الفصل الخامس

الإنزيمـــات

نظراً لتعدد طرق التعبير عن النشاط الإنزيمي بوحدات مختلفة ، فقد أوصى بالتعبير عن النشاط الإنزيمي بالوحدات الدولية / مل ، وعرفت الوحدة الدولية للنشاط الإنزيمي بأنها النشاط الذي يحول ميكرومول من المادة في دقيقة تحت ظروف معينة . وقد يعبر عنها كذلك بجزء من ألف من الوحدة الدولية (Milli - international units (m - i. u وهي تكافئ مللي – ميكرومول محول في دقيقة ، ويعبر عنها كذلك بمللي وحدة دولية / مل (جم) ، أو وحدة دولية / لتر .

١ – إنزيم اليورياز Urease activity :

يقدر في منتجات الصويا للكشف عما إذا كانت مطبوخة بقدر كاف أم لا .

١ – زن حوالي ١٠ جم عينة ، وتطحن لتمر خلال منخل ثقوبه ٠,٢ م ، ثم زن منها حوالي ٠,٢جم بالضبط في أنبوبة اختبار مع ١٠ مل محلول يوريا (٣٠جم يوريا تذاب في لتر من محلول منظم فوسفات (٤,٤٥ جم فوسفات صوديوم أحادي الهيدروچين + ٣,٤٠ جم فوسفات بوتاسيوم ثنائي الهيدروچين في ماء ، وتخفف إلى لتر)، يحضر طازجاً قبل الاستعمال مباشرة) . سد الأنبوبة في الحال ، ورج بشدة واتركها تستقر ٣٠ دقيقة في حمام مائي (٣٠°م) .

٢ – أضف في الحال بماصة ١٠ مل حمض هيدروكلوريك (٠,١ عياري) وبرد بسرعة إلى ٢٠°م ، ثم انقل محتويات الأنبوبة كميا إلى إناء المعايرة مع غسيل الأنبوبة مرتين بالماء (٥ مل) ، نقط في الحال بهيدروكسيد صوديوم (٠,١ عياري) في وجود جهاز تقدير تركيز أيون الهيدروچين إلى PH ٤,٧ .

٣ – يعمل تجربة مقارنة بها ٠,٢ جم عينة + ١٠ مل حمض هيدروكلوريك (٠,١ عياري) + ١٠ مل محلول يوريا ، وبرد في ماء مثلج لمدة ٣٠ دقيقة ، وأكمل كما في باقي خطوة رقم ٢ .

٤ – احسب نشاط إنزيم اليورياز مجم نيتروچين أمونيومي / جم / دقيقة على ٣٠°م =

$$\frac{\text{١,٤ (حجم القلوي المستخدم للمقارنة مل – حجم القلوي المستخدم للعينة مل)}}{\text{٣٠ × وزن العينة جم}}$$

٢ ـ إنزيم الببسين :

يستخدم الببسين في تقدير البروتين الخام الذائب في الببسين والهيدروكلوريك (المهضوم معمليا) ؛ لذا وجب تقدير نشاط هذا الإنزيم لحساب الكم اللازم منه لعملية تقدير البروتين المهضوم معمليا . ويقدر نشاط البيسين كالتالي :

١ ـ عد محلول الببسين بإذابة ١٥٠ مجم بيسين في ١٠٠ مل حمض هيدروكلوريك (٠,٠٦ عياري) ، وانقل بواسطة ماصة ٢ مل من هذا المحلول إلى دورق ٥٠ مل ، وخفف إلى ٥٠ مل بحمض الهيدروكلوريك (٠,٠٢٥ عياري) . وبواسطة جهاز PH اختبر PH لتكون ١,٦ ± ٠,١ ، عندئذ اغمس الدورق في حمام مائي (٢٥°م) .

