الباب التاسع

السمية الحادة و الشبه مزمنة و المزمنة للملوثات البيئية و السموم

obeikandl.com

obeikandl.com

١ -معلومات تقديميه (Introductory Information) :

حيث لابد من توافر معلومات و متطلبات (Prerequisites) عن المادة الكيميائية المختبرة كجزيئات السموم والملوثات البيئية الصلبة أو السائلة مع التعريف الكيميائي لها (Chemical Identification) والذي يشير الى احتمال نشاط بيولوجي أو تكسيكولوجي لها ، كما أنه في نفس الوقت يستخدم في تحليلها والمبنى على العلاقة بين التركيب الكيميائي و نشاطها.

كذلك معرفة صفاتها الطبيعية مثل نقطتي الانصهار والغليان (Melting Boiling Point) وصفات الذوبان (Solubility Character) حيث إنها غالبا ما تعامل مع البيئة الغذائية أو مياه الشرب وكذلك أس تركيز أيون الهيدروجين (pH) ، كذلك الصفات الطبيعية والكيميائية لها والتي تمد بمعلومات أولية عن طريقة الاختبار (والتي من الأفضل إتباعها) كذلك تفيد في ظروف التخزين و نسبة النقاوة ودرجة الثبات الكيميائي عند إضافتها للغذاء أو لمياه الشرب كذلك تفاعلات التحليل المختلفة و الممكن حدوثها في هذين الوسطين (الغذاء والمياه) وقابليتها لتكوين معقدات معهما من غيره .

٢ - الغرض والمجال والمعاملة ومحددات الاختبار(Purpose, Scope, Exp., & Test limits):

٢-١-لقياس وتقييم الخصائص السامة لملوث بيئي أو مادة سامه مختبرة من حيث تأثيرها المعدي (Stomach effect) عن طريق التعاطي باللفم (Oral administration) لتقدير سميتها الحادة باللفم (Oral acute toxicity) وهي الخطوة الأولية و التي تخدم كأساس لتقيم الكيماويات وعمل الملصقات كما أنها الخطوة الأولى لتعين نظام رجيم التجويع (Dosage regimen) و الممكن استخدامه عند دراسة السمية المتكررة أو السمية الشبه مزمنة و السمية المزمنة و التي تمد بمعلومات عن أخطار الصحة العامة و المحتمل حدوثها نتيجة التعرض المتكرر للمادة المختبرة كذلك تمد بمعلومات عن العضو (أو الأعضاء) المستهدفة من جراء تأثير هذه المادة كما تمد بمقياس عن مستوى التعريض الغير مؤثر والذي يمكن استخدامه في اختيار مستويات الجرعة بالنسبة للتعرض البشرى.

٢-٢-طريقة الاختبار(Principle of Test Method):

٢-٢-١- ففي دراسة السمية الحادة بالفم : يتم تعريض مجموعات من الحيوانات المختبرة لجرعة واحدة ومتدرجة كل منها تعطى لأفراد كل مجموعة من مجموعات الحيوانات المختبرة.

٢-٢-٢-أما في دراسة السمية الشبه مزمنة بالفم : يتم تعرض مجموعات من الحيوانات المختبرة لجرعة واحدة يوميا / ٩٠ يوم كل منها تعطى لأفراد كل مجموعة من مجموعات الحيوانات المختبرة.

٢-٢-٣-بينما في دراسة السمية المزمنة بالفم : يتم تعرض مجموعات من الحيوانات المختبرة لجرعة واحدة يوميا /سنة كل منها تعطى لأفراد كل مجموعة من مجموعات الحيوانات المختبرة .ويتم تدوين الملاحظات يوميا لتتبع أعراض السمية الناتجة عن التأثيرات العكسية و الغير عكسية وعدد الحيوانات المميتة عقب كل تعريض مباشرة .

٢-٢-٤-ففي دراسة السمية الحادة بالفم : يستمر الملاحظة اليومية ٢٤ ساعة عقب المعاملة بالفم و حتى ٢٤ يوم .

٢-٢-٥-أما في دراسة السمية شبة المزمنة بالفم : يستمر الملاحظة اليومية ولمدة ٩٠ يوم عقب المعاملة سواء كانت مع الغذاء أو مع مياه الشرب .

٢-٢-٦-بينما في دراسة السمية المزمنة بالفم : يستمر الملاحظة اليومية ولمدة سنة عقب المعاملة سواء كانت مع الغذاء أو مياه الشرب . كما يتم تشريح الحيوانات التي تموت أثناء الاختبار ، أو التي مازالت على قيد الحياة حتى نهاية التجربة وهنا تذبح وتشرح و تقارن مع الأفراد الغير معاملة (الكنترول).

٢-٣-وصف طريقة الاختبار(Description of the Test Procedure):

٢-٣-١-يتم اختبار نوع الحيوان المعامل Selection of Animal SP. حيث تستخدم أنواع كثيرة من الثدييات ولكن تفضل الفئران (Rats) من القوارض و من غير القوارض تفضل الكلاب (و أفضلها النوع beagle) سواء لتقييم السمية الحادة أو شبة المزمنة أو المزمنة.

٢-٣-٢ـ ويجب وأن تكون الحيوانات المختارة أصحاء متماثلة الحجم عن طريق تماثلها في الوزن تقريبا و الذي يواكب الاختبار حيث لا يسمح

وألا يزيد التفاوت في الوزن عن ± ٢٠% عن المتوسط العام (بالفئران من ٢٠٠-٣٠٠جم).

