این خانه مرکزی دارای ۱۶ خانه است و مربع ها توسط خطوط سه گانه افقی و عمودی از یکدیگر جدا می گردد.

ملانژور با دانه سرخ

این پیپت برای رقیق کردن خون برای شمارش گلبول قرمز به کار می رود که دارای یک بخش حباب مانند است و در وسط دارای یک لوله موئین مدرج است. در داخل حباب یک دانه سرخ وجود دارد. در قسمت پایین درجه ۰/۵ و ۱ و در قسمت بالا ۱۰۱ نوشته شده است. خون در این پیپت ۲۰۰ بار رقیق می شود. در هنگام انتقال نمونه برای شمارش باید چند قطره اول دور ریخته شود زیرا لوله زمانیکه توسط رقیق کننده پر می شود اول خون شسته و پاک می شود و در پایین لوله مایع رقیق کننده قرار می گیرد.

لوله پلاستیکی

این لوله های پلاستیکی یکبار مصرف برای پر کردن ملانژور با ماده رقیق کننده استفاده می شود. طول آن معمولا ۲۵ سانتیمتر است تا چشم قادر به دیدن درجات ملانژور باشد.

ماده رقیق کننده گلبول قرمز

این محلول رقیق کننده هایم نام دارد البته می توان از کلوروسدیم ۳٪ استفاده کرد.

آزمایش: شمارش تعداد گلبول های سرخ

مواد و وسایل لازم

- ۱- لام نئوبار و لامل
- ۲- ملانژور با دانه سرخ
- ۳- لوله پلاستیکی
- ۴- پنبه، الک، لانست
- ۵- محلول هایم

۶- بشر کوچک ، کاغذ صافی و لنز پیپر

۷- میکروسکوپ

روش کار

۱- لوله لاستیکی را به سر ملانژور وصل کرده و مقداری هایم در بشر بریزید.

۲- یک قطره خون از قسمت سر انگشت ضد عفونی شده و ماساژ داده شده که بوسیله لانست خارج کنید (قطره دوم زیرا قطره اول زود منعقد می شود).

۳- سریع ملانژور را تا علامت ۰/۵ پر کنید.

۴- ملانژور را بصورت افقی نگه دارید و از ورود هوا جلوگیری نمایید.

۵- بلافاصله محلول هایم را با عمل مکیدن تا علامت ۱۰۱ پر کنید و پس از پر شدن با نوک زبان آنرا مسدود کنید.

۶- لوله پلاستیکی را از ملانژور جدا کنید و با انگشت شست و نشانه مسدود کرده و بمدت ۲-۳ دقیقه به آرامی تکان دهید حالت دورانی.

۷- دوباره لوله پلاستیکی را به سر آن وصل کنید و ۴-۵ قطره اولیه را دور ریخته و سپس یک قطره کوچک را روی صفحه مدرج گذاشته سپس روی آن لامل بگذارید. نباید نمونه در شیار ریخته شود در این صورت باید با آب شسته و خشک نمایید و مجدد انجام دهید.

۸- لام را در زیر میکروسکوپ با عدسی ۴۰ و در مربع مرکزی و ۵ مربع آن که شامل ۴ خانه حاشیه و یک خانه مرکزی است انجام شود. تعداد آنها را در عدد ۱۰۰۰۰ ضرب کرده و به عدد نهایی برسید.

جلسه سوم: گلبول سفید

لکوسیتها واحدهای متحرک دستگاه حفاظتی بدن هستند. لکوسیتها، قسمتی در مغز استخوان و قسمتی در بافت لنفاوی تشکیل می شوند و به واسطه عمل عمل فاگوسیتوز و تولید نقش مهمی در دفاع و ایمنی سازی بدن دارند. این سلول ها بعد از تشکیل، توسط خون به مناطق مختلفی از بدن حمل می شوند تا در آنجا مورد استفاده قرار گیرند. تعداد طبیعی گلبولهای سفید بسیار متغییر است و عوامل فیزیولوژیک چندی مثل خستگی، درد، اضطراب و... در تعداد آنها موثر است. بر خلاف گلبول قرمز، جنسیت تأثیری بر تعداد گلبولهای سفید ندارد. معمولاً تعداد گلبولهای سفید در بین بالغین را ۴۰۰۰ تا ۱۱۰۰۰ در هر میلی متر مکعب خون تخمین می زنند. تعداد آن به ویژه لنفوسیتها نوزادان و کودکان بیشتر است. مقادیر بالاتر از مقادیر ذکر شده را لکوسیتوز و پائین تر از آن را لکوپنی نامند.

بعضی از عوامل بیماریزا نظیر بعضی باکتریها بر تعداد گلبولهای سفید اثر کرده و مقادیر آنها را افزایش می دهند و بعضی عوامل مقدار آنها را کاهش می دهند مثلاً بعضی از آنها ویروسها و بعضی از عوامل فیزیولوژیک ایجاد لکوسیتوز می کنند.

ازمایش: شمارش گلبول سفید

مواد و وسایل مورد نیاز

- ۱- لام نئوبار
 - ۲- لوله پلاستیکی
 - ۳- پنبه، الکل و لانست
 - ۴- محلول تورک
 - ۵- میکروسکوپ
 - ۶- بشر
 - ۷- ملانژور دانه سفید
 - ۸- کاغذ صافی و لنز پیپیر
- روش کار

۱- محلول تورک دارای خاصیت اسیدی است که گلبول قرمز را لیز کرده و باعث رنگ آمیزی لکوسیت می شود. بدین منظور از ملانژور دانه سفید استفاده می شود که دارای درجات ۰/۵ و ۱ و ۱۱ می باشد. ابتدا از سرانگشت بوسيله لانست یک قطره خون وارد تا علامت ۰/۵ پر کرده و سپس با عمل مکیدن تا علامت ۱۱ با محلول تورک پر می کنیم. سپس سر پلاستیکی را جدا کرده و و آنرا بین دو انگشت شست و سبابه گرفته و بمدت ۳-۴ دقیقه با حرکت دورانی کاملاً حل می کنیم.

۲- ۴-۵ قطره را دور ریخته و یک قطره کوچک روی صفحه لام قرار داده و در زیر میکروسکوپ با عدسی ۱۰ در چهار خانه بزرگ کناری شمارش را انجام می دهیم و مجموع آنها در عدد ۵۰ ضرب می گردد.

جلسه چهارم: تعیین طیف خون

همگلوبین نقش مهمی در انتقال اکسیژن و دی اکسید کربن دارد. همگلوبین از یک بخش پروتئینی گلوبین و چهار مولکول هم درست شده است.

هم بخش فعال یا پروستیتیکی همگلوبین است. هم یک اتم آهن دارد که ضمن توانایی به ترکیب با اکسیژن می تواند به سهوله از آن جدا شود. ظرفیت آهن بعد از ترکیب با اکسیژن تغییر نمیکند و دو ظرفیتی باقی می ماند.

همگلوبین در ترکیب با اکسیژن به اکسی همگلوبین تبدیل می شود. اکسی همگلوبین با از دست دادن اکسیژن یعنی احیاء شدن مجدداً به همگلوبین تبدیل می شود. اکسی همگلوبین، همگلوبین و مشتقات دیگر همگلوبین طیف جذبی باند های اختصاصی ویژه ای هستند. هنگامی که شعاع نور از محلول اکسی همگلوبین عبور می کند، دو باند تیره جذبی مشخص در ناحیه زرد و سبز دیده می شود و همگلوبین احیاء شده تنها یک باند جذبی پهن در قسمت زرد-سبز دارد. رنگ اکسی همگلوبین با همگلوبین کمی تفاوت دارد. که به ترتیب قرمز روشن و هر چه درجه اشباع آن با اکسیژن بیشتر باشد روشنتر است. خون وریدی بدلیل همگلوبین احیاء شده تیره می باشد.