٢ ـ يجرى التحليل المائي بنقل ٥ مل محلول هيموجلوبين (يقدر نيتروچين الهيموجلوبين بطريقة كلداهل ، ثم يوزن منه كمية تحتوي ٣٥٤ مجم نيتروچين في دورق سعة ٢٠٠ مل مع نقط من حمض هيدروكلوريك (٠,٠٦ عياري) ووصل بمضخة تفريغ ، وهز الدورق تحت التفريغ حتى يذوب الهيموجلوبين تماماً . افصل التفريغ ، وأثناء الهز خفف إلى العلامة بحمض الهيدروكلوريك (٠,٠٦ عياري) ويحضر المحلول في الحال عند الاستخدام) بواسطة ماصة إلى أنبوبة اختبار، وسخن على ٢٥°م في حمام مائي، ثم أضف ١ مل محلول بيسين (خطوة رقم ١) ، واخلط جيداً ، واحفظ في حمام مائي لمدة ١٠ دقائق على ٢٥°م ، ثم أضف ١٠ مل محلول حمض ثلاثي كلوروخليك (٥٪) سبق تسخينها على ٢٥°م ، واخلط ورشح .

٣ ـ تطوير اللون والتقدير : ينقل بماصة ٥ مل من الراشح (من خطوة رقم ٢) إلى دورق مخروطي ٥٠ مل وأضف ١٠ مل محلول هيدروكسيد صوديوم (٠,٥ عياري) ، وهز الدورق باستمرار ، وأضف ٣ مل محلول مخفف فولين سيوكالتيو Folin - Ciocalteu (أذب ١٠٠ جم تنجستات صوديوم ثنائي الماء + ٢٥ جم مولبيدات صوديوم ثنائي الماء في ٧٠٠ مل ماء تحت مكثف عاكس ، ثم أضف ٥٠ مل حمض فوسفوريك + ١٠٠ مل حمض هيدروكلوريك ، واغل لمدة ١٠ ساعات . برد وأضف ١٧٥ جم كبريتات ليثيوم ثنائي الماء + ٥٠ مل ماء + ١ مل برومين ، واغل لمدة ١٥ دقيقة دون مكثف ، وبرد وانقل إلى دورق سعة لتر ، وخفف إلى العلامة بالماء واخلط ورشح . ينبغي خلو المحلول الناتج من أي لون أخضر . خفف حجما من هذا الدليل بحجمين من الماء قبل الاستخدام)، قس الامتصاص الضوئي على ٧٥٠ نانومتر بعد ٥ – ١٠ دقائق مع استخدام الماء للمقارنة .

٤ ـ يعمل منحنى قياسي من ١ ، ٢ ، ٣ ، ٤ ، ٥ مل من محلول قياسي تيروزين (أذب ١٨١,٢ مجم تيروزين في حمض هيدروكلوريك (٠,٢ عياري) ، وخفف إلى لتر بالحامض ، وانقل بماصة ٢٠ مل من هذا المحلول في دورق ١٠٠ مل ، وأكمل إلى العلامة بحمض الهيدروكلوريك (٠,٢ عياري) ، ١ مل من هذا المحلول تحتوي ٠,٢ ميكرومول تيروزين) وأكمل بعمل دورق خال من التيروزين ، أكمل حجوم الدوارق كلها (المحتوية على حجوم متدرجة أو خالية التيروزين) إلى ٥٠ مل بحمض الهيدروكلوريك (٠,٢ عياري) ، ثم أضف ١٠ مل هيدروكسيد صوديوم (٠,٥ عياري) ، وهز باستمرار مع إضافة ٣ مل دليل فولين. وقس الامتصاص كما سبق وارسم المنحنى القياسي.

٥ ـ من المنحنى القياسي تقدر كمية التيروزين (ميكرومول) المعادلة للعينة ، ومنها تحسب نشاط الببسين بالميكرومول تيروزين / مجم / دقيقة على ٢٥°م من المعادلة :

$$\text{وحدات / مجم} = \frac{\text{٠,٣٢} \times \text{كمية التيروزين بالميكرومول الموجودة في العينة}}{\text{وزن الببسين (مجم) المضاف في عملية التحليل المائي}}$$

يلاحظ أن كمية الببسين المضافة في تحضير محلول الببسين (الخطوة الأولى) يجب أن تضبط لتعطي امتصاصاً ٠,٣٥٠ ± ٠,٠٣٥ بعد ٥ – ١٠ دقائق .