٢-٣-٣ــ أما من حيث عددها فيجب و أن يكون عددها بكل مجموعة (معاملة) كافي للتقييم الواضح من حيث التأثيرات الناجمة عنها الأعواض وعموما لا تقل كل معاملة عن ٢٠ فأر (١٠ ذكور ــ ١٠ إناث) أما في حالة الكلاب : فتكون المجموعة ثمانية (٤ ذكور ، ٤ إناث) حيث يجب وان تدرس السمية بكل من الجنسين خاصة عند دراسة السمية المزمنة .

٢-٣-٤-يجب وان تكون الإناث المستخدمة بكر (Nuliporus) وغير حاملة (non. Pregnant) لذا تفضل الأعمار بين ٦ــ٨ أسابيع.

٢-٣-٥ــ يتم اختبار حيوانات كل مجموعة عشوائيا ثم تعلم المجاميع تبعا لعدد مستوى الجرعات علاوة على الكنترول المطلوب وذلك قبل خمسة أيام من المعاملة .

٢-٣-٦-وقد تم عمل مجموعة أخرى ككنترول تابعة (Satellite group) بنفس العدد ونسبة الجنس و تعامل فقط بأعلى مستوى للتجريع لملاحظة التأثيرات العكسية وثباتها وكذلك التأثيرات المتأخرة حيث يستمر معاملتها لمدة ١٤ــ١٨ يوم ثم توقف المعاملة وتستمر ملاحظتها يوميا حتى نهاية التجربة .

٢-٤-الإعاشة (Housing) و الغذاء (Feeding) :

٢-٤-١-حيث تعيش الحيوانات معزولة بصفة فردية أو في مجاميع تبعا للجنس تحت ظروف ثابتة من الحرارة (و التى تختلف تبعا للنوع المختبر) والرطوبة النسبية و الأضاءة (نظام اضاءة متعاقب ١٢ ساعة اضاءة يعقبها ١٢ ساعة اظلام) .

٢-٤-٢- أما نظام التغذية فيتم على بيئات صناعية تقليدية تحتوى على جميع الاحتياجات الغذائية للنوع المختبر خالية من الشوائب .

٢-٤-٣-أما بالنسبة لمياة الشرب فليس هناك تقيد على كميتها او الامداد بها ويجب عمل تحليل روتينى و فحص دورى لها .

٢-٥-ظروف الاختبار و طريقة المعاملة(Test Conditions & Procedure)

٢-٥-١ــيجب وان تكون مستويات التجريع (Dose level) كافية من حيث عددها و الذى لا يقل عن ثلاثة تركيزات متباعدة ومتدرجة بحيث تدخل فى نطاق التأثيرات السامة ليتسنى رسم منحنى الجرعة -الاستجابة .

٢-٥-٢- أما من حيث وقت التعريض للمادة المختبرة و المتناولة بالفم (Oral adminstration)

٢-٥-٢-١-**ففي حالة دراسة السمية الحادة بالفم:** يتم تعاطى جرعة منفردة فقط عن طريق الفم

٢-٥-٢-٢-**أما في حالة دراسة السمية شبه المزمنة بالفم :** يتم تعاطى جرعة يوميا /٥-٧ يوم / أسبوع / ٩٠ يوم سواء كانت مع الغذاء أو المياه.

٢-٥-٢-٣-**أما في حالة دراسة السمية المزمنة بالفم :** يتم تعاطى جرعة يوميا / ٥-٧ /يوم / أسبوع /سنة سواء أكانت مع الغذاء أو المياه.

٢-٥-٣-حيث يتم المعاملة بتعاطي الجرعة بالفم لكل حيوانات المعاملات المختلفة لنظام التجريع وبنفس الطريقة وخلال الفترة المحددة لذلك حيث تخلط مع المادة الغذائية (البيئة الغذائية) بالجرعة المقدرة (جزء في المليون) بحيث لا تزيد عن ٥% من وزن البيئة الغذائية أو تكون في صورة كبسولات (Capsules) أو تضاف لمياه الشرب، وفى حالة استخدام مذيب مساعد مثلا لإذابة المادة المختبرة كأداة (Vehicle) لتسهيل المعاملة فيجب اختبار تأثيراتها السامة المتداخلة إن وجدت وذلك بعمل معاملة بكمية هذا المذيب بمفردها وملاحظة تأثيره الشبه مزمن أو المزمن.

٢-٥-٤- تستمر فترة الملاحظة (Duration of Observation) والتي يجب وأن تكون كافية للتقييم الكامل وظهور أعراض السمية خاصة و إذا ما كان هناك ميل لتأخر هذه الأعراض أو تأخر الموت :

٢-٥-٤-١-**ففي حالة السمية الحادة بالفم :** تستغرق فترة الملاحظة من عقب تناول الجرعة وحتى ١٤ يوم .

٢-٥-٤-٢-**أما في حالة السمية شبه المزمنة بالفم :** تستغرق فترة الملاحظة من عقب تناول الجرعة وحتى ٩٠ يوم.

٢-٥-٤-٣-**بينما في حالة السمية المزمنة بالفم :** تستغرق فترة الملاحظة من عقب تناول الجرعة وحتى سنة.

٢-٦- **الفحص (Examination) :**

حيث يتم التسجيل الدورى المنتظم للملاحظات الفردية كما تحدث بالترتيب لكل حيوان بكل معاملة ، كما يتم تسجيل اى ملاحظات أخرى اضافية قد تكون مهمة ليتسنى تقليل الفقد فى عدد الحيوانات المدروسة .

