الدم

الدم : هو عبارة عن نسيج ينتمي إلى نوع متخصص من الأنسجة الضامة تسمى الأنسجة السائلة أو الوعائية ويتحرك في نظام مغلق يعرف بنظام الدورة الدموية . يتألف الدم من مادة أساسية هي البلازما توجد على هيئة سائل أصفر اللون و تسبح في هذه المادة السائلة خلايا الدم ،حيث تكون خلايا الدم في الإنسان حوالي 45% من حجم الدم أما الباقي 55% فيمثل البلازما .

توجد في الدم ثلاث أنواع من الخلايا :

1- كريات الدم الحمراء (Red Blood Cells (RBC :

خلايا كروية صغيرة الحجم يبلغ متوسط قطر الواحدة 7.5 مايكرون ، تتميز بليونتها أي أنها تستطيع تغيير شكلها بتأثير الضغط الخارجي عليها ولكنها تستعيد شكلها الأصلي بمجرد زوال المؤثر ، يتراوح عدد كريات الدم الحمراء في الإنسان (4-5.5) مليون كرية في كل 1مل من الدم ويكون عددها في الذكر أكبر من الأنثى . إن الوظيفة الرئيسية لكريات الدم الحمراء هي نقل غازات التنفس فهي تقوم بحمل الأوكسجين من الرئتين إلى الأنسجة المختلفة و حمل ثاني أوكسيد الكاربون من الأنسجة إلى الرئتين بواسطة الهيموغلوبين الذي يرتبط بسهولة مع هذه الغازات. يعتبر الكبد العضو الرئيسي الذي يقوم بإنتاج هذه الكريات في معظم أجنة اللبائن و يأتي الطحال و الغدد اللمفية بعد الكبد في الأهمية من حيث إنتاج هذه الكريات ، بعد الولادة تنتج الكريات الحمراء بصورة رئيسية في نخاع العظم . إن عمر كريات الدم الحمراء في الإنسان قصير جداً لا يزيد على 120 يوم تتكسر بعدها إلى قطع صغيرة و تلتهم بواسطة خلايا الجهاز الطلائي الداخلي الشبكي .

2- كريات الدم البيضاء (White Blood Cells (WBC :

وهي خلايا دموية غير ملونة لعدم احتوائها على صبغة الهيموغلوبين الحمراء ولكنها تحتوي على نواة . حجمها دائماً اكبر من كريات الدم الحمراء ولكن عددها اقل ، تقسم هذه الخلايا إلى مجموعتين رئيسيتين :

أ. خلايا غير حبيبيه و تشمل :

- **الخلايا اللمفية Lymphocyte** : أصغر خلايا الدم البيضاء حجما و تمتاز بكبر النواة التي تكاد تملأ الخلية أما السايتوبلازم فكميته قليلة ولا توجد أي حبيبات فيه . لهذه الخلايا دور مهم في عملية المناعة لأنها تقوم بإنتاج و إفراز الأجسام المضادة .
- **الخلايا وحيدة النواة Monocyte** : اكبر الخلايا التي توجد بالدم بشكل طبيعي حجماً وتتميز بكون نواتها على شكل كليه تقوم هذه الخلايا بالتهام الأجسام الغريبة كالجراثيم و الخلايا الميتة .

ب. خلايا حبيبيه و تشمل:

- **الخلايا المتعادلة Neutrophils** : تعتبر هذه الخلايا اكثر أنواع كريات الدم البيضاء عدداً و تكون نسبتها (60–65)% من مجموع كريات الدم البيضاء و أكثرها أهمية في الدفاع عن الجسم حيث يزداد عددها في قمة الالتهاب الحاد لكي تقوم بالتهام الجراثيم ، تتكون نواة الخلية المتعادلة من عدد من الفصوص يتراوح من (2–5) فصوص .
- **الخلايا الحامضية Eosinophils** : تتميز هذه الخلايا بوجود حبيبات كبيرة في السايتوبلازم وتكون نسبتها (1–3)% من مجموع كريات الدم البيضاء وتتالف نواتها من فصين ، تعتبر الخلايا الحامضية من الخلايا الأكولة حيث تقوم بابتلاع المركبات الناتجة عن تفاعل الأجسام المضادة مع الانتجينات ، كما أنها تمتص الهستامين الناتج عن حالات الحساسية وكذلك تمنع تأثير المواد السامة التي تدخل الجسم .
- **الخلايا القاعدية Basophils** : وهي اقل الخلايا عدداً حيث تبلغ نسبتها (0.5–1)% من مجموع الخلايا البيضاء التي توجد بالدم بشكل طبيعي . تحتوي هذه الخلايا على مادة الهيبارين المانعة للتخثر وعلى الهستامين لهذا فأن عد الخلايا القاعدية يفيد في دراسة تفاعلات الحساسية فهنالك ارتباط بين ارتفاع الخلايا القاعدية وبين تركيز الهستامين في الدم .

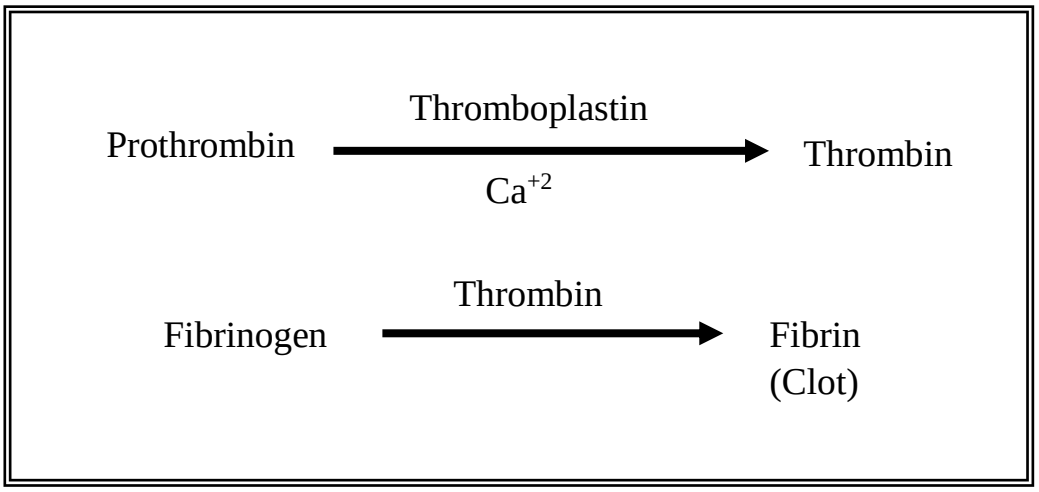
تختلف الخلايا الحبيبيه عن غير الحبيبيه من حيث المنشأ و الوظيفة فبينما نجد أن الخلايا الحبيبيه تنتج في نخاع العظم فأن الخلايا غير الحبيبيه تنتج في الأعضاء اللمفية مثل الطحال والعقد اللمفية و كذلك تنتج في الكبد. يتراوح عمر كرية الدم البيضاء من (13–20) يوم وخلال هذه الفترة تقوم الخلايا البيضاء بالدفاع عن الجسم ضد أي جسم غريب يدخل إليه بابتلاعه بواسطة الخلايا الأكولة Phagocytes وهي (وحيدة الخلية و القاعدية و الحامضية و المتعادلة) وبإنتاج الأجسام المضادة بواسطة الخلايا اللمفية . وعلى العكس من كريات الدم الحمراء لا تؤدي معظم الخلايا البيضاء وظائفها أثناء وجودها بالدم و إنما تقوم بعملها في الأنسجة الضامة الموجودة خارج الأوعية الدموية .

3- الصفائح الدموية Platelets :

وهي أصغر العناصر المكونة للدم ، بيضوية الشكل وتمتاز بوجود حبيبات واضحة في السايتوبلازم . تنتج الصفائح الدموية في نخاع العظم ويتحكم في تكوينها هرمون Thrombopoyetine ويتراوح حجمها من (2–4) مايكرون ، يتراوح عمرها من (8–14) يوم أما عددها فيتراوح في الشخص السليم من (150.000–400.000) صفيحة في كل 1مل من الدم ، تحتوي الصفائح الدموية على مادة تلعب دوراً مهماً في عملية تخثر الدم تعرف بالثرومبوبلاستين .

ميكانيكية تخثر الدم :

توجد عوامل التخثر في الدم وهي الفايبرينوجين و البروثرومبين و أملاح الكالسيوم و مضاد الثرومبين (وهو عبارة عن مادة بروتينية مانعة للتخثر) ، وتحتوي الأقراص الدموية السابحة في بلازما الدم على مادة الثرومبوبلاستين البروتينية المساعدة في عملية التخثر ، فإذا ما حصل أي جرح أو تمزيق في الوعاء الدموي فان الدم يندفع مختلطاً بالنسيج المحيط مما يؤدي إلى تحرير الثرومبوبلاستين من الصفائح الدموية المتكسرة والذي يتفاعل في الحال مع البروثرومبين بوجود أيونات الكالسيوم مكوناً الثرومبين والذي يعمل مباشرة على تحويل الفايبرينوجين الموجود بالدم إلى الفايبرين وهي عبارة عن كتلة بروتينية غير ذائبة شبيهة بالخيوط سرعان ما تعمل على إيقاع خلايا الدم في شركها مكونة الخثرة ، ويمكن تلخيص ميكانيكية التخثر بالتفاعلات التالية :



المواد المانعة للتخثر :

1. **الهيبارين** : مادة مانعة للتخثر موجودة أصلا في معظم الأنسجة الجسمية ولكن وجودها بالدم اقل من النسبة اللازمة لتخثره عند انسيابه نتيجة لحدوث جرح ما في الوعاء الدموي . يصنف الهيبارين ضمن السكريات المتعددة Polysaccharides ويمكن الحصول عليه تجارياً في الوقت الحاضر بشكل ملح من أملاح الصوديوم أو البوتاسيوم أو الأمونيوم ، يعزى عمل الهيبارين إلى تصديه للثرومبين (Antithrombin) أي يقف للحيلولة دون تحول البروثرومبين إلى الثرومبين وبذلك يمنع تكوين الراسب الخيطي الفايبرين من الفايبرينوجين والذي يتم بمساعدة الثرومبين .
2. **الاوكزالات** : وتشمل اوكزالات الصوديوم أو البوتاسيوم أو الأمونيوم أو الليثيوم حيث تعمل هذه المضادات على ترسيب أيونات الكالسيوم الموجودة في الدم والأساسية في عملية التخثر. تعتبر اوكزالات البوتاسيوم من أوسع هذه المضادات استخداماً في المختبرات حيث يمكن أضافتها بنسبة 2 ملغم لكل 1مل من الدم .

.3

4. **EDTA**:يعتبر Ethylene Diamine Tetra Acetic acid عامل كلابي chelating agent يفضل استعماله في اختبارات علم الدم بصورة خاصة حيث يعمل على المحافظة على المكونات الخلوية من التلف ويستخدم عادة بشكل ملح ثنائي الصوديوم أو البوتاسيوم بتركيز يقارب (1-2) ملغم لكل (1مل) من الدم وتعزى فعالية هذا الملح كمضاد للتخثر إلى قابليته على الارتباط مع كالسيوم الدم وعزله كلياً عن القيام بدوره في عملية تخثر الدم.
5. **فلوريد الصوديوم** : يعتبر ملح فلوريد الصوديوم مادة مضادة لانحلال سكر الدم إضافة إلى فعاليته الضعيفة كمادة مانعة للتخثر حيث يستخدم مخلوطاً مع أوكزالات البوتاسيوم في نماذج تحليل السكر . بينما لا يستخدم في جمع عينات الدم الخاصة بالتحليلات المرضية الأنزيمية لأنه يثبط هذه الأنزيمات ويفقدها طبيعتها الفعالة .

بلازما الدم : هو الجزء السائل من الدم والذي يتبقى بعد أن تنفصل عنه الخلايا الدموية ، والبلازما سائل اصفر اللون (بسبب وجود أصباغ الصفراء) معقد التركيب يحتوي على 91% ماء والمتبقي 9% فتشمل المواد الذائبة فيه وأهمها :

- البروتينات (الألبومين ، الكلوبيولين ، الفايبرينوجين وغيرها) .
- الكربوهيدرات (الكلوكوز) .
- الدهونات (الكولسترول ، الدهن الفوسفاتي Phospholipids) .
- الأملاح اللاعضوية مثل أملاح (Na^+ , K^+ , Ca^{+2}) .
- مركبات نيتروجينية غير بروتينية (يوريا ، أمونيا ، كرياتنين ، حامض اليوريك) .
- هورمونات و أجسام مضادة .