كل ٢ وحدة / مجم / يتحصل عليها من هذه الطريقة تعادل ٠,٠٠٣٦٤ وحدة Anson/ مجم (ميكرومول تيروزين / مجم / دقيقة على ٣٥,٥°م) ، أو ٣٦٤٠٠ وحدة تجارية / جم (ميكرومول تيروزين / جم في ١٠ دقائق على ٣٥,٥°م) .

٣ ـ مثبط التربسين :

يوزن ٤ جم فول صويا منزوع الدهن ومطحوناً ، وتعامل بمقدار ٤٠ مل محلول منظم صوديوم ٠,٠٥ ع PH ٧ + ٤٠ مل ماء مقطراً . وترج ٣ ساعات وتطرد مركزياً ٣٠ دقيقة على ١٥٠°م . يرشح الرائق ، ويخفف إلى ١٠ أضعاف بنفس المحلول المنظم .

يستخدم محلول كازين ٢٪ في محلول منظم فوسفات ٠,١ عياري PH ٧,٦ كمادة للتفاعل ، بينما يستخدم إنزيم التربسين (٥ مجم / مل) كمحلول إنزيمي . يحضن ٠,٥ مل محلول تربسين مع ٢ مل محلول كازين + ١ مل محلول منظم فوسفات + ٠,٤ مل حمض هيدروكلوريك ٠,٠٠١ عياري + ٠,١ مل مستخلص عينة . حضن على ٣٧°م لمدة ٢٠ دقيقة ، ثم أضف ٦ مل حمض ثلاثي كلوروخليك ٥ ٪ لوقف التفاعل .

وحدة التربسين عبارة عن الزيادة بمقدار ٠,٠١ وحدة امتصاص على ٢٨٠ نانومتر في ٢٠ دقيقة لمخلوط تفاعل ١٠ مل ، ونشاط مثبط التربسين يعبر عنه بوحدات التربسين المثبطة .

٤ ـ إنزيمات الترانس أميناز Transaminases :

توجد هذه الإنزيمات في كل الأنسجة ، وأهمها من الناحية المرضية هي جلوتاميك أوكسالو أسيتيك ، جلوتاميك بيروڤيك ترانس أميناز ، فيقوم كل منهما بإنتاج حمض بيروڤيك (من حمض أميني إسبارتك ، وحمض أميني ألانين على الترتيب) الذي ينتج لوناً بنيا من الهيدرازون بالتفاعل مع دي نيتروفينيل هيدرازين .

إصابة أي نسيج بالنكرزة Necrosis يؤدي إلى تحرير هذه الإنزيمات بكم كبير في السيرم. وتقدير كثافة ضوء اللون البني تتناسب طردياً مع النشاط الإنزيمي .

وللتقدير يتطلب المحاليل التالية :

١ ـ محلول منظم فوسفات PH ٧,٤ : يتكون بإذابة ١١,٩٢ جم فوسفات ثنائي الصوديوم جافة + ٢,١٨ جم فوسفات أحادي بوتاسيوم جافة في ماء ، ويكمل إلى لتر ويحفظ في ثلاجة .

٢ ـ مادة الجلوتاميك أوكسالو أسيتيك: زن ٠,٠٥٨٤جم حمض الفاكيتو جلوتاريك + ٥,٣٢ جم حمض دل ـ أسبارتك في كأس ، وأضف عليها ٤٠ مل محلول هيدروكسيد صوديوم عياري ، وقلب واستخدم جهاز PH لضبط الحموضة على ٧,٤ باستخدام نقط من هيدروكسيد صوديوم عياري مع التقليب . انقل المحلول كميا إلى دورق معياري ٢٠٠ مل باستخدام محلول منظم فوسفات PH ٧,٤ ، وأكمل إلى العلامة بنفس المحلول ، ثم أضف ٢ مل كلوروفورم واحفظ في ثلاجة .

٣ ـ دليل لون : أذب ٠,٠٣٩٦ جم دي نيتروفينيل هيدرازين في ٢٠٠ مل حمض هيدروكلوريك عياري باستخدام مقلب مغناطيسي واحفظ في ثلاجة .