٢-٦-١-الفحص السريرى :الكلينيكى (Clinical Examination) :

يجرى يوميا لتسجيل الملاحظات الخاصة و الأعراض ووقت الموت كما تشرح الحيوانات الميتة او تجمد لحين تشريحها لفحصها مورفولوجيا وتسجيل التغيرات المرضية والوزن وعزل الحيوانات المحتضرة لذبحها وتشريحها كذلك معدل استهلاك الطعام أسبوعيا والتأكد من ان نقص الحيوانات مصدرة الموت و ليس الافتراس او التحلل الذاتى أو الهرب .

٢-٦-٢-الفحص الباثولوجى(Pathological Exam.):

حيث تفحص أعراض السمية للحيوانات التى تم تشريحها وتسجيل التغيرات المرضية و المورفولوجية والداخلية للأعضاء المستهدفة خاصة بعد ٢٤ ساعة من التعريض.

٢-٦-٣-فحص الدم (Haematological Exam.):

كتقدير الهيماتوكريت و الهيموجلوبين و عدد كرات الدم بانواعها و قياس جهد ووقت التجلط وعدد الصفائح .

٢-٦-٤-الفحص البيوكيميائى (Biochemical Exam.):

ويجرى على الحيوانات التى ما زالت على قيد الحياة فتقاس وظائف الكبد والكلى .

٢-٦-٥-الفحص النسيجى (Histological Exam.):

ويجرى على الأعضاء السابق فحصها باثولوجيا لملاحظة التغيرات النسيجية المرضية من خلال قطاعات تصبغ بصبغات خاصة لبيان مناطق الضرر.

٣- البيانات وكتابة التقرير(Data & Reporting) :

٣-١- تقدير نشاط الأنزيمات الناقلة لمجموعة الأمين(Determination of Transaminases Activity) :

يجرى العديد من الأختبارات بهدف دراسة مستوى نشاط الكبد للقيام بوظائفه الحيوية المختلفة عقب تعرض الكائن الحى للسموم (بطريقة مباشرة أو غير مباشرة ولفترة طويلة: العمل المهني).

فالعديد من البروتينات الهامة حيويا تخلق بالكبد كالألبيومينات و الجلوبيولينات و الفيبرينوجين وهو ما يشير لأهمية حدوث إى اضطراب بالكبد نتيجة تعرضه للسموم أو الملوثات البيئية مما يؤثر على وظائفه الحيوية (Liver Functions).

وتلامس الأنزيمات الناقلة لمجموعة الأمين (Transaminase) ــ بالعديد من أماكن الجسم ــ عملية نقل مجموعة الأمين (Amino-group) من حمض أميني بالجسم إلى حمض كيتوني (Keto acid) ونشاطها فى ذلك يدل على مدى النشاط الخلوى لأنسجة الكبد فى تكسيرها و أنهيار السموم (Active cell breakdown) .ولذلك فعند أختبار وظائف الكبد عقب التعرض للتسمم أو لبعض للسموم البيئية و التى تسبب تكرز بخلايا الكبد (Liver-Necrosis) أو تتدهن كبدى (Fatty Liver) أو احتباس بالصفراء (Cholestatis) أو تثبيط تخليق البروتين (Protein Synlhesis) أو السرطان الكبدى وكلها تؤثر ولحد بعيد على مستوى النشاط الأنزيمى للأنزيمات الناقلة لمجموعة الأمين.

ومن أمثلة هذه الكيماويات رابع كلوريد الكربون ($C Cl_4$) والكلوروفورم ($CHCl_3$) و الأيثيونين (Ethionine) والفسفور العضوى و النيتروزأمين (Nitrose amine) و داى ميثيل نيتروزأمين (Dimethyl nitrose amine) و البيريليم و الهيدرانيات (Hydrazines) و داى الهيدرازنيات كلوروائيلين (Dichoro ethylenes).

٣-١-١- تقدير نشاط انزيم جلوتاميك بيروفيك ترانس أمينيز :

(Glutamic Pyruvic Transaminase : GPT) :

يعد هذا الانزيم من الانزيمات السائدة (Predominant) فى الكبد وذلك لوجوده بتركيز عالى بالانسجة الكبدية ، و مادة تفاعلة الاساسية هى حمض الأنين (L-Alamine :Ala) حيث يقوم بنقل مجموعة الامين منه الى حمض الفا - كيتوجلوتارات (α-Ketoglutarite) ويتكون بذلك حمض الجلوتاميك (Glutamic acid) و البيروفات (Pyruvate) وتبنى اساس فكرة التقدير للنشاط الانزيمى على تفاعل البيروفات مع مركب ٢,٤-داى نيتروفينيل هيدرازين (2.4- Dintropheyl Hydrazine) فى وسط قلوى معطيا مركب ازرق اللون ثابت تقاس شدته اللونية (طريقة Frankel's 1970)، وتتلخص خطواتها فيما يلى:

٣-١-١-فى انبوب جاف ونظيف يوضع ٠,٥ ملل من محلول مادة التفاعل الاساسية (ألانين و α - كيتوجلوتارات ٢ ملليمول / لتر ذائب فى منظم فوسفاتى (7-4PH) وبتركيز ١٠٠ ملليمول/ لتر) ثم تحضن فى حمام مائى

على درجة ٥ ± ٣٧° م لعدة دقائق ثم يضاف اليها ١,٠سيرم أو بلازما ثم ١,٠ ملل ماء مقطر وترج بلطف و تحضن لمدة ٣٠ دقيقة.