حجم الدم : يمثل الحجم الكلي للدم في الإنسان حوالي 7% من وزن الجسم ويقدر حجم الدم بحوالي (70 مل) من الدم لكل كيلو غرام واحد من الجسم .

لزوجة الدم : تعطي معرفة لزوجة الدم معلومات مهمة عن مدى المقاومة لسريان الدم خلال الشعيرات و الأوعية الدموية الصغيرة ومن ثم ضغط الدم . تبلغ لزوجة الدم خمسة أضعاف لزوجة الماء ، وترجع اللزوجة العالية للدم بصفة خاصة إلى الكريات الدموية ومن أهم العوامل التي تؤثر على لزوجة الدم هو تغير عدد وحجم كريات الدم الحمراء و الخلايا البيضاء .

أنواع الدم :

1) **الدم الوريدي** : وهو الدم المأخوذ من الوريد والذي أغلب الفحوصات المختبرية تتم عليه لإيجاد كثير من تراكيز المواد الكيميائية مثل السكر و اليوريا و الأملاح وغيرها .

2) **الدم الشرياني** : وهو الدم المأخوذ من الشريان والذي يستخدم في فحوصات خاصة مثل تقدير O_2 , CO_2 , Hb وخاصة بالنسبة للمرضى الراقدين في غرفة العناية المركزة .

أهم الوظائف التي يقوم بها الدم :

1. نقل الأوكسجين من الرئتين إلى الأنسجة و ثاني أوكسيد الكربون من الأنسجة إلى الرئتين .
2. نقل المواد الغذائية إلى الأنسجة ونقل الفضلات الناتجة من عملية التمثيل الغذائي إلى الكلية .
3. يلعب دوراً مهما في حفظ درجة حرارة الجسم .
4. يساعد على حفظ التوازن الحامضي–القاعدي في الجسم .
5. يقوم الدم بدور فعال في تنظيم الموازنة المائية في الأنسجة .
6. نقل المنظمات الكيميائية لعمليات التمثيل في الجسم مثل الهرمونات و الفيتامينات .
7. يحتوي على ميكانيكية خاصة للتجلط والتي تحميه ضد النزيف .
8. يحتوي الدم على كريات الدم البيضاء ومضادات السموم ومضادات حيوية والتي تعمل ضد الميكروبات و الجراثيم و الأجسام الغريبة .

تجري على الدم عدة فحوصات مختبريه حيث هناك ثلاث نماذج للدم يمكن إجراء الفحوصات عليها :

- **الدم الكلي Whole blood**: حيث تستخدم مادة مانعة للتخثر تضاف لنموذج الدم المسحوب للحصول على جميع مكونات الدم وحسب نوع الفحص المطلوب .
- **مصل الدم Serum** : والذي نحصل عليه بعد ترك نموذج الدم المسحوب يتخثر لوحده ثم إجراء الطرد المركزي عليه وفصل الراشح الأصفر اللون عن الراسب .
- **البلازما Plasma** : ونحصل عليه بإضافة مادة مانعة للتخثر لنموذج الدم المسحوب ثم إجراء الطرد المركزي عليه وفصل السائل الأصفر الحاوي على الفايبرينوجين عن الخلايا الدموية المترسبة .

Blood proteins

البروتينـات : تعتبر البروتينات أكثر الجزيئات الخلوية انتشارا وتكون حوالي 50% أو أكثر من وزن الخلية الحية ، تم اشتقاق أسم البروتين protein من كلمة proto والتي تعني باللغة الإغريقية الأول ومن المؤكد أن البروتينات تأتي بالمرتبة الأولى بين المكونات الأساسية للمادة الحية ولا بقاء للأحياء بدونها ، تمتلك البروتينات أهمية كبيرة من الناحية التركيبية و الوظيفية مثل المشاركة في تكوين جدران الخلايا و تحفيز التفاعلات الكيميائية الحياتية كما أن لها عمل منظم كالهورمونات .

توجد البروتينات في جسم الإنسان على نوعين ، نوع ذائب و نوع غير ذائب و تقوم الفحوصات في مختبرات الكيمياء السريرية على النوع الذائب لسهولة استخدام العينات السائلة بدلاً من العينات الصلبة . إن كل من العينات السائلة الثلاث (مصل الدم و الإدرار و سائل النخاع الشوكي) تحتوي على أنواع عديدة من البروتينات إلا أن دراستنا سوف تقتصر على بروتينات مصل الدم التي يمكن تحليلها بشكل بروتين كلي Total protein أو بشكل مجاميع أو بصورة انفرادية .

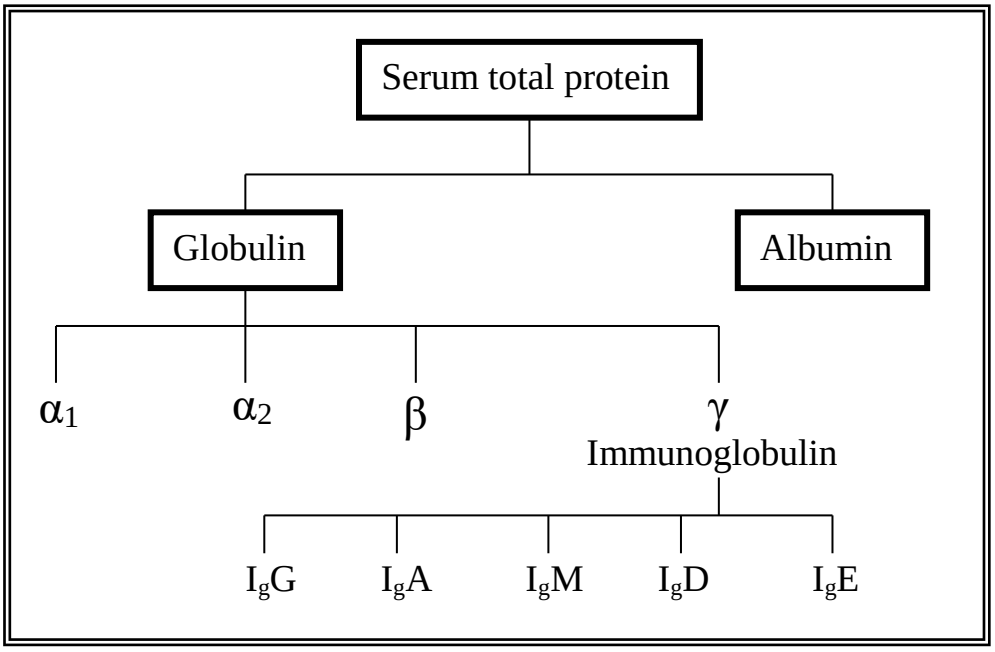
تتراوح تراكيز البروتينات في مصل الدم من (6.2-8 gm/dl) في الحالات الطبيعية ، حيث يمكن تقسيم بروتينات مصل الدم إلى الألبومين Albumin و الكلوبيولين Globulin كما أن هنالك أنواع أخرى من البروتينات مثل (الأنزيمات والهرمونات والبروتينات الدهنية والبروتينات السكرية) توجد بكميات صغيرة جداً .

إن مستوى الألبومين في مصل الدم يكون بين (3.8-5.4 gm/dl) أي اكثر من نصف مستوى البروتينات في الدم ومن أهم وظائفه .

1. المحافظة على الضغط التناضحي وتنظيم توزيع الماء بين البلازما و الأنسجة.
2. يعمل على نقل المركبات شحيحة الذوبان في الماء مثل الأحماض الدهنية و البيليروبين و حامض اليوريك و الهورمونات وبعض الأدوية شحيحة الذوبان في الماء مثل الأسبرين.
3. حمل كثير من الأيونات مثل أيونات الكالسيوم Ca^{+2} حيث يوجد 50% من الكالسيوم على هيئة مرتبطة مع الألبومين.

أما الكلوبيولين فيوجد بالبلازما بأنواع مختلفة هي (α_1 , α_2 , β , γ) حيث أن α_1-globulin هو عبارة عن α_1-antitrypsin و Glycoprotein و Lipoprotein ذات كثافة عالية بينما α_2-globulin فيوجد بشكلين بصورة رئيسية هما Haptoglobin و α_1-macroglobulin. إن – β globulin تتألف بالدرجة الأولى من بروتينات تسمى باللايبوبروتين ذات الكثافة العالية جداً (VHDL) مثل Transferrin الخاص بالارتباط بالحديد للمساعدة على انتقاله بالدم أو لايبوبروتين ذات الكثافة

الواطئة (LDL) ، إن γ-globulin يحتوي على الأجسام المضادة المسؤولة عن المناعة ضد كثير من الأمراض لذلك يطلق عليها Immunoglobulin. والمخطط التالي يوضح أنواع بروتينات مصل الدم .



الأهمية السريرية للبروتينات :

يتأثر مستوى بروتينات مصل الدم في كثير من الحالات المرضية لذا يفضل إجراء قياس مستوى البروتينات الكلية ثم إيجاد مستوى الألبومين و الكلوبيولين بالإضافة إلى إجراء الفصل بالهجرة الكهربائية لمعرفة المزيد عن الأجزاء الثانوية من الكلوبيولين والتي تعطي تشخيص أدق خاصة في أمراض الكبد و الكلى و الأمراض الخبيثة.

الجدول التالي يوضح بعض الحالات المرضية التي يصاحبها تغير في مستوى البروتينات :

Disorder	Globulin	Albumin	Total protein
Dehydration	High	High	High
Multiple myeloma	High	Normal	High
Hepatic damage	High	Low	Normal
Cirrhosis	High	Low	Normal
Renal diseases	Normal	Low	Low
Nephrotic syndrome	Normal	Low	Low
Sever malabsorption	Normal	Low	Low
Massive burns	Low	Low	Low
Extensive bleeding	Low	Low	Low
Dilution	Low	Low	Low

الأساس النظري للتجربة :

تقاس كمية البروتينات بطريقة بايوريت Biuret و التي تعتمد على تفاعل محلول النحاس القاعدي (كبريتات النحاس القاعدية) مع الأواصر الببتيدية في البروتين لتعطي معقد ذو لون بنفسجي تقاس الامتصاصية له عند طول موجي 546 نانومتر وتعتبر هذه الطريقة دقيقة و حساسة . في حالة قياس مستوى الألبومين فقط يجب ترسيب الكلوبيولين أولا بواسطة محلول كبريتيت الصوديوم Na_2SO_3 بتركيز 28% ثم تجرى نفس الخطوات التي تستخدم لقياس مستوى البروتين الكلي ، أما حساب كمية الكلوبيولين فتتم بطرح كمية الألبومين من كمية البروتين الكلي.

طريقة العمل :

في ثلاث أنابيب اختبار نظيفة نجري الإضافات التالية

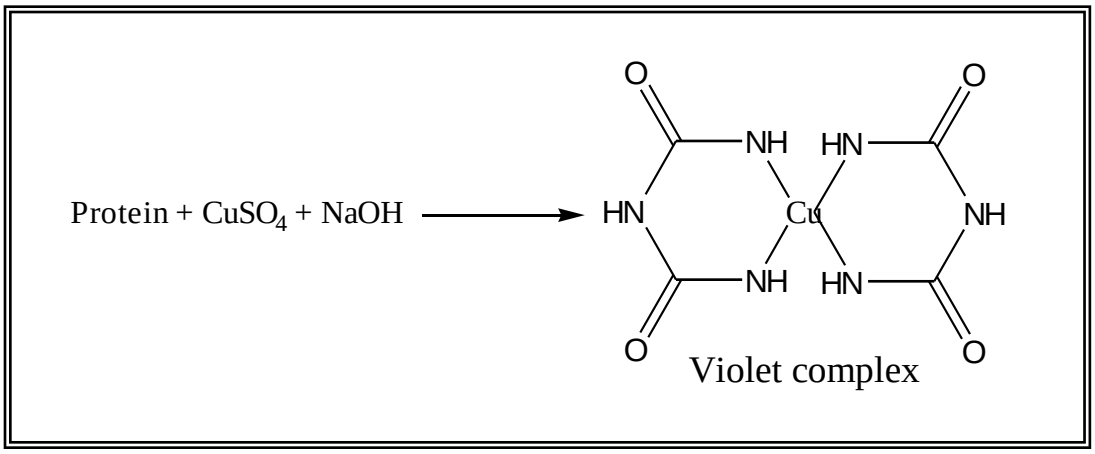
Reagents	Blank (B)	Standard (S)	Test (T)
Reagent blank	0.06 ml	_____	_____
Standard	_____	0.06 ml	_____
Serum	_____	_____	0.06 ml
Biuret reagent	3 ml	3 ml	3 ml

يمزج الخليط جيداً ثم يترك في الحاضنة لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 25 درجة مئوية ، بعد ذلك تقاس الامتصاصية للمحلول الملون على طول موجي 546 نانومتر .