٤ ـ هيدروكسيد صوديوم ٠,٤ عياري : أذب ١٦ جم هيدروكسيد صوديوم في لتر ماء.

٥ ـ مادة الجلوتاميك بيروڤيك : زن ٠,٠٢٩٢ جم حمض الفاكيتو جلوتاريك + ١,٧٨ جم حمض دل – ألانين في كأس ، وأضف عليها ٢٠ مل ماء ، وقلب لتمام الذوبان ، اضبط PH على ٧,٤ باستخدام جهاز PH وصودا كاوية عيارية بالتنقيط والتقليب، انقل كميا إلى دورق معياري ١٠٠ مل ، وأكمل بمحلول منظم فوسفات PH ٧,٤ ، وأضف ٢ مل كلورفورم واحفظ في ثلاجة .

٦ ـ محلول قياسي : أذب ٤٤ مجم بيروفات صوديوم نقية في ١٠٠ مل محلول منظم فوسفات PH ٧,٤ لتكوين محلول قياسي تركيز ٤ ملي مول / لتر .

التقدير : تجرى الخطوات التالية لتقدير نشاط الترانس أميناز :

الإنزيم	العينة	المقارنة	المحلول القياسى	بلانك
جلوتاميك بيروفيك ترانس أميناز .	٠,٥ مل مادة جلوتاميك بيروفيك تدفأ على ٣٧°م ٣ دقائق . أضف ٠,١ مل بلازما . حضن ٣٠ دقيقة . أضف ٠,٥ مل دليل لون .	٠,٥ مل مادة جلوتاميك بيروفيك + ٠,٥ مل دليل لون + ٠,١ مل بلازما .	٠,١ مل محلول قياسي + ٠,٤ مل مادة جلوتاميك بيروفيك + ٠,١ مل ماء + ٠,٥ مل دليل لون .	٠,٥ مل مادة جلوتاميك بيروفيك + ٠,١ مل ماء + ٠,٥ مل دليل لون.
جلوتاميك أوكسالو أسيتيك ترانس أميناز .	٠,٥ مل مادة جلوتاميك أوكسالو أسيتيك تدفأ على ٣٧°م ٣ دقائق . أضف ٠,١ مل بلازما . حضن ٦٠ دقيقة . أضف ٠,٥ مل دليل لون	٠,٥ مل مادة جلوتاميك أوكسالو أسيتيك + ٠,٥ مل دليل لون + ٠,١ مل بلازما .	٠,١ مل محلول قياسي + ٠,٤ مل مادة جلوتاميك أوكسالو أسيتيك + ٠,١ مل ماء + ٠,٥ مل دليل لون.	٠,٥ مل مادة جلوتاميك أوكسالو أسيتيك + ٠,١ مل ماء + ٠,٥ مل دليل لون .

تترك جميع الأنابيب ٢٠ دقيقة على درجة حرارة الغرفة ، ثم يضاف إلى كل منها ٠,٥ مل هيدروكسيد صوديوم ٠,٤ عياري ، وتخلط المحتويات جيداً ، وتترك ١٠ دقائق ثم تقدر الكثافة الضوئية على طول موجة ٥١٠ نانومتر مع تصفير الجهاز على البلانك .

احسب كمية البيروفات المتكونة في الدقيقة لكل لتر بلازما من المعادلة :

$$\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} - \text{الكثافة الضوئية للمقارنة}}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي}} \times \frac{٠,٤}{٦٠} \times \frac{١٠٠٠}{٠,١} = \text{ميكرومول}$$

فى حالة تقدير الجلوتاميك أوكسالو أسيتيك ترانس أميناز ، ومن المعادلة التالية فى حالة تقدير نشاط الجلوتاميك بيروفيك ترانس أميناز :

$$\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} - \text{الكثافة الضوئية للمقارنة}}{\text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي}} \times \frac{٠,٤}{٣٠} \times \frac{١٠٠٠}{٠,١} = \text{ميكرومول .}$$

ثم تستنبط الوحدات الدولية لنشاط الإنزيم المقابلة لتركيز البيروفات من الجدول التالي :

تحويل تركيز البيروفات بالميكرومول / دقيقة / لتر إلى وحدات دولية للترانس أميناز.