٣-١-٢-يرفع الأنبوب من الحمام المائى ويضاف إليه ٠,٥ من محلول ٤,٢ -داى نيتروفينيل هيدرازين (بتركيز ١ ملليمول / لتر فى محلول حمض الهيدروكلوريك بتركيز ١ ملليمول / لتر) وترج جيدا وتترك عشرة دقائق على درجة ٣٧° م فى الحمام السابق ثم يضاف ٥ ملل هيدروكسيد الصوديوم ٠,٤ مول / لتر والمحضر بتركيز ٤ مول / لتر ويخفف قبل الاستعمال الى ٠,٤ مول / لتر بالماء المقطر) . وترج جيدا لتمام التجانس و الخلط

٣-١-٣- يتم قراءة الكثافة اللونية للون الناتج عقب أضافة هيدروكسيد الصوديم بدقيقتين على الأسبكتروفوتومتر على طول موجى ٥٤٦ نانوميتر (أو على الفوتوميتر مع فلتر اخضر ٥٠٠-٥٥٠ نانوميتر) مقارنة بأنبوب البلانك المحتوى على كل المحاليل السابقة عدا إضافة السيرم حيث يترجم الكثافة الضونية لتركيز من المنحنى القياسى (بعمل مجموعة متدرجة التركيزات (Set) من المادة القياسية (البيروفات) ثم تقاس برسم المنحنى بين هذه التركيزات والكثافة اللونية الناتجة منها وتحسب قيمة الثابت K (بقسمة الكثافة الضونية لكل تركيز + قيمة هذا التركيز) ومنها يتم استخراج قيمة الثابت العام K لها (وكلما ذادت قيمتها تدل على زيادة نشاط الأنزيم).

٣-٢-أنزيم جلوتاميك أكسالوأستيك ترانس أمينيز

:(Glutamic Oxaloacetic Transaminase : GOT):

يلامس أنزيم جلوتاميك أكسالوأستيك ترانس أمينز تفاعل نقل مجموعة الأمين من الحمض الأمينى أسبارتيك (L-aspartic acid : Asp) إلى حمض الفا-كيتونى (∝ - كيتوجلوتارات) فيتكون الحمض الأمينى جلوتاميك (Glutamic Acid : Glu) و أكسالوأسيتات (Oxalo acetate) وهو مركب غير ثابت سوعان ما يتكسر ويتحول الى البيروفات والتى تتفاعل بدورها مع مركب : ٢ ، ٤ -داى نيتروفينل هيدرات فى وسط قلوى (هيدروكسيد الصوديوم) وينتج مركب ملون تقاس درجته على طول موجى يتراوح بين ٥٠٠ ــ ٤٠٠ نانوميتر باستخدام فلتر اخضر أو على الأسبكتروفومتر و علي طول موجى قدرة ٥٤٦ نانوميتر .

٣-٣-تقدير نشاط أنزيم الفوسفاتيز القلوى و الحامضى
(Alkaline & Acid Phosphatase activity):

تلامس أنزيمات الفوسفاتيز تفاعل نـزع الفوسـفات مـن المركبـات الأسترية الفوسفورية العضوية ولهذه الأنزيمات أهميتها الكبرى مـن الناحيـة التوكسيكولوجية عند التشخيص لحالة الكبد المعرض للسموم

٣-٣-١- الفوسـفاتيز القلـوى: الفوسفومونواسـتيز(Alkaline : I Phosphatase)

٣-٣-١-١- يقوم بنزع مجموعة الفوسفات فى وسط قلوى (pH تتراوح بين : ٨,٦ - ١٠,١) وفى وجود أيونات الماغنسيوم المنشطة له بينمـا يثبـط تأثيره حمض السيستئين و الجلوتاثيون و الجلوتاميك.

٣-٣-١-٢- ويوجد هذا الأنزيم بجميع أنسجة الجسم تقريبا خاصة مصل الدم وخلايا الطبقة المخاطية بالأمعاء والكبد لذا فتركيزه ثابت تقريبا بالمصل.

٣-٣-١-٣- وتزداد قيمة نشاط الفوسفاتيز القلوى فى حالة أمـراض الكبـد فيتضاعف ٥-١٠ مرة ضعف الحالة الطبيعية خاص في حالـه مـرض اليرقان الأنسدادى (Jaundice) والالتهاب الكبدى و التدهن الكبـدي (كمـا يحدث مع التعرض للسموم خاصة) وتليـف المـرارة (Biliary Cirrhosis) والأورام (Carcinomotosis) وأقصى نشاط له فى حالـة مـرض الضمـور الصفراوى الحاد كذلك فى تشخيص سرطان الكبد (Atrophia). كذلك يـزداد نشاطه فى حالة الأمراض العصبية وعند نشاط الغـدة الدرقيـة (Hyper parathyroidism) . ويعد تقدير الأنزيمات الناقلة للأميـن مـع الفوسـفاتيز القلوى أختبار لمدى أحتباس الصفراء (Cholestatic) بين المرارة والكبـد والسمية الكبدية (Hepatitic toxicity). و تبنى فكرة التحليـل علـى أسـاس التحليل المائى لاستر-داى صوديوم فينيل فوسفات إلى فوسفات صوديـوم وفينيل يتم تقديره كدلالة على مدى النشاط الأنزيمى وتتلخص خطواتـها فيما يلى :