الحسابات :

$$\text{Total protein} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{standard}}} * \frac{\text{Standard concentration}}{6\ \text{gm/dl}}$$

$$\text{Total protein} - \text{Albumin} = \text{Globulin}$$



القيم الطبيعية :

1. T. Protein 6.2-8 gm/dl
2. Albumin 3.8-5.4 gm/dl
3. Globulin 1.3-3.2 gm/dl

تحضير المحاليل :

Biuret reagent: يذاب 3 غم من كبريتات النحاس المائية مع 9 غم من ترترات الصوديوم–البوتاسيوم في 500 مل من محلول (0.2N NaOH) . يضاف بعد ذلك 5 غم من يوديد البوتاسيوم ويكمل الحجم إلى واحد لتر بواسطة محلول (0.2N NaOH) .

Reagent blank: يذاب 9 غم من ترترات الصوديوم–البوتاسيوم في 1000 مل من محلول (0.2N) هيدروكسيد الصوديوم.

Blood Glucose

الكلوكوز: هو أحد مركبات الكربوهيدرات المهمة التي تشكل الغذاء الرئيسي ومصدر الطاقة للإنسان ، ينتمي الكلوكوز إلى صنف السكريات الأحادية الألديهايدية الحاوية على ست ذرات من الكربون والمعروفة باسم الهكسوز.

يمثل الكلوكوز الناتج الأساسي لهضم الكربوهيدرات في الأمعاء الدقيقة حيث ينتقل بعد ذلك من الأمعاء إلى الدم وصولاً إلى الكبد والذي يتحول فيه إلى نشا حيواني (كلايكوجين) ويخزن هناك أو يتأيض إلى غاز ثاني أوكسيد الكربون وماء ليجهز الجسم بالطاقة اللازمة (وخصوصاً الدماغ) أو يتحول إلى حوامض كيتونية وحوامض أمينية وبروتينات أو يتحول إلى دهن ويخزن بشكل نسيج دهني (adipose-tissue) .

تتراوح القيمة الطبيعية للكلوكوز في مصل الدم بين (75-120 mg/dl) وعندما تزداد كمية الكلوكوز أعلى من هذه القيمة فهذه الحالة تعرف بالـ (Hyperglycemia) ، أما عندما تقل القيمة عن المستوى الطبيعي فتعرف الحالة بـ (Hypoglycemia) .

يمكن المحافظة على المستوى الطبيعي للكلوكوز بالدم في حالة الصيام عن الطعام و الشراب لفترات زمنية طويلة (الذي يؤدي إلى نقصان في كمية الكلوكوز الذي يحصل عليها الجسم من الغذاء) وذلك بقيام الجسم بسحب كمية من الكلايكوجين المخزون في الكبد وتحويلها إلى الكلوكوز بعملية تعرف بانحلال الكلايكوجين (Glycogenolysis) أما عند ارتفاع مستوى الكلوكوز بالدم (نتيجة الزيادة بالامتصاص الحاصل بالأمعاء) فأن الكلوكوز الزائد ينتقل إلى الكبد ويدخل في عملية تكوين الكلايكوجين الـ(Glycogenesis) ويخزن في الكبد و العضلات على شكل كلايكوجين .

إن مستوى الكلوكوز بالدم ينظم بفعل عدد من الهرمونات التي يمكن تلخيصها بما يلي :

1. الأنسولين Insulin : يفرز من قبل خلايا بيتا في البنكرياس وهو هرمون بروتيني التركيب يساعد على عملية تكوين الكلايكوجين وينتج عن عمله هذا انخفاض في مستوى الكلوكوز بالدم.
2. هرمون النمو و الهرمون المحرض للقشرة الكظرية Growth hormone and Adrinocortico-trophic hormone :كلا الهرمونين يفرزان من قبل الغدة النخامية الأمامية (Anterior pituitary gland) ولهما تأثير مضاد للأنسولين حيث أن العلاقة بين تركيز هذين الهرمونين وكمية كلوكوز الدم علاقة طردية .
3. هرمون الهايدروكورتيزون Hydrocortizon hormone : يفرز من قبل لحاء الغدة الكظرية (قشرة الكظر) Adrenal cortex ويساعد على حدوث عملية تكوين الكلوكوز من مصادر غير كاربوهيدراتية في عملية تعرف بالـ Gluconeogenesis .

4. الهرمون الكظري Epinephrine hormone : يفرز من قبل نخاع الكظر ويساعد في عملية انحلال الكلايكوجين إلى الكلوكوز .
5. هرمون الكلوكاكون Glucacon hormone : يفرز من قبل خلايا ألفا في البنكرياس ويساعد في عملية انحلال الكلايكوجين مما يؤدي إلى زيادة مستوى الكلوكوز في الدم .
6. هرمون الثايروكسين Thyroxine hormone : يفرز من قبل الغدة الدرقية ويساعد على انحلال الكلايكوجين وكذلك يرفع من نسبة امتصاص الكلوكوز في الأمعاء الدقيقة مما يؤدي إلى ارتفاع نسبة سكر الكلوكوز في الدم .

الأهمية السريرية للكلوكوز :

يعتبر مرض داء السكري (البول السكري) Diabetes Mellitus من أهم الأمراض ذات العلاقة بازدياد مستوى الكلوكوز بالدم ، والذي يتميز بنقص مستويات الأنسولين بالدم حيث يؤدي هذا النقص إلى عدم إمكانية الكلوكوز من الدخول إلى خلايا الكبد و العضلات لتكوين الكلايكوجين وهذا بدوره يؤدي إلى عطل واضطراب عمليات أيض البروتينات والدهون مما يسبب زيادة في توليد الأجسام الكيتونية وبالتالي حدوث الغيبوبة السكرية Diabetic coma .

الأساس النظري : (طريقة كنك–كارنر King-Garner method)

تستند هذه الطريقة على خاصية الاختزال الكبيرة للكلوكوز ، حيث يعمل على اختزال محلول كبريتات النحاسيك بالوسط القاعدي إلى اوكسيد النحاسوز والذي بدوره يقوم باختزال محلول حامض الفوسفومولبيديك Phosphomolybdic acid إلى حامض الفوسفومولبيدوز Phosphomolybdous acid (المولبيديوم الأزرق) مكوناً محلول أزرق اللون تقاس الامتصاصية له بجهاز التحليل اللوني وعلى طول موجي 640 نانوميتر ، وان شدة اللون تتناسب طردياً مع تركيز الكلوكوز .

$$Cu^{+2} + \text{Glucose} \longrightarrow Cu_2O + \text{Gloconic acid}$$

$$Cu_2O + \text{Phosphomolybdic acid} \longrightarrow Cu^{+2} + \underset{\text{(Blue)}}{\text{Phosphomolybdous acid}}$$

طريقة العمل :

Reagents	Test	Test blank	Standard	Standard blank
Isotonic solution	3.7 ml	3.7 ml	-----	-----
Serum	0.1 ml	-----	-----	-----
Distilled water	-----	0.1 ml	-----	-----
(10%) Sodium tungstate	0.2 ml	0.2 ml	-----	-----
تخلط المحاليل جيداً ثم يفصل الراسب بواسطة النبذ بجهاز الطرد المركزي لمدة عشر دقائق .				
Supernatant	1 ml	1 ml	-----	-----
Standard	-----	-----	1 ml	-----
Distilled water	-----	-----	-----	1 ml
Mixture of solutions A&B	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
تغلق جميع الأنابيب بواسطة القطن ثم توضع في حمام مائي مغلي لمدة عشر دقائق ، تبرد الأنابيب بعدها مباشرة بواسطة ماء الحنفية .				
Phosphomolybdic acid	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
تخلط المحاليل جيداً ثم تترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة عشر دقائق إلى أن يتكون اللون الأزرق .				
Distilled water	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
تقاس الامتصاصية مباشرة و على طول موجي 640 nm .				

الحسابات :

$$\text{Blood Glucose} = \frac{A_{\text{Test}} - A_{\text{Test blank}}}{A_{\text{standard}} - A_{\text{Standard blank}}} * \text{Standard}$$

$$\text{Blood Glucose} = \frac{A_{\text{Test}} - A_{\text{Test blank}}}{A_{\text{standard}} - A_{\text{Standard blank}}} * 0.02 * \frac{100}{0.025} \text{ mg/dl}$$

تحضير المحاليل :

1. Isotonic solution: 320 ml of (3%) $Na_2SO_4.10H_2O$ + 30 ml of (7%) $CuSO_4.5H_2O$.
2. Solution A: 13 gm $CuSO_4.5H_2O$ dissolved in 1000 ml distilled water.
3. Solution B: 50 gm $NaHCO_3$ (dissolved in 700 ml distilled water) + 40 gm Na_2CO_3 + 36.8 gm Potassium oxalate/120 ml H_2O + 24 gm Sodium potassium tartarate/ 100 ml H_2O. Complete the volume up to 1L with H_2O.
4. Phosphomolybdic acid: [152.2 gm Ammonium molybdate + 20 gm Sodium tungstate + 800 ml of (10%) NaOH] boil vigorously for 20 minutes to expel (NH_3) then cool, dilute to 1400 ml with H_2O and add 500 ml of (85%) Phosphoric acid. Dilute up to 2L with H_2O.
5. Stock Standard: 100 mg Glucose/100 ml H_2O.
6. Working Standard: 2 ml Stock/ 100 ml H_2O (saturated with benzoic acid).

BLOOD UREA

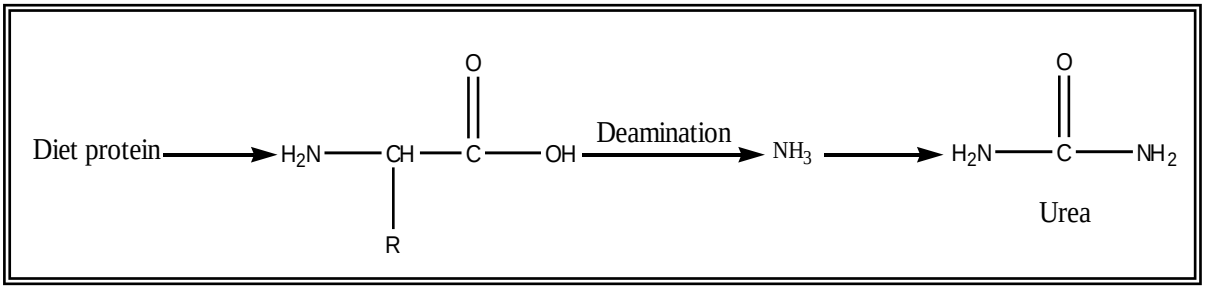
اليوريا : تنتمي اليوريا إلى صنف المركبات النيتروجينية غير البروتينية و التي تضم إضافة إلى اليوريا كل من الكرياتين و الكرياتنين و حامض اليوريك و الامونيا و الحوامض الأمينية وجميع هذه المركبات تعتبر من مكونات الدم الكيمياوية التي تدرس عادة في موضوع وظيفة الكلية بسبب علاقتها المباشرة بهذا العضو الحيوي . في الوقت الحاضر يعبر عن اليوريا بنيتروجين اليوريا (Urea Nitrogen) وذلك لكي يمكن التمييز بين كمية النيتروجين الموجودة في اليوريا وكمية النيتروجين الموجودة في المركبات النيتروجينية غير البروتينية (Non-Protein Nitrogen compounds) و يطلق على نيتروجين اليوريا اسم (Blood Urea Nitrogen) ويرمز له (BUN) ولمعرفة مقدار النيتروجين الموجود في اليوريا نتبع ما يلي :

الوزن الجزيئي لليوريا = 60 . وكل جزيئة يوريا تحتوي على ذرتي نيتروجين وزنهما = 28 .