آزمایش: طیف جذبی اکسی همگلوبین

مواد و وسایل لازم

۱- پنبه، الک، لانس، لانس

۲- اسپکتروسکوپ

۳- دستگاه سانتریفیوژ

۴- لوله آزمایش

۵- آب

روش کار

۱- ابتدا سر انگشت را ضد عفونی کرده و سپس به کمک لانس یک قطره خون در لوله آزمایش که محتوی ۲ میلی

لیتر آب است بریزید

۲- به کمک اسپکتروسکوپ طیف اکسی همگلوبین را مشاهده کنید و مشاهدات خود را رسم کنید.

جلسه پنجم: تهیه بلور تایشمن از خون

اگر هموگلوبین با محلول اسیدکلریدریک مخلوط شود بخش هم از گلوبین جدا می شود و با اسید کلریدریک ترکیب شده و به همین که کریستالهای ویژه ای را بوجود می آورد، تبدیل می شود. این تست در پزشکی قانونی برای اثبات وجود خون بکار می رود.

مواد و وسایل لازم

۱- لام و لامل

۲- کلرورپتاسیم در اسید استیک

۳- چراغ

۴- میکروسکوپ

روش کار

۱- یک قطره خون را بر روی لام، به کمک لامل گسترده کنید. بطوریکه یک ورقه نازک بر روی لام تشکیل شود. به این

لایه یک قطره کلرورپتاسیم در اسید استیک اضافه کنید.

۲- لام را بایک لامل بپوشانید و بر روی شعله کوتاهی قرار دهید تا اینکه حباب ها ظاهر شوند و محلول بر روی لام

بجوشد. بلافاصله لام را از شعله دور کرده و قطره دیگری از معرف از کنار لامل اضافه کنید، لام را بگذارید سرد شود.

در زیر میکروسکوپ بلورها را مشاهده کنید و شکل را بکشید.

جلسه ششم: همولیز خون و شناسایی آهن

سلول های زنده در محیطی آبی حاوی مولکولهای معدنی و آلی بسر می برند. محیط خارجی در موجودات تک سلولی و خون ، لنف و مایع میان بافتی در موجودات پر سلولی این محیط را تشکیل می دهد.

انتشار:

این پدیده فیزیکی نقش مهمی در حرکت مولکولها چه در مایع اطراف و چه در هنگام عبور آنها از خلال غشاء سلولی دارد. انتشار پدیده ای خودبخودی است و ناشی از جنبش حرارتی مولکولها است که باعث حرکت آنها از یک ناحیه با تراکم بیشتر به یک ناحیه با غلظت کمتر می شود.

در صورتیکه مانعی بین دو ناحیه غلیظ و رقیق موجود نباشد حرکت مولکولها بصورت خودبخودی در پاسخ به تفاوت در پتانسیل شیمیایی بین دو ناحیه که شیب خوانده می شود، آغاز خواهد شد. حرکت مولکولها تا زمانی ادامه خواهد داشت که همه مولکولها در محیط به طرز یکنواخت توزیع شده و پتانسیل شیمیایی در همه قسمتها یکسان شود.

اسمز:

انتشار مولکولهای آب در پاسخ به شیب غلظت از خلال یک غشاء با قابلیت نفوذ یا جذب انتخابی است در این پدیده مولکولهای آب از ناحیه ای که غلظت آب در آن بالاست به سمت ناحیه ای که غلظت آب آن کمتر است حرکت می کنند.

سرعت نسبی عبور یونها و مواد مختلف به داخل و خارج سلول بازتابی از خصوصیات دو جزء پروتئینی و لیپیدی غشاء است. عبور مواد از جزء لیپیدی غشاء کاملاً غیر فعال و در پاسخ به شیب غلظت است. مولکولهای آبگریز و غیر قطبی بدلیل حالیت در چربی به راحتی از این بخش عبور می کنند.

انتقال مولکولهای قطبی، آب دوست، باردار و همینطور یونها از طریق بخش پروتئینی غشاءها انجام می گردد که با واسطه پروتئین و انتقال فعال است. بیشتر آنها بر خلاف شیب غلظت و با صرف انرژی می باشد. گلبول های قرمز را می توان به آسانی برای نشان دادن پاره ای از عوامل که بر عبور مواد از غشاء سلولی اثر می گذارد به کاربرد. به این ترتیب که همولیز گلبولها یعنی ظهور ناگهانی یک محلول قرمز شفاف حاوی هموگلوبین برای اندازه گیری سرعت نفوذ مواد به داخل گلبول قرمز به کار می رود.

بنابراین می توان سه محیط بر اساس غلظت مواد تشکیل دهنده آن تعریف کرد:

۱- محیط ایزوتونیک که در دو سوی غشاء غلظت یونها و مواد برابر است.

۲- محیط هیپرتونیک ، غلظت مواد در محیط نسبت به سلول بیشتر است (چروکیدگی)

۳- محیط هیپوتونیک، غلظت محیط نسبت به سلول کمتر است (همولیز)

گلبول های قرمز در محیط ایزوتونیک شکل ظاهری خود را حفظ می کنند اما در محیط هیپو تونیک بدلیل جذب آب متورم شده و متلاشی می گردند (همولیز) و در محیط هیپر تونیک آب از دست داده و دچار چروکیدگی می گردند. سوسپانسیون رقیق گلبول قرمز نور را به مقدار کم عبور داده و محیط کدر است ولی در اثر همولیز و خروج هموگلوبین محیط شفاف می گردد. این حالت معیار مناسبی برای اندازه گیری شدت دخول مولکولهای محلول به درون گلبول قرمز است و با این روش می توان تاثیر وزن مولکولی و قابلیت حل شدن در چربی را روی توانایی نفوذ مواد مختلف در غشاء سلول بررسی کرد

آزمایش: تاثیر وزن مولکولی بر قابلیت عبور آنها از میان غشای پلاسمایی

مواد و وسایل مورد نیاز

محلول ۰/۳ مولار اتیلن گلیکول

گلیسرول ۰/۳ مولار

گلوکز ۰/۳ مولار

ساکارز ۰/۳ مولار

۵ عدد لوله آزمایش

یک صفحه چایی

خون و قطره چکان

روش کار

۱- مطابق جدول به چهار لوله آزمایش به ترتیب ۲ میلی لیتر از محلول ۰/۳ مولار اتیلن گلیکول با وزن مولکولی ۶۲، گلیسرول با وزن مولکولی ۹۲، گلوکز با وزن مولکولی ۱۸۰ و ساکارز با وزن مولکولی ۳۴۲ اضافه کنید.

زمان لازم جهت همولیز	وزن مولکولی	محلول ها
		اتیلن گلیکول
		گلیسرول
		گلوکز

۲- به لوله اول دو قطره خون اضافه کنید و بهم بزنید و فوراً زمان ریختن خون را یادداشت نمایید و سپس جلوی کاغذ چایی گرفته و زمان خوانا شدن را یادداشت بردارید که این زمان همان زمان همولیز شدن گلبول قرمز است.