فى أنبوب جاف يؤخذ ٦ ملل من المحلـول المنظـم لمـادة التفـاعل الأساسية والمحضر بمزج حجمين متساويين من المحلولين : محلول فينيل فوسفات الصوديوم الثنائية ٠,٠١ مول (باذابة ١,٠٩ جم/٤٠٠ ملل مـاء ثم يغلى ويبرد ويكمل إلى ٥٠٠ ملل ثم تضاف نقطتيـن كلورفـورم ثـم

يضاف إليه حجم مساوى من ب) محلول منظم كربونات الصوديوم ٠,١ مول (والمحضر باذابة ٣,١٨ جم من كربونات الصوديوم اللامائية و ١,٦٨ كربونات صوديوم حامضية فى كمية من الماء ويكمل الحجم إلى ٥٠٠ ملل بالماء المقطر ويعدل pH إلى ١١ ثم يوضع بحمام مائى / ٣٧ °م لبضع دقائق. يضاف إليه المصل ويفضل أن يكون الأنبوب بالحمام وتغلق الأنبوب بسدادة فلين وتترك بالحمام /١٥ دقيقة. يخرج الأنبوب ويضاف إليه ٢,٧ ملل كاشف الفينول (١٠٠ جم تتحسنات صوديوم تذاب فى ٧٠٠ ملل ماء ثم يضاف إليها ٢٥ جم موليبدات صوديوم ثم يضاف ٥٠ ملل حمض فوسفوريك ٨٥% و١٠٠ ملل حمض هيدروخليك ويغلى ١٠ دقائق ثم يبرد ويضاف إليه ١٥٠ جم كبريتات ليثيوم و ٥٠ ملل ماء مقطر ويضع قطرات بروم ثم يغلى مرة أخرى /١٥ دقيقة لطرد البروم الزائد ثم يكمل الحجم إلى ١٠٠٠ ملل ويرشح ويخفف عند الأستخدام بنسبة ٢:١ بالماء ويرج جيدا)-و يؤخذ من الأنبوب ٤ ملل من الطبقة الرائقة ويضاف إليها ١ ملل كربونات صوديوم ٢٠% (محفوظ بمكان بارد حتى لا يتبلور).

و يؤخذ أنبوب ثانى للمقارنة كما سبق بالضبط لكن لا يوضع فى الحمام المائى ويؤخذ أنبوب ثالث للمعايرة يوضع به ١ ملل كربونات صوديوم ٢٠% ،٤ ملل محلول فينول (والمجهز باذابة بللورات الفينول بحمض هيدركلوريك ٠,١ عيارى ويخفف قبل الأستخدام بنسبة ١ : ١٠ فتكون كل ١٠٠ ملل تحتوى على ١٠ مللج فينول) مع كاشف الفينول (والمجهز كما يلى حيث يحتوى ١٠٠ ملل على ١ / ٢ حجم فينول مضاف إليه ١٥ ملل من كاشف الفينول السابق (خطوة ويكمل الحجم إلى ٥٠ ملل. بوضع الأنابيب الثلاثة بحمام مائى / ٣٧ °م / ١٥ دقيقة ثم تخرج وتقاس الكثافة اللونية على طول موجى ٦٨٠ نانوميتر (فلتر أحمر).

كمية الفينول المتحررة / ١٠٠ ملل مصل / ١٥ دقيقة / ٣٧ °م

$$= (١٠٠ / ٠,٣) \times (٤ / ٩) \times ٠,٢ \times \frac{\text{الكثافة اللونية بأنبوب العينة}}{\text{الكثافة اللونية بأنبوب العينة}}$$

= ١٥ × الكثافة اللونية بأنبوب العينة / الكثافة اللونية بأنبوب المعايرة

حيث أن كل ١ ملل فينول / ١٠٠ ملل مصل = وحدة فاعلية أنزيم

عدد وحدات الأنزيم / ١٠٠ ملل مصل =

١٥ × الكثافة اللونية للبلانك / الكثافة اللونية للعيارى − ١٥ × الكثافة اللونية للعينة / الكثافة اللونية للعيارى

ملحوظة:

- لتحويل وحدات كينج وارمسترونج (King & Armstrong) لوحدات أنزيمية (IU) / لتر،تضرب النتيجة (K - A) × ١٠٠٠ / ٩٤ = IU / لتر.
- لتحويل وحدات كينج للميكرومول تضرب فى ١٠ لتحويلها للتر ثم تقسم على ١٥ ليصبح فى الدقيقة.
- لتحويل وحدات كينج للميكرومول : (KA) {٧,٥} ← IU/لتر

{١٥/١٠ × ٩٤/١٠٠٠}(KA)

وتبلغ قيمه نشاطة بالأطفال : ٢٠ - ٣٠ وحدة أنزيم / لتر.

وتبلغ قيمه نشاطة بالأنسان : ٣٢ - ٩٢ وحدة أنزيم / لتر (KA 13-3)

٣-٣--٢-الفوسفاتيز الحامضى:الفوسفومونوأستيريز(Acid II,III.IV phosphatase (Gutman)

يقوم بنزع مجموعة الفوسفات فى وسط حامضى (pH يتراوح بين : ٤,٦ - ٥,٠) وينشط في الوسط الحامضى ويثبط تأثيره وجود أملاح حمض الطرطريك ولا يتأثر بوجود أيونات الماغنسيوم.