البيروفات	جلوتاميك أوكسالو أسيتيك	جلوتاميك بيروفيك	البيروفات	جلوتاميك بيروفيك
٢	٢	١	٥٦	٢٤
٤	٣	٢	٥٨	٢٥
٦	٥	٢	٦٠	٢٦
٨	٦	٣	٦٢	٢٧
١٠	٧	٤	٦٤	٢٩
١٢	٩	٤	٦٦	٣٠
١٤	١١	٥	٦٨	٣١
١٦	١٣	٦	٧٠	٣٣
١٨	١٥	٧	٧٢	٣٤
٢٠	١٧	٧	٧٤	٣٥
٢٢	١٩	٨	٧٦	٣٦
٢٣	٢٠*	٨	٧٨	٣٧
٢٤	٢١	٩	٨٠	٣٨
٢٦	٢٣	٩	٨٢	٣٩
٢٨	٢٥	١٠	٨٤	٤٠
٣٠	٢٧	١١	٨٦	٤٢
٣٢	٢٩	١٢	٨٨	٤٤
٣٤	٣١	١٣	٩٠	٤٦
٣٦	٣٣	١٤	٩٢	٤٨
٣٨	٣٥	١٥*	٩٤	٥٠
٤٠	٣٧	١٦	٩٦	٥٢
٤٢	٣٩	١٧	٩٨	٥٤
٤٤	٤١	١٨	١٠٠	٥٦
٤٦	٤٤	١٩	١٠٢	٦٠
٥٠	٥١	٢١		
٥٢	٥٥	٢٢		
٥٤	٦٠	٢٣		

* الحد الأعلى الطبيعي .

ويرتفع نشاط إنزيمات الترانس أميناز في حالات مرضية كثيرة كالذبحة الصدرية ، والتهاب القلب الحاد ، واحتقان القلب وقصوره ، وفي أمراض خلايا الكبد ، وبوجه عام فالارتفاع المحدود يصاحب أمراض الكبد ، بينما الارتفاع الشديد يصاحب أمراض القلب . ويكون الارتفاع في نشاط إنزيم الجلوتاميك أوكسالو أسيتيك أكثر منه لإنزيم الجلوتاميك بيروفيك ترانس أميناز .

٥ ـ إنزيم اللاكتيك دي هيدروچيناز Lactic Dehydrogenase :

يوجد هذا الإنزيم في الأنسجة ، ويقوم بمساعدة أكسدة حمض اللاكتيك إلى حمض بيروفيك في وجود النيكوتيناميد أدينين دي نيوكليوتيد (NAD) ، كما يساعد اختزال حمض البيروفيك إلى لاكتيك في وجود هذا الإنزيم المختزل ($NAD\ H_2$) . وفي تقدير هذا الإنزيم يتفاعل حمض البيروفيك الناتج مع دي نيتروفينيل هيدرازين لتكوين معقد أصفر اللون ، تتناسب كثافته الضوئية مع نشاط الإنزيم .

المحاليل :

١ ـ محلول منظم بيروفات : أذب ١٠ جم فوسفات ثنائي بوتاسيوم ثلاثي الماء (أو ٧,٧ جم فوسفات ثنائي بوتاسيوم جافة) + ٠,٢ جم حمض بيروفيك في ماء وأكمل إلى لتر . أضف نقطة فورمالين كمادة حافظة .

٢ ـ مادة البيروفات : قبل العمل بساعة يخلط ١٠ مل محلول منظم بيروفات مع ٠,٠١ جم إنزيم $NAD\ H_2$.

٣ ـ محلول ملون : أذب ٠,٢ جم ٢-٤- دي نيتروفينيل هيدرازين في ٨٥ مل حمض هيدروكلوريك مركز ، وأكمل إلى لتر بالماء .

٤ ـ هيدروكسيد صوديوم ٠,٤ عياري : أذب ١٦ جم صودا كاوية في لتر ماء .