كمية النيتروجين الموجودة في جزيئة واحدة من اليوريا = 60/28 = 0.467

إذن كمية نيتروجين اليوريا (BUN) = كمية اليوريا x 0.467

تعتبر اليوريا من أهم النواتج الأيضية للبروتين . حيث أن إزالة مجموعة الأمين من الأحماض الأمينية يؤدي إلى تكوين اليوريا وتحدث هذه العملية عادة في خلايا الكبد . يعتبر تكوين اليوريا هو الوسيلة الرئيسية للتخلص من كميات النيتروجين الفائضة عن حاجة الجسم و التي تطرح إلى الخارج عن طريق الإدرار .



تتراوح النسبة الطبيعية لليوريا في الدم بين (15-40 mg/dl) ، تزداد هذه النسبة بصورة طبيعية عند تناول كميات كبيرة من البروتين بينما تكون هذه النسبة منخفضة بصورة طبيعية في حالات الحمل عند المرأة وعند الأطفال دون سن البلوغ ، وترتفع هذه النسبة أيضا عند تقدم الإنسان في العمر . ترتفع النسبة بصورة غير طبيعية و تصل إلى 500 mg/dl في بعض الحالات المرضية المتقدمة .

الأهمية السريرية :

إن تقدير اليوريا في مصل الدم يعتبر في الوقت الحاضر من اكثر الكشوفات ذات الأهمية في تقييم وظيفة الكلية و تشخيص الحالات المرضية التي تحدث في الكلية ومن أهم الحالات المرضية التي يمكن تشخيصها بسبب الزيادة أو النقصان في مستوى اليوريا هي :

أ- أهم الحالات المرضية التي يزداد فيها مستوى اليوريا .

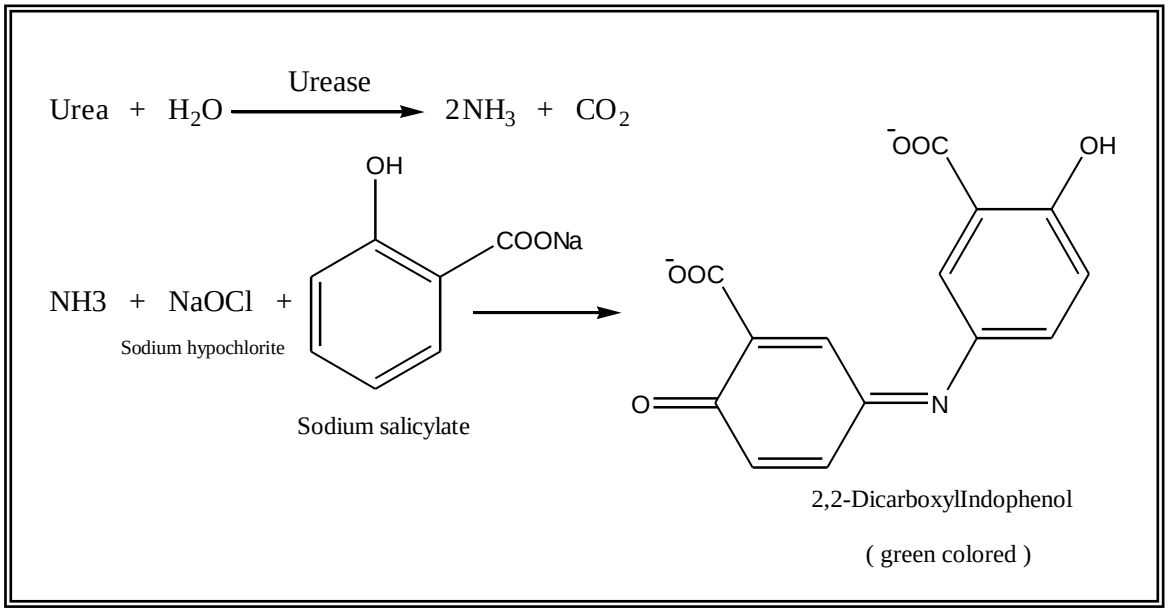
1. Impaired renal function.
2. Chronic nephritis.
3. Renal failure.
4. Nephrosclerosis.
5. Glomerulonephritis.
6. Obstruction of urinary tract.
7. Fever.
8. Cardiac failure.
9. Intestinal obstruction.

ب- أما أهم الحالات المرضية التي يقل فيها مستوى اليوريا عن مستواه الطبيعي فهي .

1. Liver diseases.
2. Malnutrition.
3. Acute dehydration.

الأساس النظري للتجربة :

تستند الطريقة على أساس تحويل يوريا مصل الدم إلى الأمونيا بفعل أنزيم اليوريز (Urease). بعد ذلك وفي وسط قاعدي تتفاعل الأمونيا مع سلسلات الصوديوم (Sodium salicylate) و هايبوكلورات الصوديوم (Sodium hypochlorite) لتكوين معقد أخضر اللون يسمى Indophenol تقاس الامتصاصية له عند طول موجي 580 nm .



طريقة العمل :

Reagents	Blank	Standard	Test
Standard	------	30 µl	------
Serum	------	------	30 µl
Working solution	3 ml	3 ml	3 ml
Shake. Incubate for at least 5 minutes at 37 ^{o}C or 10 minutes at 20-25 ^{o}C. Then add.			
Alkaline reagent	3 ml	3 ml	3 ml
Shake. Incubate for at least 5 minutes at 37 ^{o}C or 10 minutes at 20-25 ^{o}C. Then measure the absorbance at 580 nm.			

الحسابات :

$$\text{Blood Urea} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{standard}}} * \text{Standard concentration}$$

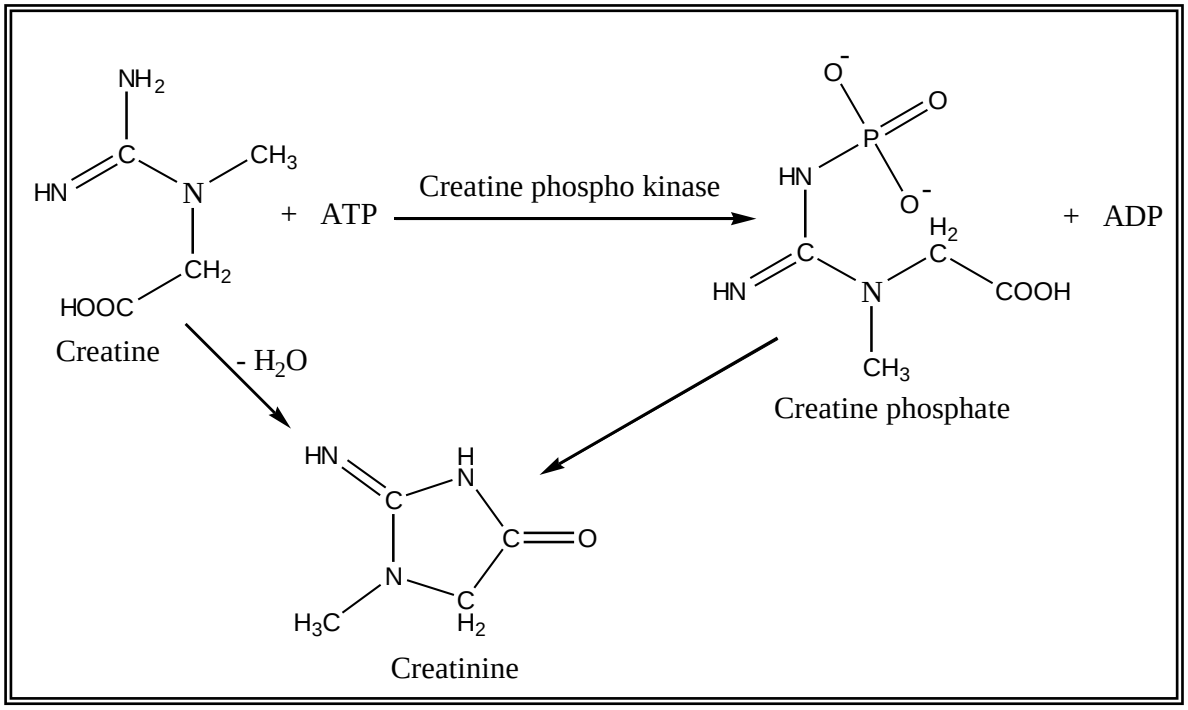
50 mg/dl

تحضير المحاليل :

1) Working solution: [(52 mmol/l) Sodium salicylate + (1 mmol/l) EDTA + Urease + (2.83 mmol/l) Sodium nitroprusside] in (40 mmol/l) Phosphate buffer pH 8.
2) Alkaline reagent: (83 mmol/l) Sodium carbonate + (3.75 mmol/l) Sodium hypochlorite.

SERUM CREATININE

الكرياتنين : عبارة عن مركب نيتروجيني غير بروتيني يوجد في العضلات (muscles) و الدماغ (brain) و الدم (blood) . إن الكرياتنين هو كرياتين مزال منه جزيئة ماء . حيث يتكون الكرياتين أو ما يسمى (Methyl guanidino acetic acid) في الكبد أو البنكرياس من ثلاث حوامض أمينية هي الأرجنين و الكلايسين و المثيونين ، بعد تكونه (أي الكرياتين) ينتقل إلى الأوعية الدموية ويتوزع إلى خلايا عديدة في جسم الإنسان و خاصة الخلايا العضلية (muscle cells) ، في العضلات تتصل مجموعة الفوسفيت ذات الطاقة العالية بالكرياتين عن طريف اصرة فوسفاتية حيث تسمى هذه العملية بفسفرة الكرياتين (creatine phosphorylation) ، وينتج عن هذه العملية مركب عالي الطاقة يسمى (creatine phosphate) له دور مهم في المساهمة في عملية تقلص و انبساط العضلات .



يعتبر الكرياتنين الناتج النهائي للتمثيل الغذائي للكرياتين وعلى هذا الأساس فأنه يعتبر من الفضلات المشتقة من الكرياتين و التي ليس لها قيمة في الجسم و تطرح إلى الخارج عن طريق الكلية مع الإدرار . يعتبر الكرياتنين أقل مركبات النيتروجين تغيراً في الدم فقيمته ثابتة تقريباً للشخص السليم . حيث يتحول يومياً 2% من الكرياتين إلى الكرياتنين .

$$\text{Creatine} \xrightarrow[\text{Daily}]{2\%} \text{Creatinine} \longrightarrow \text{Blood} \longrightarrow \text{Kidney} \longrightarrow \text{Urine}$$

الأهمية السريرية :

يعتبر تقدير الكرياتنين من أكثر الكشوفات ذات الأهمية في تقييم وظيفة الكلية ، حيث يساهم والى حد كبير في تشخيص أمراض الكلية بصورة خاصة .

أ- أهم الحالات المرضية التي يقل فيها مستوى الكرياتنين .