و يوجد بصفة أساسية فى الكبد ويفرز مع عصارة الصفراء وكرات الدم الحمراء (ويقل لذلك بالمصل).

وتبنى أساس فكرة التقدير على مقدرة الأنزيم فى التحليل المائى لاستر / داى صوديوم فينيل فوسفات إلى فوسفات صوديوم و فينول حيث يقدر الفينول كدلالة على نشاط الأنزيم ولكن بوسط حامض (وسط المنظم {pH : ٤,٩}) حيث يؤخذ ٦ ملل من محلول المنظم للمادة الأساسية للتفاعل بأذابة ٢١ جم من حمض الستريك فى كمية من الماء ثم يضاف إليها ١٨٨ ملل هيدروكسيد صوديوم ١ عيارى ثم يكمل الحجم إلى ٥٠٠ ملل ثم تضبط الحموضة بحيث تصبح ٤,٩ ويجهز المحلول (ب) : بإذابة ٢٩,٤١ سترات صوديوم فى كمية من حمض الهيدركلوريك ٠,٢ عيارى ويكمل الحجم إلى ٥٠٠ ملل ثم يخرج المحلولين لحين الإستخدام حيث يمزج حجمين متساويين يؤخذ منها ٦ ملل السابقة) ويضاف إليها ٠,٣ ملل مصل دم وتوضع بحمام مائى ٣٧ °م / ساعة ويكمل كما سبق.

كمية الفينول المتحررة / ١٠٠ ملل مصل / ساعة /٣٧ °م=

$$(٠,٣/١٠٠) \times (٤/٩) \times ٠,٠٢ \times \frac{\text{الكثافة اللونية بأنبوب العينة}}{\text{الكثافة اللونية بأنبوب المعايرة}}$$

$$= ١٥ \times \frac{\text{الكثافة اللونية لأنبوب العينة}}{\text{الكثافة اللونية لأنبوب المعايرة}}$$

كل ١ مللج فينول / ١٠٠ ملل مصل = وحدة فاعلية أنزيم فوسفاتيز حامضى

عدد وحدات الأنزيم فى ١٠٠ ملل مصل / ساعة = ٦٠ × الكثافة اللونية أنبوب العينة / الكثافة اللونيةنبوب لمعايرة

ملحوظة:

- لتحويل القراءة لقيم وحدات 2U / لتر تضرب النتيجة فى ١,٧٧=
  قيمة × [(٩٤/١٠٠٠) × (٦٠/١٠)] = قيمة × [١,٧٧]
- وتبلغ قيمة نشاطه بالإنسان العادي ١:-٥ وحدة ولكن ترتفع عند التهاب وسرطان البروستاتا (السموم المؤثرة على الجهاز التناسلي).

obeikandi.com

٣-٣-٣- تقدير نشاط اللاكتات ديهيدروجينيز (Determination of Lactate Dehydrogenase :LDH)

ويلامس هذا الأنزيم أكسدة حمض اللاكتيك (Lactic acid) وتحويله لحمض البيروفيك (Pyruvic acid) في وجود المرافق الأنزيمي (NAD+) . وينتشر هذا الأنزيم بانسجة أعضاء الجسم المختلفة كالكلى والتليف والعضلات الهيكلية والبنكرياس والطحال والكبد والرئتين ومصل الدم وكرات الدم الحمراء ، وعند تسمم الكبد(Hepatitis) أثناء اليرقان أو تسمم الكلى والبنكرياس يزداد نشاطه كثيرا عن ١٥٠-٥٠٠ وحدة

حيث يتفاعل حمض البيروفيك مع ٢،٤-داى نيتروفينل هيدرازين فيتكون مركب معقد ملون تقاس شدة كثافة اللونية على طول موجى ٤٤٠ نانوميتر وتتلخص خطوات التقدير باخذ انبوب جاف به ١ ملل من مادة التفاعل الأساسية (باذابة ٧,٥٠٥ جم جلسين ، ٥,٨٥ كلوريد صوديوم في ماء مقطر حتى لتر ثم يؤخذ من المحلول ١٢٥ ملل يضاف إليها ٧٥ ملل من هيدروكسيد الصوديوم ٠,١ ع إلى ٥ ملل لاكتات صوديوم ٤ جم / لتر) ثم يضاف للانبوب ٠,٠٢ ملل مصل دم كذلك بالانبوب العيارى اما البلانك فيؤخذ ٠,٢ ملل ماء مقطر و توضع الانابيب بحمام مائى/٣٧ ° م ثم يضاف للانبوبين الاولين ٠,٢ ملل NAD (وجهز باذابة ١٠ مللج فى ٢ ملل ماء فقط ثم يحفظ على -٤°م) وترج الانبوب جدا ويوضع بالحمام /١٥ دقيقة ثم يضاف للثلاثة ١ملل من داى نيتروفينيل هيدرازين (٢٠٠ مللج في محلول حمض الهيدركلوريك ١ عيارى ثم تكمل للتر) ثم ترج الأنابيب وتعاد للحمام مرة أخرى/١٥دقيقة ثم تخرج من الحمام ويضاف لكل منها ١٠ ملل هيدروكسيد صوديوم ٠,٤ عيارى وترج وتقرأ الكثافة اللونية على ٤٤٠ نانوميتر و تترجم من منحنى قياسى للبيروفات (١١ مللج بيروفات فى ١٠٠ مادة تفاعل) ١٢٥ ملل منظم الجليسن ،٧٥ ملل هيدروكسيد صوديوم ٠,١ ع و٥ ملل لاكتات صوديوم) أما محلول NADH2 ١ ميكرومول فيجهز بإذابة ٠,٠٠٠٧١ جم (وزن الجزيئى ٧٤٠) فى لتر محلول مادة تفاعل الأنزيم بحيث يصبح التركيز النهائى ١ ميكرومول /١ ملل .