۳- همین عمل را برای لوله های دیگر انجام دهید. نمودار وزن مولکولی به زمان هولیز بر اساس ثانیه را رسم نمایید.

آزمایش: شناسایی آهن

آهن عنصری شیمیایی است که جهت تولید گلبول های قرمز ضروری باشد. این ماده بخش مهمی از هموگلوبین موجود در گلبول های قرمز را تشکیل می دهد (هموگلوبین پروتئینی است که اکسیژن را در سرتاسر بدن ما منتقل می کند). آهن همچنین برای تولید بعضی از پروتئین ها و آنزیم ها در بدن ضروری است. تقریباً ۷۰ درصد آهنی که جذب می شود برای ساختن هموگلوبین مصرف می شود بقیه آن نیز تحت نام های Ferritin و Hemosiderin در بافت ها ذخیره می شود. اگر میزان مناسبی از این ماده از طریق رژیم غذایی دریافت نگردد، بدن از ذخایر آهن که در بافت ها موجود است استفاده می نماید در صورتی که این روند ادامه پیدا کند سطح آهن خون پایین می آید و فرد به کم خونی فقر آهن مبتلا می شود. در حالت برعکس اگر میزان آهن در خون زیاد باشد این میزان به صورت متناوب در بافت ها ذخیره می گردد و به مرحله ای می رسد که بافت ها صدمه می بینند مانند صدماتی که به بافت کبد و پانکراس می رسد. معمولاً پزشک برای اینکه تشخیص دهد کم خونی ناشی از نقص آهن است یا بیماری های مزمن این آزمایش را با آزمایش هایی دیگر مانند Ferritin و TIBC آهن پیوند شده) درخواست می نماید. بعضی از علائم کم خونی فقر آهن عبارتند از: خستگی و بی حالی مزمن گیجی، ضعف و سردرد و از علائم افزایش آهن در بدن می توان به درد مفاصل، ضعف و خستگی، درد ناحیه شکمی، تحلیل رفتن میل جنسی و مشکلات قلبی اشاره کرد. خونریزی شدید، مشکلات گوارشی و رژیم غذایی نامناسب نیز شرایطی هستند که می توانند باعث کم خونی فقر آهن باشند.

*مقادیر نرمال:

نوزاد: ۲۵۰-۱۰۰ میکروگرم در دسی لیتر

کودک زیر ۷ سال: ۴۰-۱۰۰ میکروگرم در دسی لیتر

کودک بالای ۷ سال: ۵۰-۱۲۰ میکروگرم در دسی لیتر

زنان: ۵۰-۱۷۰ میکروگرم در دسی لیتر

مردان: ۶۵-۱۷۵ میکروگرم در دسی لیتر

هموگلوبین و هماتوکریت: آزمایشات هموگلوبین و هماتوکریت به عنوان بخشی از آزمایش شمارش کامل خون موسوم به CBC انجام می شود. میزان کم هر یک از موارد فوق حاکی از کم خونی است. کمبود آهن یکی از شایع ترین علل بیماری کم خونی است.

تعیین مقدارنسبی هموگلوبین و وزن مخصوص خون

مواد و وسایل مورد نیاز

۱- پنبه، لانست و الک

۲- سولفات مس با وزن مخصوص ۱/۰۵۵ و ۱/۰۵۳

۳- لوله آزمایش

۴- خون

روش کار

۱- ابتدا به سر انگشت ضدعفونی شده لانست زده و لوله معین را از قطره پر می کنیم

۲- سپس چند سانتیمتری سطح سولفات مس یک قطره خون به داخل آن بریزید. اگر مقدار هموگلوبین زن حداقل ۱۲/۵ گرم و مرد

حداقل ۱۳/۵ گرم درصد میلی لیتر خون باشد قطره خون در محلولهای فوق ته نشین می شود و این پائین رفتن قطره نشانه

طبیعی بودن هموگلوبین است. اگر این پدیده تا ۱۵ ثانیه صورت بگیرد، قابل قبول است. در صورتیکه مقدار هموگلوبین از حداقل

طبیعی کمتر باشد قطره خون به سطح محلول می آید.

جلسه هفتم: مشاهده گردش خون

وظیفه ی دستگاه گردش خون رساندن مواد لازم به اندام ها و بافت های مختلف بدن و گرفتن مواد زائد از آن ها و رساندن به اندام های دفع (مانند کلیه ها) است.

به طور کلی کارهای عمده ای که توسط این دستگاه انجام می شود. به قرار زیر است:

- ۱- گرفتن اکسیژن از اندام های تنفسی و رساندن آن به بافت های بدن و در عین حال گرفتن گازکربنیک از بافت ها و رساندن آن به اندام های تنفسی .
- ۲- گرفتن مواد غذایی جذب شده و آب، از لوله ی گوارش و رسانیدن آن ها به اندام های مختلف بدن .
- ۳- رساندن مواد غذایی از جایی به جای دیگر جهت تغذیه اندام ها .
- ۴- گرفتن هورمون های غدد درون ریز و رساندن آن ها به اندام هایی که آن ها را لازم دارند.

برای بررسی بهتر دستگاه گردش خون یک قورباغه را مورد مطالعه قرار می دهیم:

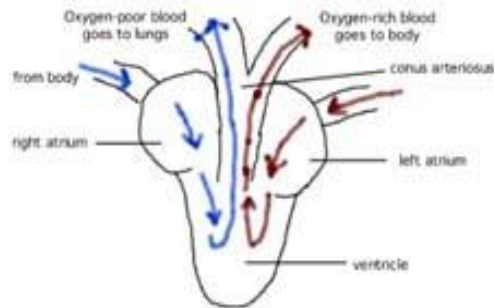
دستگاه جریان خون قورباغه، شامل قلب، (Heart) سرخ رگ ها (Arteries)، مویرگ ها (Cupillaries)، سیاه رگ ها (Relin)، رگ های لنفی (lumph vessels)، خون و لنف است.

سرخ رگ ها که خون را از قلب خارج می کنند با یک بافت توپوشی (Endothelium) که از بافت پوششی ساده و مخاط زیر آن، تشکیل یافته است. در دیواره ی سرخ رگ ها علاوه بر بافت توپوشی، تارهای ماهیچه ای صاف، بافت هم بندی و تارهای کش دار وجود دارد.

این تارها در مقابل انقباض بطن که باعث وارد شدن خون، با فشار به داخل سرخ رگ ها می شود. مقاومت می نماید.

سرخ رگ ها به تدریج که از قلب دور می شوند. دیواره ی آن ها نازک تر می گردد. همچنین باریک و شاخه شاخه شده تا در تمام بدن پخش شده و به موی رگ ها منتهی می شوند .

دیواره ی مویرگ ها غذا، اکسیژن، دی اکسید کربن، پلاسما، بعضی گلبول های سفید یا یاخته های لنفی و بعضی مواد دیگر از دیواره ی نازک مویرگ ها خارج می شود .مویرگ ها به هم متصل شده، سیاهرگ های کوچک را تشکیل می دهند. از اتصال سیاهرگ های کوچک به یکدیگر، سیاهرگ های بزرگتر به وجود می آید. که همان رگ هایی هستند که خون را به قلب باز می گردانند. ساختمان آن ها تقریباً شبیه سرخ رگ هاست با این تفاوت که دیواره ی سیاهرگ ها نازک است و تارهای ماهیچه ای و تارهای قابل کشش آن ها کمتر از سرخ رگ هاست .فشار خون در سیاهرگ ها کمتر از سرخ رگ هاست .