التقدير :

أضف ٠,٠١ مل سيرم إلى ٠,٥ مل مادة البيروفات ، واخلط وحضن على ٣٧°م لمدة ٤٥ دقيقة . أضف ٠,٥ مل محلولاً ملوناً ، واخلط واترك ٢٠ دقيقة على حرارة الغرفة . أضف ٥ مل صودا كاوية ٠,٤ عياري ، واخلط واترك ٣٠ دقيقة على حرارة الغرفة ، ثم قدر الكثافة الضوئية على ٥٠٥ نانومتر مع تصفير الجهاز على ماء .

أجر منحنىً قياسيا على كميات متدرجة من محلول منظم بيروفات وماء ، وإلى كل أنبوبة يضاف ٠,٥ مل محلولاً ملوناً ويجرى عليها كما في العينات .

تحضير المنحنى القياسي من البيروفات وما يقابلها من وحدات إنزيم :

محلول منظم بيروفات مل	ماء مقطر مل	وحدات إنزيم لاكتيك دي هيدروچيناز / مل
٠,٥	صفر	صفر
٠,٤	٠,١	٣٠٠
٠,٣	٠,٢	٧٠٠
٠,٢	٠,٣	١٠٠٠
٠,١	٠,٤	١٥٠٠
٠,٠٥	٠,٤٥	٢٠٠٠

ويعبر عن نشاط الإنزيم بالوحدات / مل سيرم ، أو بالوحدات / جم نسيجاً طازجاً (مع عمل حساب معامل التجفيف) .

ومتوسط نشاط الإنزيم / مل سيرم ٤٠٠ ± ١٢٠ وحدة ، بينما المدى الطبيعي ٢٠٠ – ٦٨٠ وحدة . وتقدير نشاط الإنزيم هذا ذو أهمية في تشخيص أمراض الذبحة الصدرية ، والتي يستمر ارتفاع نشاط الإنزيم فيها لمدة تصل إلى ١٤ يوماً من حدوث الذبحة . كما يستدل منه على التشخيص المبكر للإصابة بالسرطان . وقد سجل ارتفاع نشاط الإنزيم في البول في حالة سرطان الكلى ، وفي السائل النخاعي في حالة خراج المخ ، وفي السيرم في حالة سرطان الدم الخطير Leukemia ، وفي خراجات الجهاز العصبي المركزي ، وأمراض الكلى ، والفشل الوظيفي للرئة وللقلب ، وفي أمراض الكبد ، وضمور العضلات .

٦ ـ إنزيم الفوسفاتاز القاعدي Alkaline Phosphatase :

يقوم هذا الإنزيم بتحليل عديد من الفوسفات العضوية أحادية الإستر ، والبيروفوسفات وتحرر فوسفات غير عضوي . ولتقديره تحضن العينات (المحتوية على الإنزيم) مع فوسفات فينيل ثنائي الصوديوم ، فيتحرر الفينول الذي يتم تقديره ضوئيا ، إذ تناسب تركيزات لونه مع النشاط الإنزيمي .

المحاليل :

١ ـ محلول منظم PH ١٠,١٤ : أذب ٦,٣٦ جم كربونات صوديوم لامائية + ٣,٣٦ جم بيكربونات صوديوم في لتر ماء واحفظ في ثلاجة .

٢ ـ المادة الفعالة : أذب ٢,١٨ جم فوسفات فينيل ثنائي الصوديوم في لتر ماء ، واغل بسرعة للتعقيم ، برد واحفظ بقليل من الكلوروفورم (٤ مل) ، واحفظ في ثلاجة .

٣ ـ محلول قياسي : أذب ١ جم فينول (كريستال) نقي في لتر حمض هيدروكلوريك ٠,١ عياري ، واحفظ بعيداً عن الضوء في ثلاجة . خفف ١ مل إلى ١٠٠ مل بالماء مع نقط من الكلوروفورم ، واحفظ بعيداً عن الضوء على ٤°م .

٤ ـ هيدروكسيد صوديوم ٠,٥ عياري : أذب ٢٠ جم هيدروكسيد صوديوم في لتر ماء.

٥ ـ بيكربونات صوديوم ٠,٥ عياري : أذب ٤٢ جم بيكربونات صوديوم في لتر ماء .

٦ ـ أمينو أنتي بيرين : أذب ٦ جم من ٤ – أمينو أنتي بيرين في لتر ماء ، واحفظ بعيداً عن الضوء في ثلاجة .