٣-٣-٤- تقدير محتوى البيلروبين الكلى والمباشر(المرتبط)

(Determination of total and direct Bilirubin):

يتم تخليق العصارة الصفراء بالكبد ثم تتجمع بالحويصلة الصفراوية ومنها تنتقل للأمعاء الدقيقة خلال القناة الصفراوية - وتبلغ الكمية المخلقة /يوم ٥٠٠-٧٠٠ ملل نسبة الماء فيها ٩٠%.

وتتقسم العصارة الصفراوية إلى صفراء الكبد وصفراء الحويصلة المرارية وذلك لأختلاف نسبة المركبات بكل منها.

وتتكون الصفراء بوجه عام من الماء والبروتين والأحماض الصفراوية (حمض الكوليك (Cholic acid) والليثوكوليك (Lethocholic) الديهيدركسيكوليك (Dehydroxy Cholic) والجليسن (Glycine) والتايورين (Taurine) والأملاح الصفراوية (الصبغات وأهمها مجموعة الهيموجلوبين والبيلفردين (Biliverdine) والبيلروبين (Bilirubin) والأحماض الدهنية والكوليسترول ومواد عضوية وغير عضوية (PO_4, CL) والأنزيمات.

ويخلق بالكبد أساسا والطحال حيث تنتقل الكمية المخلقة بالطحال للكبد عن طريق الدم وتسمى بالبيلروبين الحر (الغير مباشر : Free (Indirect) bilirubin) أو ترتبط بحمض الجليكورونيك وتخزن بالصفراء وتسمى بالبيلروبين المرتبط (المباشر Conjugated or direct Bilirubin) وتنتقل للأمعاء فى العصارة الصفراوية فتتحول بجراثيم الأمعاء إلى مولد اليوروبلين (اليوروبلينوجين Uroblinogen) تطرح معظمها بالبراز مع الفضلات والباقى يطرح بالدم فالبول.

وتبنى فكرة تقديرها على ازدواج البيلروبين مع حمض السلفانيليك ثنائى الآزيد (Di azotized Sulfanilic) فى وجود الكافيين (Caffeine) ليعطى صبغة الآزو (Azo dye) عند تقدير البيلروين الكلى أو المباشر يستخدم محلول ملحى صبغى بدلا من الكافيين.

٣-٣-٤-١-تقدير البيلروبين الكلى (Determination of Total Bilirubin) :

بأنبوب جاف يوضع ٠,٢ ملل محلول حمض السلفانيك (٣١مليمول / لتر) و٠,٢ ملل محلول حمض الهيدروكلوريك ٠,٢ ع. ثم يضاف نقطة محلول نيتريت الصوديوم (Sod. nitrite) بتركيز ٢٨ ملليمول ثم يضاف ١ ملل من محلول الكافيين (٢٨ ملليمول / لتر) وبنزوات الصوديوم (٠,٥٥ مول /

لتر)، ثم ٠,٢ ملل سيرم أو بلازما ويحضن ٢٠-٢٥ م /١٠دقائق ثم ترفع من الحمام ويضاف إليها ١ ملل طرطرات صوديوم وبوتاسيوم (٠,٩٩ مول /لتر) وأيدروكسيد الصوديوم ٠,٢ ع ثم تحضر مرة أخرى /٥دقائق ثم ترفع وتقرأ كثافتها الضوئية على طول موجى ٥٧٨ ثم تطرح منها قيمة عينة البلانك (المجهزة كما سبق عدا إضافة نقطة نتريت الصوديوم).

محتوى البيلروبين الكلى (TBC) ملليج /لتر = امتصاص العينة × ١٠,٨

٣-٣-٤-٢-تقدير البيلروبين المباشر (Determination of Direct bilirubin) :

فى أنبوب جاف يوضع ٠,٢ ملل من محلول حمض السلفانيك (٣١ ملليمول /ل) وحمض الهيدروكلوريك ٠,٢ ع ثم تضاف نقطة من محلول نيتريت الصوديوم (٢٨ ملليمول / ل) ثم ١ ملل كافيين (٠,٢٨ مول/لتر)، وبنزوات الصوديوم ٠,٥٥ مول/لتر ثم يضاف لمحتوى الانبوب ٢,٠ ملل كلوريد صوديوم ٠,٩ % ثم ٠,٢ ملل سيرم (او بلازما) ثم تحضن فى حمام مائى ٢٠ ــ٢٥ م/٥ دقائق. ترفع الانبوب ويقرأ الامتصاص على طول موجى ٥٤٦ نانوميتر.

محتوى البيلروبين المباشر (DB.C ملليج/لتر) = الامتصاص × ١٤,٤

ويلاحظ بالعينات المركزة ان يتم التجفيف بكلوريد الصوديوم ٠,٩ % يضرب التركيز فى معامل التخصيص .