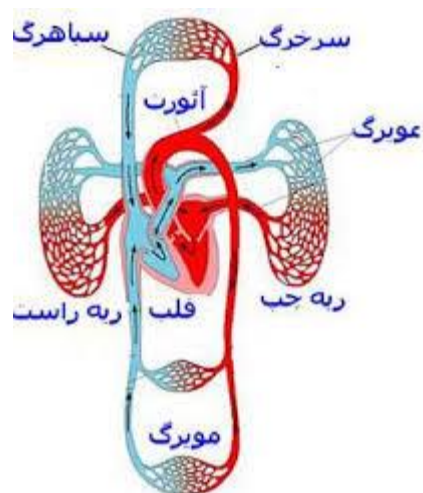


خون از سیاه رگ ها به جز سیاه رگ های ششی به سینوس سیاهرگی ریخته از آن جا به دهلیز راست می ریزد و سپس به بطن وارد می شود.

ساختمان و چگونگی کار بطن طوری است که هنگام انقباض بیشتر خون سیاهرگی وارد سرخ رگ ششی می گردد و از آن جا برای تبادلات گازی (اکسیژن و دی اکسید کربن) به شش ها می رود و پس از این کار به دهلیز چپ باز می گردد. و از آن جا دوباره وارد بطن شده و انقباض آن باعث می شود که بیشتر خون اکسیژن دار وارد پیاز آئورتی بشود.

خون به وسیله ی سایر سرخ رگ ها به اندام های گوناگون بدن می رود .

تقریباً سرخ رگ های هر اندام به نام همان اندام نامیده می شود .مانند سرخ رگ سر و گردن، دست و پاها، کبدی، روده ای، پوستی، کلیوی و..



کاپیلروسکوپی

مواد و وسایل مورد نیاز

۱- صفحه ای از جنس چوب پنبه یا مقوا

۲- قورباغه

۳- میکروسکوپ

۴- لوله نازک شیشه ای

روش کار

این آزمایش را می توان بر روی قسمت های مختلف بدن حیوان به شرح زیر انجام داد.

۱- پوست بدن قورباغه- قورباغه ای را طبق دستور نخاعی مضاعف کنید و قطعه ای از پوست بدن حیوان را به طوری که یک طرف آن به بدن قورباغه متصل باشد جدا کنید. حیوان را لای یک پارچه مرطوب بسته و روی صفحه مقوایی ثابت کنید. پوست را در کنار مقوا جایی که سوراخ دارد سنجاق کنید. این قسمت از پوست را زیر میکروسکوپ گذاشته و با درشت نمایی ضعیف گردش خون مویرگی را در آن بررسی کنید.

۲- پرده صفاق- شکم قورباغه را باز کنید. یک حلقه روده را بیرون آورده و پرده صفاق بین روده ها را بدون آن که کشیده شود باز و به وسیله سنجاق روی سوراخ مقوا ثابت کنید. زیر میکروسکوپ مشاهده کنید.

۳- ریه قورباغه- پس از ایجاد شکاف در ناحیه سینه توسط یک لوله شیشه ای در دهان قورباغه بدمید تا ریه باد شود و قسمتی از ریه را بین دو لام شیشه ای قرار دهید و زیر میکروسکوپ مشاهده کنید.

۴- اندازه مویرگها و جهت خون را بنویسید.

۵- سرخرگها و سیاهرگها و نحوه عبور خون را مشخص کنید.

جلسه هشتم: اثر حرارت و pH بر عملکرد قلب

قلب قور باغه در پرده پریکارد قرار گرفت است و برای مطالعه آن بایستس پرده پریکارد را به وسیله قیچی شکافته و قلب را از درون آن خارج ساخت. قلب از دو دهلیز و یک بطن تشکیل شده است. بطن در قسمت پایین و به شکل مخروطی است و در بالای آن دهلیز راست و چپ قرار دارد. آئورت که از بطن خارج خارج می شود در بالای آن ملاحظه می شود.

خون از قلب به وسیله آئورت به تمام بدن و ششها جریان پیدا می کند و توسط سیاهرگهای ششی به دهلیز چپ و توسط سیاهرگهای متعدد دیگر به سینوس وریدی و از آنجا به دهلیز راست وارد می شود. دو سرخرگ از آئورت خارج می شود و دو سیاهرگ به درون سینوس می ریزد.

ماهیچه قلب دارای این خصوصیت و قابلیت ذاتی است که می تواند تحریکات خودبخودی و موزون ایجاد کند. بنابراین منشاء ضربانهای قلب در خود قلب و مستقل از تحریکات عصبی است و در دستگاه هدایت کننده قلب قرار دارد.

منظور از دستگاه هدایت کننده قلب، آن قسمتهایی از قلب است که وظیفه ایجاد و هدایت ضربانهای قلب را به عهده دارند، این دستگاه شامل گره جیبی-دهلیزی، گره دهلیزی بطنی و دسته هیس است.

کنترل عصبی قلب را شاخه های اعصاب سمپاتیک و پاراسمپاتیک دستگاه عصبی به عهده دارد. از انتهای اعصاب سمپاتیک نورآدرنالین یا نوراپی نفرین و از انتهای عصب پاراسمپاتیک استیل کولین ترشح می شود.

عصب پاراسمپاتیک اکثر شاه های این عصب به گره های جیبی-دهلیزی و دهلیزی-بطنی و تعداد کمی از شاخه های آن، به دیواره دهلیزها می روند و ندرتا به بطنها می فرستد.

عصب سمپاتیک در تمام قسمت های قلب منشر می شود و بیشترین آنها به بطن ها می رود. تحریک عصب سمپاتیک باعث افزایش ضربان قلب می گردد و برونده قلب را افزایش می دهد. با تحریک واگ (پاراسمپاتیک) می توان افزایش ضربان قلب را به حال عادی برگرداند.

تحریک پاراسمپاتیک تحریک پذیری دهلیزها کم شده و فعالیت گره ها را کاهش می دهد. یکی دیگر از عوامل مهم در تعداد ضربان قلب دما می باشد. همچنین یونها هم در تعداد ضربان قلب اثر می گذارد. افزایش پتاسیم خون باعث اتساع ماهیچه قلب کاهش ضربانها و ضعف نیروی انقباض می شود. اثر یون کلسیم عکس پتاسیم است و ازدیاد یون سدیم مانند یون پتاسیم سبب کاهش انقباض قلب می شود.

آزمایش: بررسی اثر گرما و سرما و pH بر عملکرد قلب

مواد و وسایل مورد نیاز

کیموگراف، وسایل تشریح، تخته مخصوص

رینگر قورباغه: ۶/۵ گرم کلرور سدیم، ۰/۱۴ گرم کلرور پتاسیم، ۰/۱۲ گرم CaCl_2 ، ۰/۱ گرم NaH_2PO_4 و ۰/۲ گرم NaHCO_3

کلرور سدیم ۰/۷ درصد

روش کار

قورباغه‌ای را ابتدا نخاگی کرده و سپس قفسه سینه را بشکافید. قلب را از حفره آزاد کرده و در محلول رینگر قرار می دهیم.

چند قطره رینگر گرم بر روی سینوس سیاهرگی قلب بریزید و تعداد ضربان قلب را یادداشت کنید.

سپس چند قطره رینگر سرد روی سینوس سیاهرگی ریخته و تعداد ضربان را ثبت کنید.