٧ ـ حديدي سيانيد بوتاسيوم : أذب ٢٤ جم حديدي سيانيد بوتاسيوم في لتر ماء ، واحفظ بعيداً عن الضوء .

التقدير يتم بالخطوات التالية :

العينة	المقارنة	المحلول القياسي	البلانك
١ مل محلولاً منظماً + ١ مل مادة فعالة وحضن على ٣٧°م في حمام ماء ٣ دقائق . أضف ٠,١ مل سيرم . حضن ١٥ دقيقة ثم أضف ٠,٨ مل هيدروكسيد صوديم ٠,٥ عياري .	١ مل محلولاً منظماً + ١ مل مادة فعالة + ٠,٨ مل هيدروكسيد صوديوم ٠,٥ عياري ثم او . مل سيرم .	١,١ مل محلولاً منظماً + ١ مل محلولاً قياسياً + ٠,٨ مل هيدروكسيد صوديوم ٠,٥ عياري.	١,١ مل محلولاً منظماً + ١ مل ماء + ٠,٨ مل هيدروكسيد صوديوم ٠,٥ عياري .

ثم يضاف إلى الأنابيب الأربعة بعد ذلك ١,٢ مل بيكربونات صوديوم ٠,٥ عياري ، ثم ١ مل أمينو أنتي بيرين + ١ مل حديدي سيانيد بوتاسيوم ، مع الرج عقب كل إضافة ، فيظهر لون بني محمر ، تقدر كثافته الضوئية على ٥١٠ نانومتر .

يحسب نشاط إنزيم الفوسفاتاز القاعدي من تركيز الفينول مجم المتحرر في ١٥ دقيقة من المعادلة :

$$\frac{\text{قراءة العينة} - \text{قراءة المقارنة}}{\text{قراءة المحلول القياسي} - \text{قراءة البلانك}} \times ١٠ = \text{وحدات كينج أرمستروغ لكل ١٠٠ مل سيرم}$$

حيث إن وحدة King Aarmstrong عبارة عن إنتاج ١ مجم فينول في ١٥ دقيقة .

النشاط الطبيعي لهذا الإنزيم في السيرم في حدود ٣ - ١٣ وحدة كينج أرمستروغ لكل ١٠٠ مل . النشاط يزيد في الأعمار الأصغر ، وكذلك في حالة الحمل المتأخر ، وفي حالات مرضية متعلقة بالعظام ، وبالجهاز الكبدي الصفراوي ، وزيادة نشاط الثيرويد . ويؤدي الإسهال إلى إعاقة امتصاص ڤيتامين D والكالسيوم فيؤدي إلى تغييرات عظمية وزيادة نشاط هذا الإنزيم في السيرم .

٧ - إنزيم الفوسفاتاز الحامضي :

هو نفس أساس التقدير لإنزيم الفوسفاتاز القاعدي ، فيما عدا أنه يستخدم هنا محلول منظم حامضي بإذابة ٢٩,٤١ جم سيترات صوديوم في ٠,٢ عياري حمض هيدروكلوريك حتى ٥٠٠ مل . وباقي المحاليل كما هي وخطوات التقدير كذلك ، فيما عدا زيادة فترة

التحضين إلى ٦٠ دقيقة بدلاً من ١٥ دقيقة . ويجرى حساب النشاط الإنزيمي بنفس الطريقة، حيث إن وحدة نشاط إنزيم الفوسفاتاز الحامضي تعرف بأنها تكافىء تحرير ١ مجم ٪ فينول خلال ساعة تحضين على PH ٥ ، وهي وحدة كينج أرمسترونج (وهي ضعف قيمة وحدة الفوسفات التي تكافىء تحرير ١ مجم ٪ فوسفات غير عضوي في ساعة تحضين علىPH ٥) .

ويفيد تقدير نشاط هذا الإنزيم في حالة ورم البروستاتا الخبيث Malignant prostate التي يصاحبها ارتفاع في نشاط الفوسفاتاز الحامضي .