1. Muscular dystrophy.
2. Muscular atrophy.

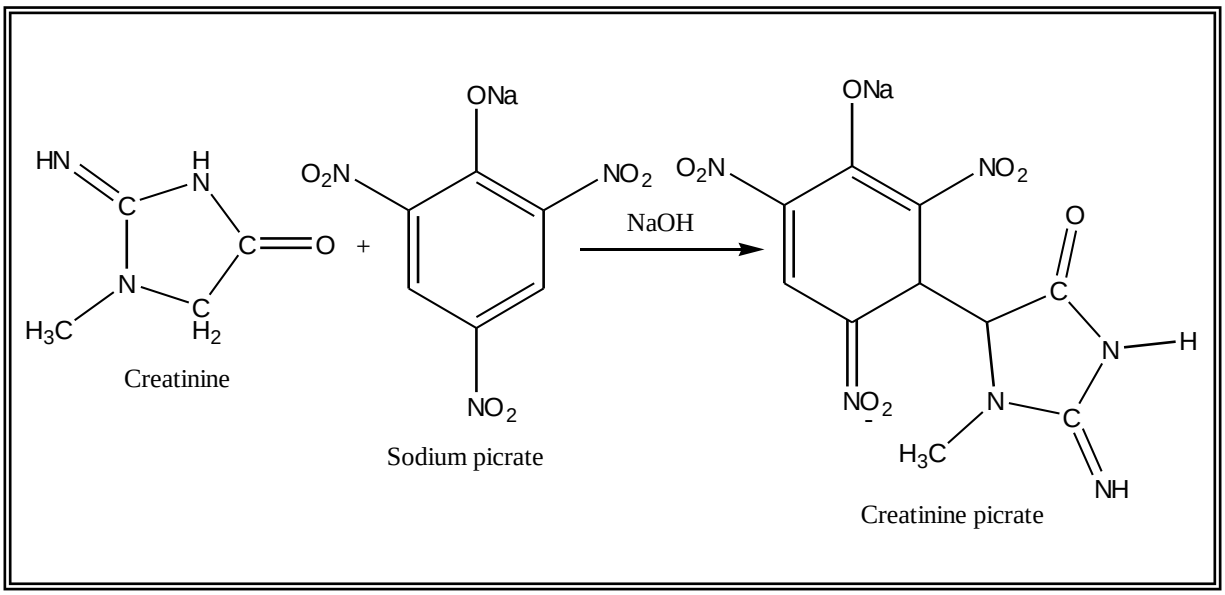
ب- أما أهم الحالات المرضية التي يزداد فيها مستوى الكرياتنين .

1. Acromegaly.
2. Renal failure.
3. Nephritis.
4. Uremia.
5. Congestive heart failure.

تتراوح القيمة الطبيعية للكرياتنين بين (0.7-1.4 mg/dl) وتزداد هذه القيمة عند حصول عجز في الكلية حيث يصل مستواها إلى 5 mg/dl .

الأساس النظري للتجربة :

تفصل البروتينات أولاً بإضافة حامض الخليك ثلاثي الكلوريد (Trichloroacetic acid) ثم يضاف بعد ذلك إلى الراشح بكريتات الصوديوم (Sodium picrate) في وسط قاعدي و الذي يتفاعل مع الكرياتنين مكوناً معقد أحمر اللون تقاس الامتصاصية له عند طول موجي 520 nm ، هذا التفاعل يسمى بتفاعل جافا (Jaffe reaction) .



طريقة العمل :

Reagents	Test	Standard	Blank
Trichloroacetic acid (TCA)	1 ml	-----	-----
Serum	1 ml	-----	-----
Mix. And centrifugation for 10 minutes, then.			
Supernatant	1 ml	-----	-----
Standard	-----	1 ml	-----
Distilled water	1 ml	1 ml	2 ml
Picric acid	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
NaOH	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Mix. Wait for 15 minutes at 25 ^{o}C and then measure the absorbance at 520 nm.			

الحسابات :

$$\text{Serum creatinine} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{standard}}} * \text{Standard concentration}$$

$$\text{Serum creatinine} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{standard}}} * 0.01 * \frac{100}{0.5} \text{mg/dl}$$

تحضير المحاليل :

1. Trichloroacetic acid (20%).
2. Picric acid: Boil 1L H_2O. Cold it, then add 11.75 gm picric acid. Filter the solution and store in brown bottle.
3. Sodium hydroxide (10%).
4. Stock Standard: 1 gm creatinine dissolved in 1L of (0.1N) HCl.
5. Working Standard (0.01 mg/ml): 10 ml stock creatinine solution /1000 ml of (0.1N) HCl.

CHOLESTEROL

الكولسترول : هو مادة دهنية رخوة صفراء يوجد في غالبية الأنسجة في الإنسان والكمية الكبيرة منه موجودة في الدماغ وفي النسيج العصبي كما انه يكون (1–5%) من تركيب المادة الصفراء ، كذلك يعتبر عنصر أساسي في تركيب بعض الهرمونات وخاصة الهرمونات الكظرية و الجنسية . أما وجوده في الدم فيكون على شكلين حيث يكون مع بقية الشحوم ما مجموعه (1–2%) من مكونات الدم .

- الكولسترول الحر ويعادل ثلث مجموع الكولسترول الموجود أصلاً في الدم .
- الأسترات الكولسترولية وتعادل ثلثي مجموع الكولسترول الموجود في الدم .

ينتمي الكولسترول إلى صنف الشحوم المشتقة ويتكون من وحدة الستيرويد التي تتألف من نواة الستيرويد المتميزة بشكل حلقة A وB وC وD .

يوجد الكولسترول في عدد كبير من المواد الغذائية التي تأتي في مقدمة العوامل و الأسباب التي توافق زيادة الكولسترول في الدم وخاصة المحتوية على قدر كبير من الدهون الغنية بالأحماض الدهنية المشبعة كالدهون الحيوانية و اللحوم و الحليب ومشتقاته كذلك يمكن أن يزداد الكولسترول بسبب تناول السكر و المشروبات الكحولية بكثرة . يكون الكولسترول على أقل ما يمكن عند النباتيين وعند الأشخاص الذين يصومون لفترات زمنية طويلة . يتناقص الكولسترول في الدم عند الحركة و النشاط الجسماني ولكن يبقى العامل المهم في خفض الكولسترول في الدم إلى استهلاك الزيوت ذات الأحماض الدهنية غير المشبعة .

لا يعتمد جسم الإنسان على المواد الغذائية للحصول على حاجته من الكولسترول بل أنه يصنعه داخلياً من مواد عضوية بسيطة تحتوي على وحدة الأستيل مثل الحوامض الأمينية و الحوامض الدهنية و الكربوهدرات وفي أماكن عديدة من جسم الإنسان ، غير أن الكبد يعتبر العضو الأساس في إنتاج الكولسترول حيث يبلغ مجموع ما يصنعه في اليوم الواحد غرام واحد تقريباً ، هذا وتقدر كمية الكولسترول المتناولة عن طريق الغذاء بحوالي (0.8) غرام في اليوم الواحد في الحالات الطبيعية التي تخص الغذاء المناسب و عمليتا الهضم و الامتصاص السليمتين .

يحدث امتصاص للكولسترول في القناة الهضمية و ينتقل عن طريق الدورة الدموية إلى الكبد ويتحول قسم منه إلى أملاح المرارة وذلك بتحوله إلى أحماض المرارة والتي لها أهمية كبيرة في عملية استحلاب و هضم الشحوم في الأمعاء الدقيقة و يلاحظ أن (90%) من أملاح المرارة في الأمعاء يعاد امتصاصها مرة ثانية و تنتقل إلى الكبد مرة أخرى في دورة تعرف بالدورة الكبدية الداخلية ، أما الكولسترول الفائض عن حاجة الجسم فيطرح إلى الخارج مع الفضلات عن طريق الغائط بعملية تعرف بالتخلص الجزئي للكولسترول .

الأهمية السريرية للكولسترول :

يعتبر الكولسترول المنشأ الأصلي في تكوين أحماض المرارة (والتي تلعب دوراً أساسياً في هضم الشحوم) و الهورمونات الستيرويدية . ولا يوجد للكولسترول خصوصية معينة في تشخيص مرض واحد بالذات فهو يتأثر بالكثير من الحالات المرضية كما أن مدى تحمله يختلف نسبة إلى الأشخاص و الحالات المرضية ، ولعل أهميته السريرية موجهة نحو مرض تصلب الشرايين فهو يرتفع عن مستواه الطبيعي أسوة بأمراض القلب عموماً .

أ- أهم الحالات المرضية التي يزداد فيها مستوى الكولسترول .

1. Atherosclerosis.
2. Heart diseases.
3. Diabetes mellitus.
4. Nephrotic syndrome.
5. Obstructive jaundice.

ب- أما أهم الحالات المرضية التي يقل فيها مستوى الكولسترول .

1. Severe hepatitis.
2. Hyperthyroidism.

الأساس النظري للتجربة :

يتم تقدير كمية الكولسترول بعد أن تجرى التفاعلات التالية و التي تؤدي إلى تكوين المعقد الملون quinoneimine والذي تقاس الامتصاصية له على طول موجي 500 nm باستخدام جهاز المطيافية .

$$\text{Cholesterol ester} \xrightarrow{\text{Cholesterol esterase}} \text{Cholesterol} + \text{Fatty acids}$$

$$\text{Cholesterol} \xrightarrow{\text{Cholesterol oxidase}} \text{Chlest-4-en-3-one} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{Phenol} + \text{4-Amino antipyrene} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} 4H_2O + \text{Quinoneimine}$$

طريقة العمل :

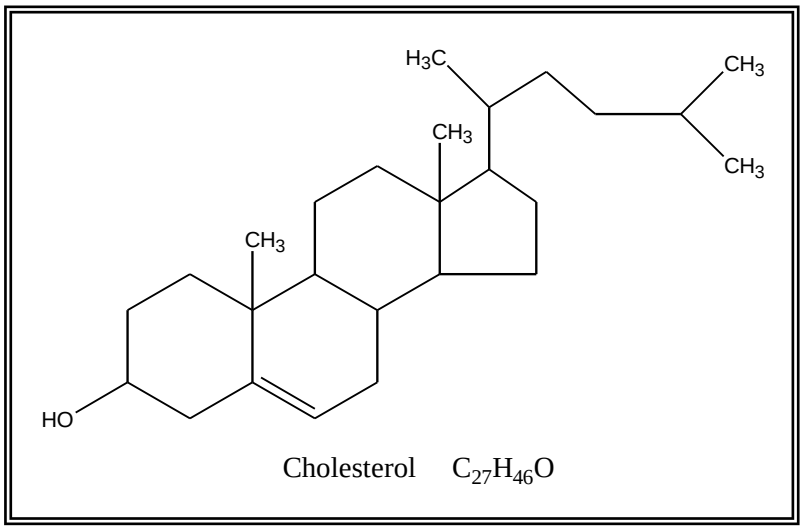
Reagents	Blank	Standard	Test
Standard	------	30 µl	------
Serum	------	------	30 µl
Distilled water	30 µl	------	------
Working solution	3 ml	3 ml	3 ml
Mix. Measure at 500 nm after incubation at 20-25 ^{o}C for 10 minutes.			

الحسابات :

$$\text{Cholesterol} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{standard}}} * \text{Standard concentration}$$

200 mg/dl

تتراوح القيمة الطبيعية للكولسترول بين 140-280 mg/dl



Cholesterol $C_{27}H_{46}O$

تحضير المحاليل :

Working solution: Dissolve [(0.5 mmol/l) 4-Amino antipyrene + Peroxidase + Cholesterol esterase + Cholesterol oxidase] in 100 ml of [(0.1 mmol/l) phosphate buffer + (15 mmol/l) Phenol].

Bilirubin

البيليروبين : هو الصبغة الأساسية بين أصباغ المادة الصفراء المخزونة في كيس الصفراء Gall-Bladder ، يوجد البيليروبين بكميات قليلة جدا في مصل الدم وهو الذي يعطي للمصل لونه المميز الأصفر.

يتكون البيليروبين بصورة رئيسية من تحطم كريات الدم الحمراء حيث أن خلايا الجهاز الطلائي الداخلي الشبكي Reticule-endothelial system وخاصة الموجودة في الكبد و الطحال ونخاع العظم تقوم بالتهام الكريات الحمراء وتحول الهيموغلوبين المتحرر إلى البيليروبين حسب الخطوات التالية :

يتفكك الهيموغلوبين إلى الهيم Heme و الغلوبين Globin بعدها ينفصل الحديد من الهيم مكونا جزيئة ذات لون أخضر تسمى Biliverdin والتي تتحول بواسطة أنزيمات الكبد إلى جزيئة برتقالية اللون تسمى Bilirubin ،ينتقل البيليروبين بعد ذلك من خلايا الجهاز الطلائي الداخلي الشبكي إلى الدم ويتحد مع الألبومين برابطة ضعيفة ويسير خلال الدورة الدموية حيث يعرف بالبيليروبين غير المقترن Unconjucated-Bilirubin ثم يصل بمساره إلى الكبد ويقترن بحامض الكلوكورونيك Glucuronic acid مكونا Bilirubin-Diglucuronid الذي يعرف بالبيليروبين المقترن Conjugated-Bilirubin والذي يفرغ ويخزن في كيس الصفراء.إن أي انسداد في قناة الصفراء يسبب توقف إفراغ هذه الصبغة في كيس الصفراء مما يؤدي إلى رجوعها إلى الدم وزيادة نسبتها بصورة غير طبيعية مكونة ما يعرف باليرقان الأنسدادي .البيليروبين المقترن المخزون في كيس الصفراء ينتقل ضمن إفراز المادة الصفراء إلى الأمعاء الدقيقة ليساهم في عملية هضم الشحوم متحولا إلى Uroblinogen الذي يعاد امتصاص قسم منه إلى الكبد ثم إلى الكلية حيث يطرح إلى الخارج مع الإدرار.أما القسم الآخر فينتقل إلى الأمعاء الغليظة متحولا إلى Urobilin ويطرح عن طريق الغائط.