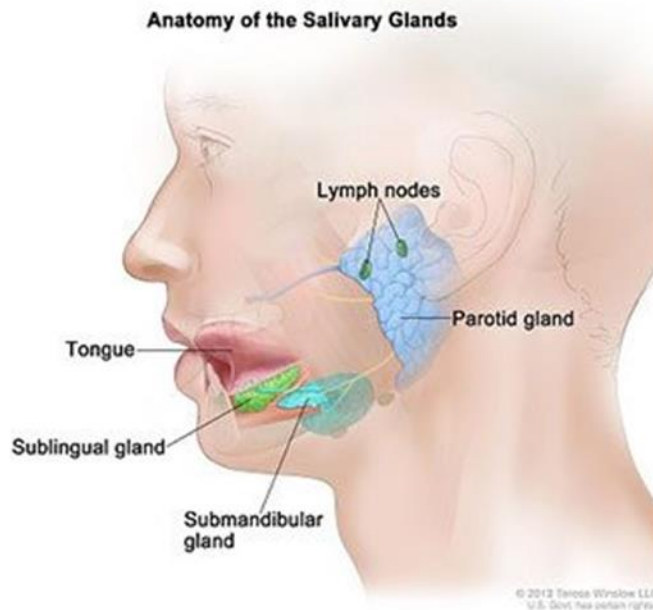
سپس سود ۱ نرمال اضافه کنید و تعداد رو بررسی کنید و قلب را وارد رینگر تازه نمایید.

اسید کلریدریک ۱ نرمال به آن اضافه کنید و تعداد ضربان را ثبت نمایید.

تعداد ضربان	درجه حرارت
	دمای اتاق
	۴ درجه سانتیگراد
	۳۵ درجه سانتیگراد
	سود
	اسید کلریدریک

جلسه نهم: شناسایی ترکیبات بزاق و تجزیه کمی

دهان محل ورود مواد غذایی به دستگاه گوارش است که به وسیله دندان ، آرواره ، لب ، زبان خرد شده و با بزاق مخلوط می شود . بزاق ابتدا مواد غذایی را خیس کرده و مواد غذایی خرد شده را به هم می چسباند و با آنزیم هایش دیواره باکتری ها را از بین برده و مواد غذایی ضد عفونی می شود . همچنین به حس چشایی کمک می کند.و باعث مرطوب بودن دائمی دهان و تسهیل سخن گفتن می شود .



بزاق توسط سه جفت غده بزاقی ترشح می شود : ۱- غدد بنا گوش (پاروتید) ۲- غدد زیر زبانی ۳- غدد تحت فکی ۴- سلول های پراکنده در دهان

PH بزاق برابر ۶٫۸ الی ۷ می باشد در نتیجه تقریباً خنثی است.

مواد بزاق :

۱- آب ۹۹ درصد

۲- مواد معدنی (آنیون ها : کلرور ها ، سولفات ها ، فسفات ها و کاتیون ها : کلسیم ، سدیم ، پتاسیم)

۳- مواد آلی مانند پروتئین ها که به دو نوع آنزیمی و غیر آنزیمی هستند.

- آنزیمی ها : ۱- لیزوزیم که دیواره باکتری را تخریب می کند / ۲- پتیلین که نوعی آلفا آمیلاز است و نشاسته را به مالتوز تبدیل می کند / ۳- آنزیمهای مالتاز و انورتاز که از میکروبهایی موجود در دهان ترشح می شوند.

*کلرور ها باعث فعال شدن پروتئین های آنزیمی می شوند.

- غیر آنزیمی : مانند موسین که مواد غذایی را لزج می کند.

در هر لیتر بزاق ۰،۰۰۶ گرم تیوسیانات پتاسیم وجود دارد که مقدار آنها در افراد معتاد به دخانیات بیشتر است.

مواد و وسایل مورد نیاز :

مقداری بزاق ، لوله آزمایش ، جا لوله آزمایش ، اسید استیک غلیظ ، سود ۴۰ درصد ، سولفات مس ، اسید نیتریک ، نیترات نقره ، مولیبدات آمونیوم ، اسید کلریدریک ، کلرور باریم، اسید اگزالیک

هدف: بررسی وجود موسین در بزاق :

مراحل : ۱- یک سی سی بزاق ۲- یک قطره اسید استیک در لوله آزمایش می ریزیم.

نتیجه : تشکیل رسوب سفید

هدف : بررسی وجود کلسیم

مراحل : ۱- یک سی سی بزاق ۲- کمی اسید اگزالیک در لوله آزمایش میریزیم.

نتیجه : تشکیل رسوب سفید رنگ اگزالات کلسیم

هدف : بررسی وجود کلرور ها در بزاق

مراحل : ۱- یک سی سی بزاق رقیق ۲- دو قطره اسید نیتریک ۳- یک قطره نیترات نقره را به لوله آزمایش اضافه می کنیم.

نتیجه : با واکنش جابجایی رسوب سفید رنگ کلرور نقره ایجاد می شود.

هدف: بررسی وجود فسفات در بزاق

مراحل : ۱- یک سی سی بزاق ۲- یک سی سی اسید نیتریک ۳- یک سی سی مولیبدات آمونیوم را به لوله آزمایش اضافه می کنیم .

نتیجه : تشکیل رسوب زرد رنگ فسفو مولیبدات آمونیوم با واکنش جابجایی

هدف: بررسی وجود سولفات در بزاق :

مراحل : ۱- یک سی سی بزاق ۲- دو الی سه قطره HCl ۳- دو قطره کلرور باریم را به لوله آزمایش اضافه می کنیم.

نتیجه : تشکیل رسوب سفید رنگ سولفات باریم با واکنش جابجایی

شناسایی پتالین بزاق با اثر بر نشاسته:

در یک بشر ۲۰۰ سی سی محلول ۰.۵ گرم درصد نشاسته تهیه کنید. آنگاه ۳ لوله آزمایش تمیز بردارید و آنها را با حروف A و B و C مشخص کنید. در لوله A دو سانتیمتر مکعب محلول نشاسته ریخته و یک قطره لوگل بیفزایید. در لوله B حدود یک سانتی متر مکعب بزاق بریزید و یک قطره لوگل اضافه کنید. در لوله C دو سانتی متر مکعب محلول نشاسته و ۵ سانتی متر مکعب بزاق و یک قطره لوگل بریزید. هر ۳ لوله را در دمای ۳۷ درجه نگه دارید. برای تامین دمای ثابت از حمام آب گرم استفاده کنید. بدین ترتیب که لوله ای آزمایش فوق را در آب داخل بشر نگه دارید و با یک دماسنج در بشر دمای آن را کنترل کنید. اگر وضعیت لوله ها را مورد مطالعه قرار دهید مشاهده می کنید که در لوله C تغییر رنگ حاصل می شود یعنی رنگ آبی تدریجا زدوده می شود. در این لوله لوگل سبب تغییر رنگ محلول نمی شود زیرا در آن نشاسته تبدیل به ماده ی دیگری شده است (مالتوز). مالتوز یک دی ساکارید است.

جلسه دهم: عملکرد بزاق و تاثیر دما بر آن

آنزیم ها بر دونهند دسته ای که برای انجام فعالیت های خود نیاز به عامل کمکی دارند و دسته دیگر خود به تنهایی فعال هستند. به عامل کمکی آنزیم ها کوفاکتور گویند که بر دو نوعند:

۱- کوفاکتور هایی که از جنس فلز یون فلزی مانند آهن، مس و ... هستند.

۲- کوفاکتور هایی که از یک مولکول با ترکیب آلی ساخته شده اند به این دسته از کوفاکتور ها کوانزیم گویند.