٨ - إنزيم الأميلاز :

يتأثر نشاط البنكرياس ربما لوجود ما يعيق تدفق العصير البنكرياسي ، أو ما يدهور النسيج الغدي ، أو كلاهما ، مما يؤثر على كمية إنزيمات البنكرياس في الدم بالزيادة ، أي أن اضطرابات البنكرياس تكون مصحوبة بزيادة نشاط الأميلاز والليباز في السيرم .

ولتقدير الأميلاز يوضع في أنبوبتين ٥ مل محلول نشا (١,٥ جم نشا ذائب + ٥ مل ماء يغلي ، وأثناء الغليان يضاف ماء لإكمال الحجم إلى ١٠٠ مل ، ويكمل للغليان ولا يستمر فيه ، برد ورشح على صوف زجاجي ، واحفظ في ثلاجة) + ٢ مل محلول كلوريد صوديوم (١ ٪) . وفي إحدى الأنبوبتين (عينة) ضع ١ مل سيرم ، واخلط جيداً ، وحضن الأنبوبتين على ٣٧م لمدة ١٠ دقائق . أضف ٣ مل ماء + ٨ مل حمض كبريتيك ٠,٠٨٥ عياري لكل أنبوبة . أضف ١ مل سيرم لثاني أنبوبة (مقارنة) واخلط جيداً . أضف ١ مل تنجستات صوديوم (١٠ ٪) لكل أنبوبة ، اخلط واترك عدة دقائق لتمام الترسيب . رشح وقدر الجلوكوز في ٢ مل من كل راشح .

احسب نشاط الأميلاز كوحدات سوموجي Somogyi units / ١٠٠ مل سيرم = (مجم ٪ جلوكوز في العينة – مجم ٪ جلوكوز في المقارنة) × ٢ .

وقد ترجع اضطرابات البنكرياس لالتهابات الزوائد الأعورية ، والانسدادات الصفراوية ، أو انتفاخ البنكرياس ، أو البنكرياس الكبدي (كما في حالة السرطان) ؛ فقد لوحظ زيادة نشاط الإنزيم في حالة التهاب الزائدة الأعورية بفعل السموم البكتيرية .

وبتقدير نشاط الأميلاز في البول يعكس أيضاً التغييرات في أميلاز السيرم ، طالما كانت الكلى تعمل طبيعياً ، بينما في أمراض الكلى قد يرتفع نشاط أميلاز السيرم ، وينخفض أميلاز البول . ويزيد نشاط الإنزيم في كل من البول والسيرم في حالة التهاب البنكرياس الحاد ، بينما لا يظهر هذا الارتفاع في مرض البنكرياس المزمن . وقد يزيد أميلاز السيرم في أمراض باطنية مثل انسداد الأمعاء ، والتهاب البريتون الحاد ، وقرحة المعدة . وقد تنخفض أنشطة الأميلاز في كل من السيرم والبول في وجود أمراض الكبد .

ولزيادة الإيضاح يستعان بالمراجع التالية :

- Henry , R. J. et al (1974) Clinical Chemistry Principles and Technics, 2 nd Ed., Harper & Row, N. Y .

- Lister, D. & Gregory, N. G. (1978) BSAP Occasional Publication No. 1 .

- Merck , E. (1974) Klinisches Labor. 12 . Auflage, Merck, Darmstadt .

- Paglia, D. E. & Valentine , W. N. (1967) J. Lab & Clin . path., 28 : 56 .

- Reitman, S. & Frankel, S. (1957) Am. J. Clin. Med., 76 : 158 .

- Soliman, M. K. & Abd ElMoty, I. (1976) A modern Approach to Veterinary Clinical & Laboratory Diagnosis . The scientific Book Centre, Cairo .

- The Feeding Stuffs (Sampling and Analysis) Regulations (1982). Agriculture 1982 No. 1144 . Her Majestyas Stationery Office, London

- Varley , H. (1978) Practical Clinical Biochemistry. 4 th Ed. Arnold - Heinemann , India .

- Wells, B. B. (1962) Clinical pathology. 3 rd. Ed. Saunder, philadelphia & London .

- Wootton, I. O. P. (1974) Microanalysis in Medical Biocehemistry 5 th Ed., Churchill , London .