حسب ما موضح في أعلاه يقسم البيليروبين في الدم إلى نوعين .

1. البيليروبين المقترن أو ما يسمى البيليروبين ذو التفاعل المباشر Direct Bilirubin والذي يتميز بكونه سهل الذوبان بالماء .
2. البيليروبين غير المقترن أو ما يسمى البيليروبين ذو التفاعل غير المباشر Indirect Bilirubin والذي لا يذوب في الماء وانما يذوب في مذيب عضوي مثل الميثانول.

الأهمية السريرية:

عند حصول اضطرابات في عملية ايض البيليروبين فأنها تؤدي إلى الإصابة بمرض اليرقان Jaundice الذي يتميز بظهور صبغة صفراء–بنية على الجلد وطبقة العين البيضاء Sclera و الأغشية

المخاطية Mucous membranes ،لهذا فان الأهمية السريرية لتعيين نسبة البيليروبين في الدم تتركز في تشخيص الإصابة بمرض اليرقان بصورة رئيسية. ويمكن تقسيم اليرقان إلى ثلاث أنواع :

1. **اليرقان الدموي الانحلالي Hemolytic jaundice** : وينتج من تحلل كريات الدم الحمراء في حالة الإصابة بفقر الدم الانحلالي Hemolytic anemia أو قد يكون ناجم عن خلل ولادي فسلجي Neonatal jaundice .
2. **اليرقان الكبدي Hepatic jaundice** : في هذا النوع من اليرقان يؤدي فشل الكبد في قدرته على اقتران البيليروبين بحامض الكلوكورونيك إلى زيادة نسبته (أي البيليروبين) في الدم ،كذلك فان كل من Viral hepatitis و Liver cirrhosis يؤديان إلى ارتفاع مستواه في الدم.
3. **اليرقان الانسدادي Obstructive jaundice** : وينتج عن انسداد مجرى الصفراء (سواء الأنابيب الصفراوية أو عنق حويصلة الصفراء) مما يؤدي إلى رجوع كميات كبيرة من البيليروبين إلى الدم وزيادة مستواه عن الحد الطبيعي.

الأساس النظري للتجربة:

تعتمد طريقة القياس على تحويل البيليروبين إلى مركب احمر–بنفسجي يدعى Azobilirubin وذلك بتفاعله مع Diazotized sulfanilic acid (الناتج من تفاعل Sulfanilic acid مع Sodium nitrite) حيث تتناسب شدة اللون مع كمية البيليروبين الموجودة في النموذج . بوجود Dimethyl sulfoxide يتفاعل البيليروبين الكلي مع Diazotized sulfanilic acid لتكوين Azobilirubin بينما بغياب Dimethyl sulfoxide فانه البيليروبين المقترن (Direct bilirubin) فقط يتفاعل مع Diazotized sulfanilic acid لتكوين Azobilirubin .

طريقة العمل:

لقياس تركيز البيليروبين الكلي نتبع ما يلي .

Reagents	Standard blank	Standard	Test blank	Test
Standard	50 µl	50 µl	------	------
Sample	------	------	50 µl	50 µl
Reagent 1	1 ml	------	1 ml	------
Working solution 1	------	1 ml	------	1 ml
Mix well and incubate exactly 5 minutes at 37 °C. Read the absorbance of standard and test against their blank at 555 nm.				

$$\text{Total Bilirubin} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{standard}}} * \text{Standard concentration } 4.5 \text{ mg/dl}$$

أما لقياس تركيز البيليروبين المقترن (Direct bilirubin) فقط فنتبع ما يلي .

Reagents	Standard blank	Standard	Test blank	Test
Standard	50 µl	50 µl	------	------
Sample	------	------	50 µl	50 µl
Reagent 2	1 ml	------	1 ml	
Working solution 2	------	1 ml	------	1 ml
Mix well and incubate exactly 5 minutes at 37 °C. Read the absorbance of standard and test against their blank at 555 nm.				

$$\text{Direct Bilirubin} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{standard}}} * \text{Standard concentration}$$
3 mg/dl

القيم الطبيعية :

Total Bilirubin: 0.2-1 mg/dl.

Direct Bilirubin: 0.0-0.2 mg/dl.

Indirect Bilirubin: 0.2-0.8 mg/dl.

تحضير المحاليل :

1) Reagent 1: (30 mmol/l) Sulfanilic acid + (150 mmol/l) Hydrochloric acid + (7 mol/l) Dimethylsulfoxide.
2) Reagent 2: (30 mmol/l) Sulfanilic acid + (150 mmol/l) Hydrochloric acid.
3) Working solution 1: Mix 20 volumes [(30 mmol/l) Sulfanilic acid + (150 mmol/l) Hydrochloric acid + (7 mol/l) Dimethylsulfoxide] with 1 volume (20 mmol/l) Sodium nitrite.
4) Working solution 2: Mix 20 volumes [(30 mmol/l) Sulfanilic acid + (150 mmol/l) Hydrochloric acid] with 1 volume (20 mmol/l) Sodium nitrite.

الأنزيمات الناقلة Transaminase

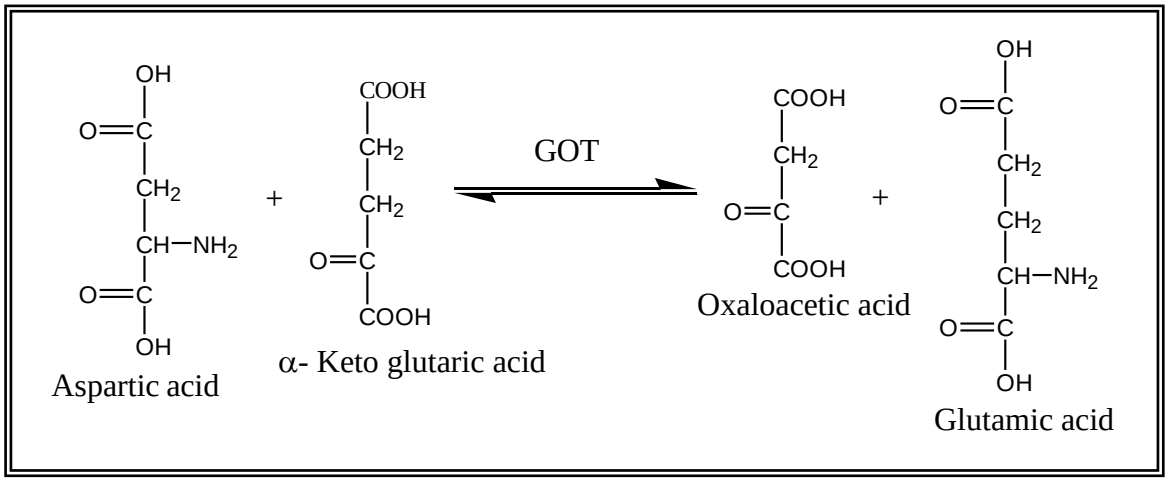
هي الأنزيمات التي تقوم بعملية نقل مجموعة الأمين من الحامض الأميني إلى الحامض الكيتوني و التي تعتبر خطوة مهمة في أيض الأحماض الأمينية وهذه الأنزيمات تشمل .

(1) GOT: Glutamate oxaloacetate transaminase

ينتمي هذا الأنزيم إلى صنف الأنزيمات المسماة Transaminase أو Transferase ورقم التصنيف له (EC: 2.6.1.1) كما ويسمى حديثا Aspartate amino transferase (AST) .

خواص الأنزيم :

1. التفاعل الأساس الذي يقوم به الأنزيم هو .



2. المادة الأساس التي يعمل عليها الأنزيم هي Aspartic acid + α- keto glutaric acid .
3. يوجد الأنزيم بصورة طبيعية في عدد من الأنسجة الجسمية و يعتبر القلب من أهم مصادر هذا الأنزيم ثم يأتي بعده الكبد و عضلات الهيكل العظمي و الكلية وان أي تحطم يحدث في هذه الأنسجة يؤدي إلى ارتفاع مستوى الأنزيم عن قيمته الطبيعية .
4. تتراوح القيمة الطبيعية للأنزيم بين 2-22 IU/L .
5. IU: هي الوحدة العالمية لقياس نشاط الأنزيم والتي تعرف على أنها فعالية الأنزيم التي تنتج واحد مايكرومول من Pyrovic acid أو Oxaloacetic acid خلال دقيقة واحدة وتحت الظروف القياسية من درجة حرارة و pH وبفعل واحد لتر من مصل الدم.

6. تؤثر معظم مانعات التخثر سلبيا على فعالية الأنزيم لذا يفضل استخدام مصل الدم بدلا من البلازما في قياس مستوى أنزيم GOT .
7. الظروف المثلى للتفاعل الأنزيمي هي درجة حرارة 37 درجة مئوية و pH=7.4 .
8. تزداد كمية أنزيم GOT في حالة الإصابة بمرض احتشاء العضلة القلبية Myocardial infarction ويصل مستوى الأنزيم إلى حوالي (2–10) مرات اكثر من مستواه الطبيعي خلال 24–36 ساعة من الإصابة ثم يعود بعد ذلك إلى مستواه الطبيعي بعد خمسة أيام من بداية هجوم المرض بشرط عدم حصول مضاعفات أخرى . إن الفعالية العالية للأنزيم تتناسب طرديا مع درجة التلف الذي يصيب العضلة القلبية .
9. يعتبر الأنزيم حساس لدرجة الحرارة حيث يبقى ثابتا لمدة ثلاثة أيام في درجة حرارة الغرفة و أسبوع واحد في درجة حرارة (5^oC) وشهر واحد في درجة حرارة ($-20\ ^oC$) .

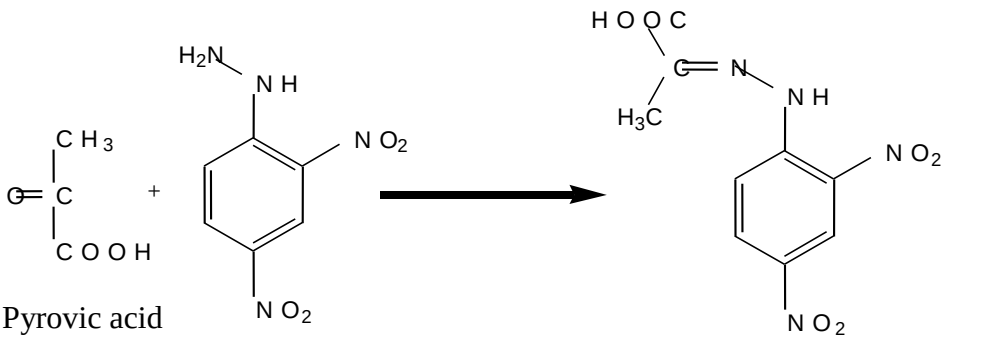
الأهمية السريرية :

تأتى أهمية تقدير GOT بالدرجة الأساس في التشخيص السريري لامراض القلب و الكبد حيث يعتبر ذو خصوصية كبيرة في مثل هذه الحالات وان أهم الحالات المرضية التي يزداد بها مستوى الأنزيم هي .

1. Myocardial infarction (M.I).
2. Liver diseases: a) Viral hepatitis.
   b) Liver cancer.
   c) Liver cirrhosis.
   d) Obstructive jaundice.
   e) Biliary obstruction.
3. Muscular dystrophy.