آنزیم ها به عنوان کاتالیزگر باعث افزایش سرعت واکنش می شوند. بخش پروتئینی آنزیم تحت تاثیر عواملی مانند گرما آسیب پذیرند ولی کوفاکتور در مقابل گرما مقاومند. عوامل متعددی بر فعالیت آنها اثر دارد مانند گرما، مواد ضد عفونی کننده، غلظت سوبسترا، غلظت آنزیم، اختصاصی بودن عمل آنزیم و pH.

آنزیم های گوارشی مانند آمیلاز بزاق باعث گوارش قند نشاسته می شود. آمیلاز بزاق از نوع آلفا آمیلاز است و هیدرولیز و شکسته شدن نشاسته و گلیکوزن و یا بعضی از دکسترین ها به مولکول های کوچک کاتالیز می کند. قدرت عمل این آنزیم به تدریج در هنگام کاتالیز زیادتر می شود و فرآورده های نهایی واکنش دی ساکارید به نام مالتوز است. نخستین اثر آمیلاز بر نشاسته تبدیل آن بر نشاسته محلول است. در اثر این عمل، کدورت محلول نشاسته تقریباً از بین می رود و شفاف می شود. نشاسته با معرف ید به رنگ آبی در می آید. در مرحله بعد، آمیلاز بر روی نشاسته محلول اثر کرده و مالتوز به وجود می آید. بتدریج که مولکول نشاسته، مولکول های کوچک مالتوز را از دست می دهد، زنجیره آن کوتاهتر می شود ابتدا اریترودکسترین ها و بعد اکرودکسترین را بوجود می آورد. اریترودکسترین ها با ید به رنگ آبی تا بنفش ایجاد می کنند ولی اکرودکسترین ها با ید رنگی تولید نمی کند. بنابراین از طریق تغییرات رنگ در تست ید می توان مراحل عمل آمیلاز را مشاهده کرد. زمان لازم برای بی رنگ شدن نشاسته را زمان بی اثر شدن تست ید گویند.

اثر دما بر آنزیم

فعالیت آنزیم با افزایش دما تا حدودی رابطه مستقیم دارد. در ابتدا افزایش دما سبب ازدیاد سرعت واکنش می شود، ولی افزایش مداوم دما موجب دگرگونی ساختار پروتئینی آنزیم می گردد به حدی که در اثر تغییر ماهیت پروتئین، فعالیت آن به حداقل مقدار خود می رسد. در دماهای ۷۰ تا ۸۰ درجه سانتیگراد بجز چند حالت استثنایی، آنزیم ها غیر فعال می شوند. فعالیت هر آنزیم در دمای معینی به حداکثر می رسد، این دمای مناسب را دمای بهینه گویند. این دما حدود ۳۸ درجه سانتیگراد است.

آزمایش: اثر دما بر فعالیت آمیلاز بزاق

مواد و وسایل مورد نیاز

محلول نشاسته ۱٪، پیپت، دماسنج، معرف ید، آب مقطر، بن ماری، بشر، معرف بندیکت، بزاق، لوله آزمایش، قطره چکان

- ۱- به ۵ لوله شماره گذاری شده، ۵ میلی لیتر نشاسته ۱٪ وارد کنید.
- ۲- لوله اول را حمام آب یخ، دومی را در دمای ۱۵ درجه و سومی را در دمای ۲۵ و چهارمی را در دمای ۳۷ درجه قرار دهید.
- ۳- سپس ۴ تا ۸ قطره بزاق به لوله اول تا چهارم اضافه کنید. لوله پنجم فاقد بزاق است و به عنوان شاهد است.
- ۴- سپس تمام نمونه ها را با معرف ید تست کرده و زمان بی اثر شدن را یادداشت نمایید. و هیدرولیز نهایی را با معرف بندیکت اثبات کنید.

جلسه یازدهم: تجزیه کیفی ادرار و شناسایی ترکیبات

کلیه کارخانه تصفیه بدن است و محصول این کارخانه مایعی است به نام ادرار که توسط کلیه‌ها تولید شده و از طریق مجاری ادراری از بدن دفع می‌شود. در حالت طبیعی حجم ادرار ۲۰۰۰-۶۰۰ میلی لیتر است. بیشترین مواد ادرار اوره و کلرور سدیم می‌باشند و مواد دیگر مانند اسید اوریک، کراتینین، اسید آمینه‌ها، آمونیاک و پروتئین‌های نادر، آنزیم‌ها و پورین‌ها باقیمانده مواد ازت دار دفعی را تشکیل می‌دهند. ادرار همچنین دارای پتاسیم، فسفات، سولفات و دیگر مواد گوگرد دار مانند سولفید سیستئین و مرکاپتان می‌باشد.

هورمون‌هایی نظیر کتو استروئیدها، استروژن‌ها، آلدوسترون و گونادوتروپین‌های هیپوفیزی و آمین‌های بیوژنیک، کاتکول آمین‌ها و متابولیت‌های سروتونین به طور طبیعی در ادرار یافت و نشانگر حالت متابولیک و آندوکراین بدن می‌باشند. بنابراین بررسی و تحلیل محتویات ادرار می‌تواند برای تعیین وضعیت بدن، تشخیص بیماری‌های کلیوی، اختلالات همولیتیک، بیماری‌های متابولیک و اختلالات مجاری ادراری و مثانه و وجود عفونت کمک کننده باشد. به منظور انجام آزمایش ادرار نمونه ادرار صبحگاهی که غلیظ ترین نمونه می‌باشد مناسب تر است. بخش بیوشیمی ادرار یکی از بخش‌های مهم تشخیصی می‌باشد. در این بخش بیش از صد نوع آزمایش مختلف بر روی ادرار می‌توان انجام داد که هر کدام به منظور خاص و برای تعیین علل مختلف بیماری‌های گوناگون انجام می‌شوند.

مواد و وسایل لازم:

ادرار، لوله آزمایش - نوارهای ادراری

طرز عمل: یک سری نوارهایی هستند که به آنها استریپ گویند و برای هر کدام از مشخصه‌های زیر یک نوار مجزا، یا با رنگهای مختلف بر روی یک نوار وجود دارد که بعد از فرو بردن نوار در ادرار به طور افقی با الگوی موجود بر روی ظرف مقایسه می‌کنند. نوار را داخل ادرار فرو برده چند ثانیه در داخل ادرار نگه می‌داریم تا قسمتهای مختلف توسط ادرار خیس شود و بعد به طور افقی نگه داشته و با الگوی روی ظرف نوار مقایسه می‌کنند، که به این طریق می‌توان وزن مخصوص، PH، خون، قند، صفراوی، پروتئین، اسید اسکوربیک، کتون و WBC را می‌توان مشخص کرد.

انواع آزمایشهایی که بر روی ادرار می‌توان انجام داد:

۱-آزمایشات فیزیکی: رنگ، منظره، حجم ادرار ۲۴ ساعت، PH، وزن مخصوص

۲-آزمایشات شیمیایی: آلبومین، قند، مواد رنگی صفراوی، اجسام کتون

۳-آزمایشات میکروسکوپی: سلولهای اپی تلیال (مجاری ادراری)، RBC (گلبول قرمز)، WBC (گلبولهای سفید) سیلندرها، کریستالها

آزمایش میکروسکوپی: ۳/۲ لوله را از ادرار پر کرده و با دور min/۱۵۰۰ به مدت min۵ سانتیفریژ می کنیم و بعد کل محتوی مایع لوله را خالی کرده و از رسوب باقی مانده یک قطره بر داشته و روی لام قرار داده و روی آن لامل قرار داده و در زیر میکروسکوپ با درشت نمایی $40\times, 100\times, 400\times$ مشاهده می کنیم.