الأساس النظري للتجربة :

تستند الطريقة على أساس قدرة الأنزيم على تحويل Aspartic acid إلى Oxaloacetic acid و الذي يتحول تلقائيا إلى Pyrovic acid بعد فقدان جريئة ثاني أوكسيد الكربون ثم تفاعل الأخير مع مركب (داي نيترو فنيل هدرازين DNPH) لتكوين معقد ذو لون بني– محمر تقاس الامتصاصية له عند طول موجي 546 nm .



طريقة العمل:

Reagents	Blank	Test
Serum	-------	0.1 ml
GOT buffer	0.5 ml	0.5 ml
Distilled water	0.1 ml	--------
Mix; incubate for exactly 30 minute at 37 ºC.		
2,4-DNPH	0.5 ml	0.5 ml
Mix; allow standing for exactly 20 minute at 20-25 ºC.		
NaOH	5 ml	5 ml
Mix, read the absorbance of sample against the reagent blank after 5 minutes at 546 nm.		

الحسابات :

يمكن الحصول على فعالية الأنزيم من خلال الجدول التالي .

Absorbance	IU/L	Absorbance	IU/L
0.02	7	0.10	36
0.03	10	0.11	41
0.04	13	0.12	47
0.05	16	0.13	52
0.06	19	0.14	59
0.07	23	0.15	67
0.08	27	0.16	76
0.09	31	0.17	89

تحضير المحاليل :

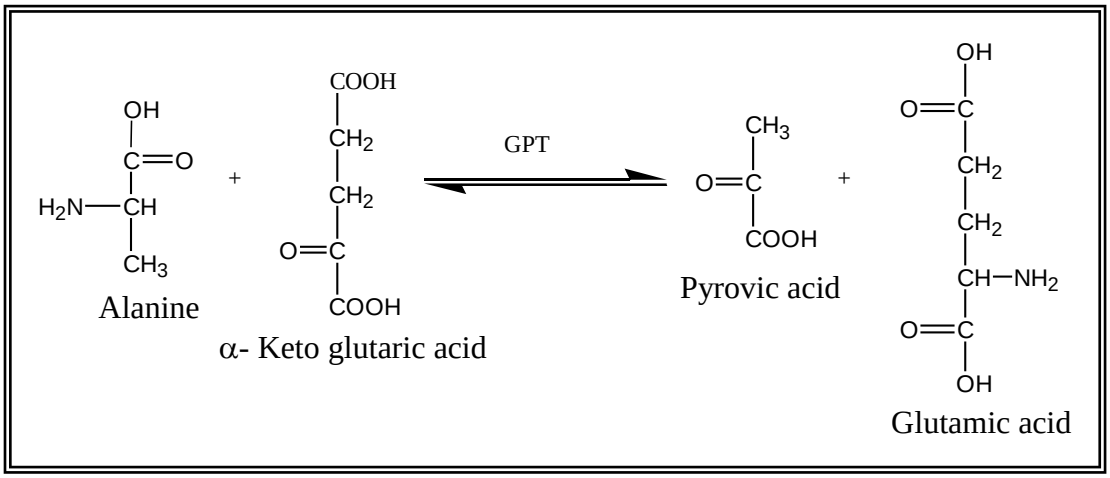
1) GOT buffer: [(100 mmol/l) Aspartic acid + (2 mmol/l) α- keto glutaric acid] in (100 mmol/l) phosphate buffer pH 7.4.
2) 2,4-dinitrophenylhydrazine (2 mmol/l).
3) Sodium hydroxide (0.4 N).

(2) GPT: Glutamate pyrovate transaminase

ينتمي هذا الأنزيم أيضا إلى صنف الأنزيمات المسماة Transaminase أو Transferase ورقم التصنيف له (EC: 2.6.1.2) كما ويسمى حديثا Alanine amino transferase (ALT) .

من أهم خواص الأنزيم :

1. التفاعل الأساس الذي يقوم به الأنزيم هو .



2. المادة الأساس التي يعمل عليها الأنزيم هي Alanine + α- keto glutaric acid .
3. الفعالية المثلى للأنزيم تتحقق بدرجة حرارة 37ºC و pH=7.4 .
4. تأثير مضادات التخثر على GPT هو نفس تأثيرها على GOT ولهذا فان مصل الدم يفضل على البلازما في تقدير فعالية الأنزيم .
5. يمكن حفظ عينات مصل الدم المستخدمة لقياس نشاط الأنزيم بنفس الظروف التي تحفظ بها عينات أنزيم GOT .
6. تتراوح القيمة الطبيعية للأنزيم بين 2-15 IU/L .
7. يوجد الأنزيم بتراكيز عالية في الكبد وكذلك يوجد في القلب و الكلية .

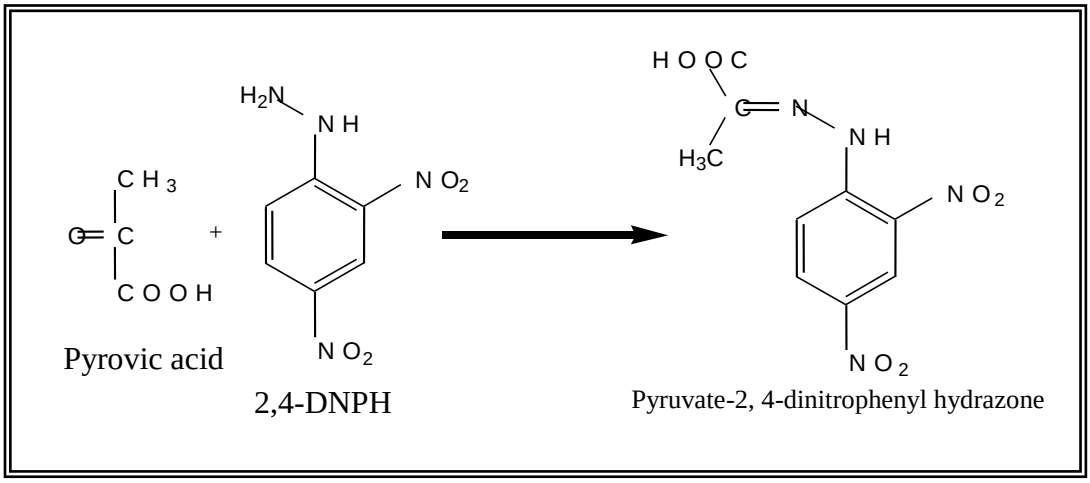
الأهمية السريرية :

تتركز الأهمية السريرية لتقدير GPT من خلال علاقته المباشرة بأمراض الكبد حيث انه الأنزيم الأكثر خصوصية للكبد وان مستوياته العالية نادرا ما تلاحظ إلا في حالة الأمراض الكبدية ومن أهم الحالات التي يزداد بها مستوى الأنزيم .

1) Infection hepatitis.
2) Acute and viral hepatitis.
3) Liver cirrhosis and Biliary cirrhosis.
4) Liver cancer.
5) Circulatory failure.

الأساس النظري للتجربة :

إن أساس الطريقة يعتمد على قياس فعالية الأنزيم بالطرق اللونية بواسطة قياس حامض البايروفيك المتكون من الألنين . حيث تتم مفاعلة حامض البايروفيك مع المركب (داي نيترو فنيل هدرازين DNPH) لتكوين معقد ذي لون احمر يقاس عند طول موجي 546 nm .



طريقة العمل :

Reagents	Blank	Test
Serum	-------	0.1 ml
GPT buffer	0.5 ml	0.5 ml
Distilled water	0.1 ml	--------
Mix; incubate for exactly 30 minute at 37 ºC.		
2,4-DNPH	0.5 ml	0.5 ml
Mix; allow standing for exactly 20 minute at 20-25 ºC.		
NaOH	5 ml	5 ml
Mix, read the absorbance of sample against the reagent blank after 5 minutes at 546 nm.		

الحسابات :

يمكن الحصول على فعالية الأنزيم من خلال الجدول التالي .

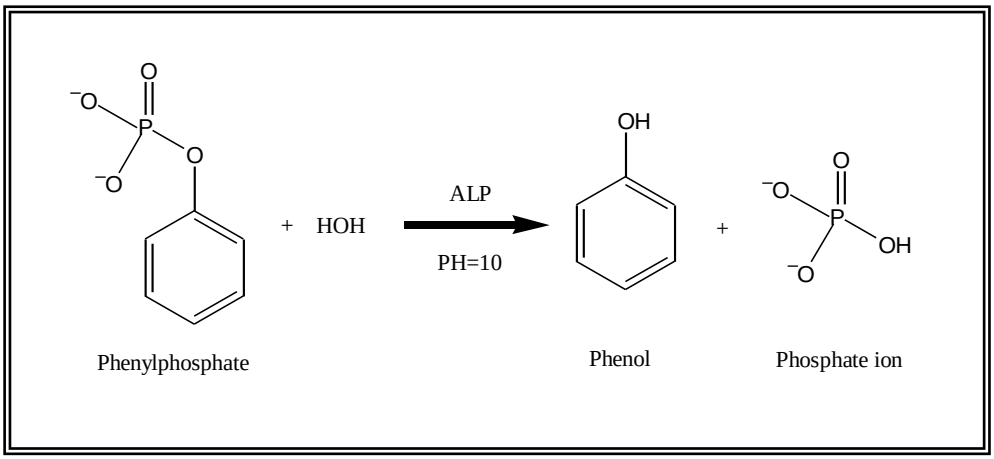
Absorbance	IU/l	Absorbance	IU/L
0.025	4	0.275	48
0.050	8	0.300	52
0.075	12	0.325	57
0.100	17	0.350	62
0.125	21	0.375	67
0.150	25	0.400	72
0.175	29	0.425	77
0.200	34	0.450	83
0.225	39	0.475	88
0.250	43	0.500	94

تحضير المحاليل :

1) GPT buffer: [(200 mmol/l) Alanine + (2 mmol/l) α- keto glutaric acid] in (100 mmol/l) phosphate buffer pH 7.4.
2) 2,4-dinitrophenylhydrazine (2 mmol/l).
3) Sodium hydroxide (0.4 N).

ALKALINE PHOSPHATASE

الفوسفاتيز القاعديALP (EC:3.1.3.1) هو الاسم العام لمجموعة من الأنزيمات التي تنتمي إلى صنف الأنزيمات المحللة (hydrolase enzymes) ، تساعد هذه الأنزيمات على كسر أصرة فوسفات الأستر أو الأسيل والذي يرافقه كسر آخر في أصرة الهيدروكسيل لجزيئة الماء مؤدية إلى تكوين مركب الفينول المشابه للكحول .



أهم خواص الأنزيم :

1. يوجد الأنزيم في عدة أنسجة من الجسم حيث يوجد بتراكيز عالية في الكبد و العظام و الأمعاء و الكلية و المشيمة .
2. الأنزيم الموجود في مصل الدم للأشخاص البالغين منشؤه يكون من الكبد وقناة الصفراء بصورة رئيسية إضافة إلى الكميات القليلة الناشئة من العظام والتي تأخذ طريقها إلى الدم .
3. وظيفة الأنزيم داخل الجسم غير مفهومة لحد الآن ولكن بعض الدراسات بينت أن له وظيفة ايضية يمكن إيجازها بالنقطتين التاليتين .

أ. يسهل من عملية نقل المواد المتايضة عبر أغشية الخلايا وبصورة خاصة المواد الشحمية Lipids .

ب. يسهل من عملية تصلب العظام وبصورة خاصة عملية تكلس العظام .

4. الظروف المثلى التي يعمل بها الأنزيم بأعلى فعالية هي T= 37 ^{o}C و pH = 9-10.5 .
5. القيمة الطبيعية للأنزيم هي

للأشخاص البالغين 3-13 King-Armstrong /dl

للأطفال 6-25 K.A /dl

6. تعرف وحدة King-Armstrong على أنها كمية الأنزيم اللازمة لتحرير واحد ملغم من الفينول بزمن مقداره 15 دقيقة وتحت الظروف القياسية من درجة حرارة و pH .
7. تزداد نسبة ALP في حالات الحمل الطبيعية عند المرأة وتقدر بحوالي 2-3 مرات اكثر من المستوي الطبيعي وتعزى هذه الزيادة إلى حصول عملية إفراز للأنزيم من قبل المشيمة Placental origin .
8. يقدر مستوى ALP عند الأطفال بحوالي 3 مرات اكثر من المستوى الطبيعي الموجود في الأشخاص البالغين و تعزى هذه الزيادة إلى عملية النمو الحاصلة في خلايا النسيج العظمي .
9. تنشط فعالية الأنزيم بوجود بعض الأيونات الفلزية ثنائية التكافؤ مثل Mg^{++} و Mn^{++} و Co^{++}.
10. تعتبر الأيونات اللافلزية السالبة مثل أيونات الفوسفات و البورات و الاوكزالات و السيانيد من المثبطات لفعالية الأنزيم .
11. يفقد الأنزيم فعاليته بسرعة عند درجة حرارة (56 ^oC) لكنه يعتبر ثابت نسبيا في درجات الحرارة الاعتيادية .

الأهمية السريرية :

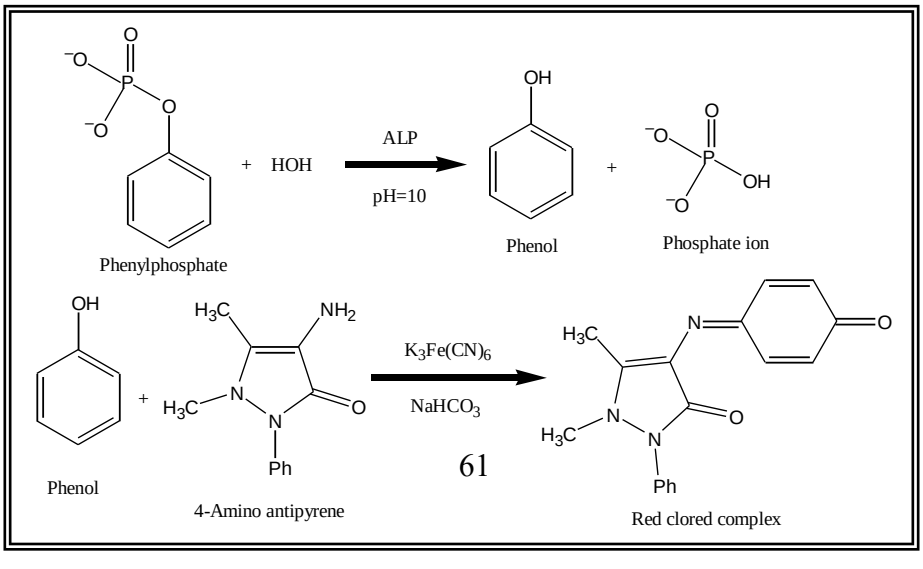
تتركز أهمية تقدير الفوسفاتيز القاعدي في تشخيص نوعين من الحالات المرضية بصورة خاصة و التي يزداد فيها مستوى الأنزيم عن قيمته الطبيعية .

A: Bone diseases.
1. Pagets disease.
2. Rickets.
3. Bone cancer (carcinoma).
4. Osteomalasia.

B: Hepatobiliary diseases.
1. Obstructive jaundice.
2. Biliary obstruction.

المبدأ الأساس للطريقة :

تعتمد الطريقة على قياس كمية الفينول الناتج من تحلل المادة الأساس Phenylphosphate بفعل أنزيم ALP والذي يتناسب طرديا مع فعالية الأنزيم . حيث يتفاعل الفينول الناتج مع مركب 4-Amino antipyrene لتكوين معقد احمر تقاس الامتصاصية له على طول موجي 510 nm .



طريقة العمل :

Reagents	Serum sample	Serum blank	Standard	Blank
Substrate buffer	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Incubate for 5 minutes at 37 ºC.				
Serum	50 µl	--------	--------	--------
Standard	--------	--------	50 µl	--------
Incubate for exactly 15 minutes at 37 ºC.				
Inhibitor	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Mix well or Preferably vortex.				
Potassium ferricyanide	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Serum	--------	50 µl	--------	--------
Distilled water	--------	--------	--------	50 µl
Mix. Let stand for 10 minutes in the dark after that measure at 510 nm.				

الحسابات :

$$\text{ALP activity} = \frac{A_{\text{serum sample}} - A_{\text{serum blank}}}{A_{\text{standard}}} * N$$

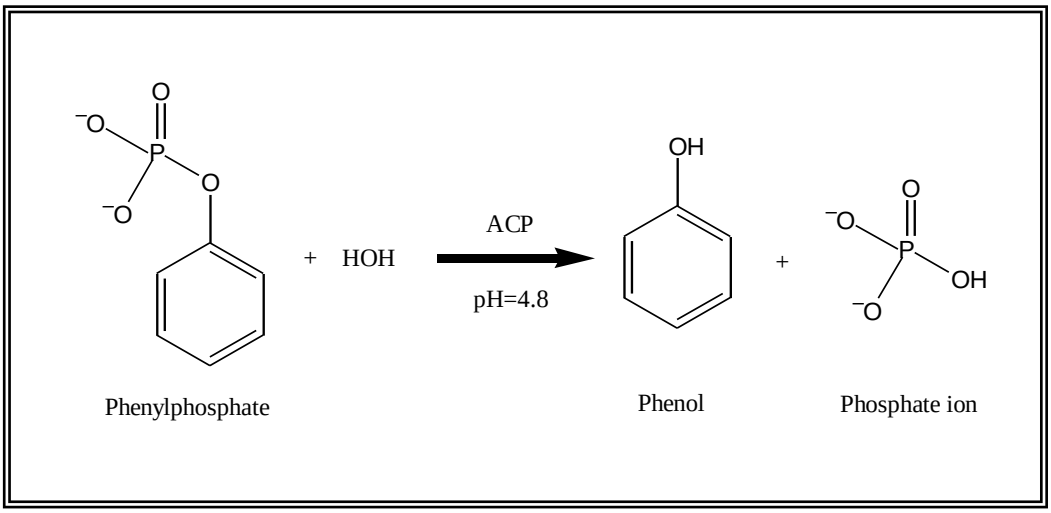
N: Concentration of standard = 20 K.A./dl.

تحضير المحاليل :

1) Substrate buffer: (5 mmol/l) Disodium phenylphsphate in (50 mmol/l) Carbonate-bicarbonate buffer pH 10.
2) Standard: Phenol (equal to 20 king-Armstrong unit).
3) Inhibitor: (60 mmol/l) 4-Amino antipyrene + (7.5%) sodium arsenate.
4) Potassium ferricyanide (150 mmol/l).

ACID PHOSPHATASE

الفوسفاتيز الحامضي ACP (EC:3.1.3.2) ويشمل هذا الأنزيم مجموعة من الأنزيمات المتشابهة Isoenzymes التي تنتمي إلى صنف الأنزيمات المحللة (hydrolase enzymes) ، تساعد هذه الأنزيمات على كسر أصرة فوسفات الأستر أو الأسيل مؤدية إلى تكوين الفينول والتفاعل العام هو.



أهم خواص الأنزيم :

1. يوجد الأنزيم بشكل رئيسي في غدة البروستات و الكبد و الطحال وكريات الدم الحمراء و الأقراص الدموية و نخاع العظم . إن غدة البروستات تعتبر المصدر الرئيسي للأنزيم حيث تساهم بحوالي الثلث إلى النصف من مستوى الأنزيم الطبيعي.
2. الظروف المثلى التي يعمل بها الأنزيم هي درجة حرارة 37^oC و pH=4.8 .
3. يعتبر الأنزيم غير مستقر في درجات الحرارة الاعتيادية حيث يفقد 50% من فعاليته إذا ترك ساعة واحدة في درجة حرارة الغرفة .
4. ينشط الأنزيم بنفس منشطات الفوسفاتيز القاعدي مثل Mg^{++} و Co^{++} و Mn^{++} كما أن الأيونات السالبة مثل الاوكزالات و السيانيد و البورات و الفوسفات لها القدرة على تثبيط فعالية الأنزيم .
5. يمكن التمييز بين الأنزيم ذو المصدر البروستاتي و الأنزيم من المصادر الأخرى من خلال إضافة المركب (D-Tartrate) والذي له القدرة على تثبيط فعالية الأنزيم البروستاتي ولا يؤثر على الأنزيم من المصادر الأخرى .
6. تتراوح القيمة الطبيعية للأنزيم بين 1-3.5 K.A/dl or 2.5-11.7 U/l

الأهمية السريرية :

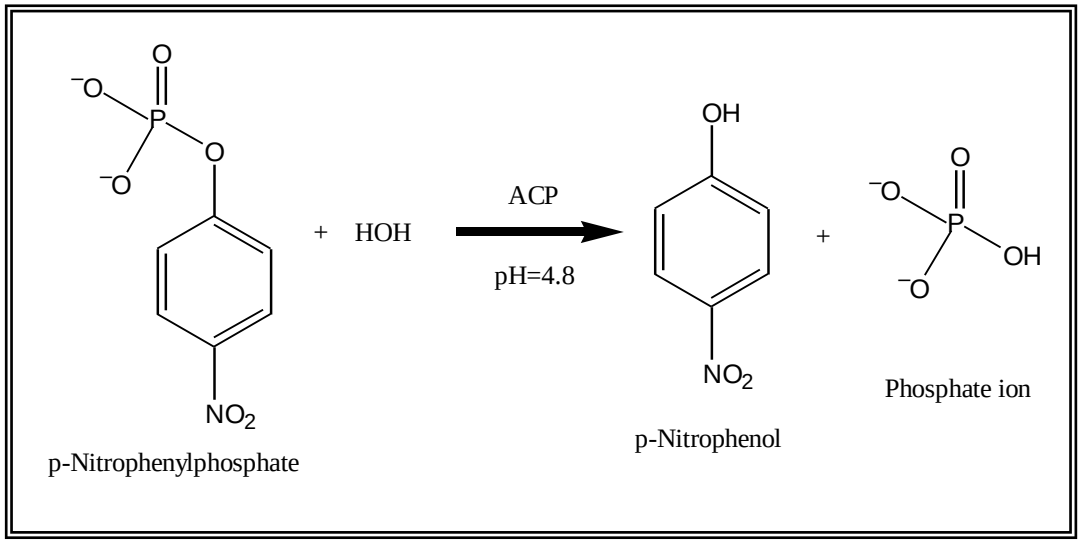
يحدث ارتفاع كبير في مستوى الأنزيم للأشخاص المصابين بسرطان البروستات ويصل نشاط الأنزيم (40–50) مرة اكثر من القيمة الطبيعية ، لهذا يعتبر قياس نشاط الأنزيم مهم جدا في تشخيص التهاب البروستات . في حالة السرطان الموضعي لغدة البروستات (benign) فان أنزيم ACP يبقى محافظا على مستواه الطبيعي أو تحصل زيادة قليلة في مستواه .

أما الحالات الأخرى التي يزداد فيها مستوى الأنزيم فهي .

1. Breast cancer.
2. Pagets disease.
3. Hyper parathyroidism.
4. Bone cancer.
5. Acute retention of urine.

مبدأ الطريقة الأساس :

تقوم الطريقة على أساس قدرة الأنزيم على تحلل المادة الأساس p-Nitrophenylphosphate إلى p-Nitrophenol والذي يكون اصفر اللون في الوسط القاعدي حيث تقاس الامتصاصية له عند طول موجي 405 nm .



طريقة العمل :

Reagents	blank	Test 1	Test 2
Substrate buffer	1 ml	1 ml	1 ml
Sodium tartrate	------	------	0.1 ml
Incubate for exactly 5 minutes at 37 ºC.			
Serum	------	0.2 ml	0.2 ml
Incubate for exactly 30 minutes at 37 ºC.			
NaOH	10 ml	10 ml	10 ml
Serum	0.2 ml	------	------
Mix, read the absorbance of the sample against the blank at 405 nm.			

الحسابات :

Total Acid Phosphatase = 101 * $A_{test\ 1}$ U/l

Prostatic Acid Phosphatase = 101 * ($A_{test\ 1} - A_{test\ 2}$) U/l

تحضير المحاليل :

1) Substrate buffer: Mix 10 ml of (5.5 mmol/l) p- Nitrophenylphosphate with 10 ml of (55 mmol/l) Citrate buffer pH 4.8.
2) Sodium tartrate (200 mmol/l).
3) Sodium hydroxide (0.2N).