توضیحات: ادرار مایعی است که از خون توسط کلیه ها جدا گشته و در شخص طبیعی به میزان ۶۰۰ الی ۱۶۰۰ میلی لیتر در ۲۴ ساعت می باشد. رنگ طبیعی ادرار باید به رنگ لیموئی یا کهربایی باشد. خون مایعی عمومی است و هر مشکل بدن در خون منعکس و سبب ایجاد مشکل خواهد شد که ادرار مایع خوبی برای شناسایی مشکل بدن می باشد.

انواع بیماری های شناسایی شده که در ادرار تاثیر می گزارند:

مرض قند: وجود قند اضافی در بدن در ادرار ظاهر شده که یکی از راههای شناسایی بیماری مرض قند می باشد.

یرقان: اگر در خون بیلی روبین بالا رود ریبولفلوین که معرف آن می باشد سبب زرد شدن ادرار می شود. زیاد نوشیدن آب باعث افزایش دفع ادرار می شود.

دیابت: سبب افزایش دفع قند می شود که حجم ادرار زیاد می شود. در بیماری دیابتی از ادرار بوی معطری از استون می آید.

دیابت بی مزه: سبب افزایش ادرار می شود چون هورمون آنتی بیوتیک ترشح نمی شود لذا سبب افزایش میزان ادرار می شود.

در بیماری قند ، قند و اجسام کتون ادرار بالا می رود. برای کشت میکروبی ادرار صبح زود بهترین حالت برای نمونه گیری از ادرار می باشد که در این حالت از اواسط ادرار نمونه را برداشته و مورد آزمایش قرار می دهند.

آنوری: در حالت عصبی و مسمومیت های ناشی از سرب و جیوه ادرار قطع می شود که به آن آنوری یا قطع شدن دفع ادرار گویند.

پلی اوری: در این بیماری ادرار زیادی دفع می شود.

الیگو اوری: ادرار خیلی کم دفع می شود.

در ۲۴ ساعت ۱۵۰۰۰ لیتر خون از کلیه ها عبور می کند که ۱ الی ۱٫۵ لیتر ادرار تولید می شود که در بعضی از کتابها ۵/۰ تا ۲٫۵ لیتر ذکر شده است.

وسایل و مواد مورد نیاز برای تمام آزمایشات زیر:

اسید نیتریک - نیترات نقره - اوره ۱٪ - فنول فتالین - اوره آز - بشر - چراغ الکلی - محلول آمونیاک - سود ۱۰٪ - اسید پیکریک - معرف سالکویچ

آزمایش شماره ۱

عنوان آزمایش: بررسی وجود کلرور در ادرار

روش کار

۳Cc ادرار را در یک لوله آزمایش می ریزیم و چند قطره اسید نیتریک بدان اضافه می کنیم . بعد از آن چند قطره نیتрат نقره بدان اضافه می کنیم.

نتیجه: تشکیل رسوب سفیدرنگ مربوط به Agcl (کلرید نقره) می باشد.

آزمایش شماره ۲

عنوان آزمایش: بررسی وجود اوره در ادرار

روش کار: ۲Cc اوره ۱٪ در لوله آزمایشی ریخته و ۵ قطره فنول فتالین و کمی اوره آز بدان اضافه می کنیم. (فنول فتالین در محیط قلیایی رنگ قرمز بوجود می آورد).

در لوله آزمایشی دیگر ۲Cc ادرار و ۵قطره فنول فتالین و کمی اوره آز می ریزیم.

در صورت قرمز شدن لوله آزمایش نشان دهنده ی وجود اوره در ادرار می باشد.

نتیجه: اوره آز اوره را به آمونیاک تجزیه می کند که در نتیجه آن محیط قلیایی شده و فنول فتالین قرمز می شود.

آزمایش شماره ۳

عنوان آزمایش: بررسی وجود اسید اوریک در ادرار

نکته : آزمایش باید زیر هود روشن انجام گیرد.

روش کار

۲ میلی لیتر ادرار را حرارت می دهیم تا خشک شود.

۱-۲ قطره اسید نیتریک بدان اضافه می کنیم و حرارت ملایم می دهیم.

نتیجه : تشکیل رسوب قرمز رنگ نشان دهنده اسید اوریک می باشد.

در این مرحله کمی محلول آمونیاک اضافه می کنیم.

چون در اسید اوریک هسته های پورینی موجود می باشد رنگ بنفش مایل به قرمز ایجاد می شود.

آزمایش شماره ۴

عنوان آزمایش: بررسی وجود کراتین در ادرار

روش کار

۲Cc ادرار و چند قطره اسید پیکریک و چند قطره سود ۱۰٪ را در یک لوله آزمایش می ریزیم.

نتیجه : تشکیل رسوب قرمز نشان دهنده وجود کراتینین در ادرار می باشد.

آزمایش شماره ۵

عنوان آزمایش: بررسی وجود کلسیم در ادرار

روش کار

X cc ادرار را به نسبت یک به یک با محلول سالکوویچ درون یک لوله آزمایش می ریزیم.

رسوب سفید رنگ نشان دهنده کلسیم می باشد.

با استفاده از جدول زیر مقدار کلسیم را اندازه گیری می کنیم.

تغییر مشاهده شده	مقدار کلسیم
عدم تشکیل رسوب	-
کدورت ضعیف	+

++	کدورت قابل رویت
+++	*حالت ابرپنبه ای
++++	رسوب پنبه مانند

آزمایش شماره ۶

عنوان آزمایش: بررسی میزان قند در ادرار

روش کار

۲CC بندیکت کیفی در یک لوله آزمایش ریخته و بدان ۵CC/۱۰ ادرار اضافه می کنیم.

۳دقیقه حرارت مستقیم می دهیم.

طرز تهیه معرف کیفی بندیکت:

۱۷۳ گرم سیترات سدیم، ۱۰۰ گرم کربنات سدیم خشک در ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید و در صورت لزوم کمی گرما دهید. در ظرف دیگر ۱۷/۳ گرم سولفات مس را در آب مقطر حل کنید و حجم نهایی به ۱۰۰ برسد. این محلول را آهسته به محلول قبلب اضافه کنید. و حجم نهایی ا به ۱۰۰۰ میلی لیتر با آب مقطر برسانید.

با استفاده از جدول زیر مقدار قند را اندازه گیری می کنیم.

رنگ	مقدار تقریبی قند
آبی زلال	عاری از قند
آبی کم رنگ بدون رسوب	خیلی کم

رسوب سبز	+
رسوب سبز مایل به زرد	++
*رسوب نارنجی	+++
رسوب قرمز	++++

آزمایش شماره ۷

عنوان آزمایش: بررسی میزان پروتئین در ادرار

روش کار

۳Cc ادرار درون لوله آزمایش می ریزیم و آن را طوری روی آتش می گیریم که سطح فوقانی آن حرارت ببیند.

پیدایش کدورت یارسوب دلیلی بر وجود پروتئین می تواند باشد.

برای اطمینان چندقطره اسید استیک ۱۰٪ بدان اضافه می کنیم اگر رسوب از بین رود نشان می دهد پروتئین نمی باشد.

روش دیگر (به وسیله معرف پروتئین)

۵Cc ادرار و ۵/۰ سی سی معرف پروتئین را در یک لوله آزمایش می ریزیم و ۳۰ ثانیه داخل آب جوش قرار می دهیم.

با استفاده از جداول زیر مقدار پروتئین را اندازه گیری می کنیم.

مشاهدات	مقدار تقریبی
بدون کدورت -	۰
کدورت خفیف ±	۵ میلی گرم
کدورت واضح +	۱-۳۰ میلی گرم
*متوسط ++	۴۰-۱۰۰
شدید +++	۱۰۰-۵۰۰
سنگین ++++	بیش از ۵۰۰

نگهداری ادرار: ۱- در جای خنک و تاریک ۲- استفاده از مواد نگهدارنده نظیر: تولوئن، فنل ، تیمول و فلوراید سدیم که از جمله مواد نگهدارنده ادرار هستند که می توانند ادرار را تا ۱ ماه نگه دارند.

در آزمایش ادرار نباید گلبول قرمز و سفید دیده شود ولی امکان دارد در بیماری هایی چون سنگ کلیوی RBC به مقدار زیاد دیده شود. اپی تلیال در خانمها بیشتر از آقایان است. خوردن داروها سبب ایجاد مواد منظم و نامنظم در ادرار می شود که می توان نتیجه گرفت کریستالها و بلورها یی که در داخل ادرار هستند یا منشا دارویی و یا منشا غذایی دارند در غیر این صورت با ید به پزشک مراجعه کرد.



جلسه دوازدهم: تعیین کلرور در ادرار

کلیه ها در طرفین ستون مهره ها و در حفره شکمی تقریباً از دوازدهمین مهره سینه ای تا سومین مهره کمری قرار دارند. کلیه راست اندکی پایین تر از کلیه چپ قرار دارد و این امر به علت وجود کبد در طرف راست شکم است فضای زیادی را اشغال می کند. کلیه ها در پشت پرده صفاق قرار دارد.

سطح میانی مقعر آن را ناف کلیه گویند که از آن سرخرگ کلیوی داخل و سیاهرگ کلیوی و میزه نای خارج می شود. هر کلیه یک کیسول فیبری دارد که به کلیه چسبیده است و یک لایه چربی و سپس یک پوشش پیوندی آن را احاطه می کند. هر کلیه از دو ناحیه محیطی قشری و مکزی است. بخش محیطی رگهای خونی و لوله های خمیده و گلومرول است. بخش مرکزی شامل مجموعه هرمی شکلی است که هرم کلیوی نامیده می شود. هر هرم به وسیله ستونهای کلیوی از بقیه جدا می شود. هرم ها دارای دستجاتی از پاپی کلیوی است. هر کدام از پاپیها در داخل گودی کوچکی قرار می گیرد که کالیکس کوچک نامیده می شود. چندین کالیکس کوچک یک کالیکس بزرگ را می سازد. و در نهایت لگنچه شکل می گیرد.

وظیفه اصلی کلیه حفظ ثبات مایع برون یاخته ای و اسمولالیتیه است و این عمل را به وسیله تعادل و ترشح آب و نمک انجام می دهد. بدین ترتیب مقدار مواد در خون و همچنین pH آن را ثابت نگه می دارد.

علاوه بر این کلیه ها مواد مغذی و فراورده های نهایی متابولیسم را حفظ می کنند و خود نیز دارای اعمال متابولیسمی و منبع تولید هورمون مثل آنژیوتانسین ۱ و متبولیت فعال ویتامین D است.

ترکیب شیمیایی ادرار

ادرار مایعی است که حاوی نمک های کانی و ترکیبات آلی حاصل از متابولیسم یاخته هاست. روزانه در حدود ۶۰ گرم از مواد مذکور به وسیله ادرار از بدن خارج می شوند. ۳۵ گرم این مقدار جزو مواد آلی مثل اوره، کراتینین، کراتین، اسیداوریک است و ۲۵ گرم آن شامل نمکهای کانی به ویژه کلروها، یون سدیم و فسفاتهاست. همچنین حاوی بلور و یاخته است.

مقدار کلرور ادرار بستگی زیادی با مقدار نمک مصرف شده دارد. به طور متوسط روزانه در حدود ۱۰ گرم کلرور سدیم از را ادرار دفع می شود. هنگامی که مقدار نمک مصرف شده در غذاها کم باشد، مقدار کمتری کلرور دفع می گردد. اگر مقدار کلرور پلاسما از ۵۶۰ میلیگرم در ۱۰۰ میلی لیتر کمتر شود، مقدار کلرور دفع شده در ادرار تقریباً به صفر نیز تجاوز کند.

آزمایش تعیین کلرور در ادرار

در این آزمایش کلر ادرار را به وسیله مقدار معینی از نیترات نقره به صورت کلرور نقره رسوب می دهید و نیترات نقره اضافی را پس از صاف کردن با تیوسیانات آمونیوم تیت্রে می کنید. برای پایان عمل باید از معرف مناسب استفاده کرد این معرف کلرورفریک است، رنگ قرمز تیوسیانات فریک نشان دهنده نقطه تیتراسیون است.

مواد و وسایل مورد نیاز

لوله آزمایش، محلول استاندارد نیترات نقره، اسیدنیتریک غلیظ، محلول اشباع فریک آلومینیوم و محلول ۸٪ پرمنگنات پتاسیم.

روش کار

- ۱- ۱۰ میلی لیتر ادرار را به یک ارلن ۱۰۰ میلی لیتر منتقل کنید.
- ۲- ۱ میلی لیتر محلول اسید نیتریک غلیظ و ۲ میلی لیتر محلول اشباع شده زاج آهن به آن بیافزایید.
- ۳- اگر رنگ قرمز دیده شد، چند قطره محلول پرمنگنات ۸، به مخلوط اضافه کنید.
- ۴- ۲۰ میلی لیتر نیترات نقره اضافه کنید تا تمام کلرور سدیم رسوب کند و مقداری نیترات نقره در محلول باقی بماند.
- ۵- پس از ۱۰ دقیقه حجم محلول را به کمک آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر برسانید و صاف کنید
- ۶- تیوسیانات آمونیوم را در بورت بریزید و سطح آزاد را یادداشت کنید.
- ۷- ۵۰ میلی لیتر از محلول صاف شده را در بشر ۲۵۰ میلی لیتری بریزید و با تیوسیانات آمونیوم آن را تیت্রে کنید و مرتباً به کمک همزن شیشه ای آن را به هم بزنید.
- ۸- نخستین رنگ پایدار قرمز مایل به قهوه‌ای دلیل پایان یافتن تیتراسیون است.
- ۹- حجم آمونیوم مصرف شده را به میلی لیتر از روی بورت تعیین کنید و آن را a بنامید.

۱۰- مقدار کلرورادرار را از طریق زیر محاسبه نمایی

۱۱- مقدار محلول تیوسیانات آمونیومی که برای تیتراسیون مایع صاف شده بکار می رود معرف مقدار اضافی محلول نیترات نقره است که در ۵۰ میلی لیتر صاف شده وجود دارد و صرف رسوب کلرور ادرار نشده است و برای محاسبه مقدار کلرور سدیمی که در ۱۰۰ میلی لیتر ادرار وجود دارد طبق فرمول زیر محاسبه می گردد.

$$(10-a) \times 0.01 \times 100$$

گرم کلروردر ۱۰۰ میلی لیتر ادرار =

5