٣-٣-٥- تقدير محتوى اليوريا فى الدم (Determination Blood Urea Content) :

يتم تقدير اليوريا الناتجة من عمليات تمثيل البروتينات فى انسجة الجسم بملامستها بانزيم اليورينيز فتتحول لكربونات امونيوم تقدر بكاشف نسلر وتعطى لون برتقالى محمر تتناسب شدته مع تركيز كمية الامونيا (اليوريا فى الدم) وبالتالى فاعلية (نشاط) الأنزيم وتتلخص خطوات تقديرها فى :

بأنبوب جاف يؤخذ ٠,٥ ملل دم مضاف إليه مانع للتجلـــط (أو ٠,٥ ملل مصل) ثم تضاف قطرتين من معلق أنزيم Urease وتـــرج جيـدا أو تترك ١٥ دقيقة بجو المعمل.

يضاف ٠,٥ ملل تنحسنات صوديـــوم ١٠% ثـم ٠,٥ ملـل حمـض كبرتيك ٣/٢ ع ثم ٣٥ ملل ماء فقط ثم يرج الأنبوب جيدا ويترك لدقيقتين ثم يرشح وتؤخذ ٠,٥ ملل من الطبقة الرائقة ثم يضاف ٠,٥ ملل كاشـف نسلر(والمحضر باذابة ١٥ جم يوديـد الزئبـق و١٠ جـم مـن يوديـد البوتاسيوم إلى ١٥ ملل ماء وترج جيدا ثم يضاف ٨٠ ملل هيدروكســيد صوديوم ٥٠% ثم يكمل حتى ٥٠٠ ملل ماء ويترك ٢٤ ساعة ثم يرشـح ثم تقاس شدة الأمتصاص مباشرة أما بالنسبة للأنبوب العيارى يؤخـذ ٠,٥ ملل من المحلول العيارى والمحتوى على ٠,٠٢٥ ملليج وبالنسبة للأنبـوب البلانك فيحتوى على الماء ثم ينفذ بهما ما سبق بالترتيب

كمية اليوريا بالملليجرام/ ١٠٠ ملل مصل =

$$\frac{\text{الكثافة الضوئية للعينة} \times ٠,٥ / ٠,٠٢٥ \times ١٠٠}{\text{الكثافة الضوئية للعيارى}}$$

ويبلغ تركيز اليوريا بالدم الطبيعى ٢٠-٤٠ ملليج / ١٠٠ ملل ســـيرم فى حين يبلغ تركيز اليوريا بالبول ٢٠-٣٥ جم /

أما عند التسمم خاصة بأملاح الزئبق أو السموم المؤديـــة لأحتبـاس البول أو لتأثر الكليتين بالسموم (التهاب الكلية : Nephrosis) يرتفع تركيزها كثيرا.

أو تقدر كربونات الأمونيوم الناتجة بالتفاعل مع الفينول وهيبوكلوريت فيتكون معقد أزرق اللون تتناسب كثافة مع تركيز الأمونيا (كمية اليوريـا بالدم) أى مع نشاط الأنزيم فيؤخذ ٠,٠٢ ملل مصل ثم يضاف إليـها ٠,٢ ملل محلول منظم للأنزيم (١٥٠ ملليج أنزيم فى ١٠٠ ملل مـــن محلـول ١% أثيلين داى أمين رباعى الخليك فى المـــاء (pH: ٦,٥) (Ethylene di amic tetra acetic acid) ثم توضع الأنبوبة فى حمام ٣٧° م / ١٥ دقيقة ثـــم ترفع ويضاف إليها ٥ ملل فينول نيتروبروسيد الصوديوم (باذابة ٥٠ جـم فينول، ٠,٢٥ جم نيتروبروسيد الصوديوم فى لتر مـــاء ويخفـف عنـد الأستعمال بنسبة ١:٥) وترج ثم يضـــاف إليـها ٥ ملـل مـن كاشـف الهيبوكلوريت (باذابة ٢٥ جم هيدروكسيد صوديوم و ٢,١ جم هيبوكلوريت الصوديوم فى لتر ماء ويخفف عنـــد الأستعمال ١ : ٥) وتـرج جيـدا

ويوضع بالحمام ٣٧°م / ١٥ دقيقة ثم تخرج وتقاس شدتها اللونية على طول موجى ٦٣٠ نانوميتر فى حين تؤخذ أنبوبة المحلول القياسى والمحتوية على ٠,٠٢ ملل يوريا (٠,٠٢ ملليج) وتؤخذ إنبوب البلانك ويوضع بها ٠,٢ ملل محلول منظم أنزيم.

كمية اليوريا بالملليج/١٠٠ ملل مصل =

١٠٠ x ٠,٠٢/٠,٠٢ x الكثافة الضوئية للعينة

الكثافة الضوئية للعيارى

أو تقدر اليوريا بتسخينها مع داى أسيتيل (CH_3-CO-CO-CH_3) وتعطى مركب ملون تقاس شدته الضوئية والمتناسبة مع تركيز اليوريا (مع نشاط الأنزيم) فيؤخذ ٠,١ ملل مصل ثم يضاف إليه ٣٣ ملل ماء ثم ٠,٣ ملل محلول تحسينات صوديوم ١٠% ثم يضاف ٠,٣ ملل محلول حمض كبريتيك (٣/٢ نطاقى) وترج جيدا وترشح.

ويؤخذ من الراشح ١ ملل ويضاف إليه ١ملل ماء ثم ٠,٤ ملل من محلول أحادى اكسيم داى أسيتيل (٢% داى أسيتيل مونوأكسيم فى حمض الخليك المركز ثم يكمل الحجم إلى ١٠٠ ملل ماء) ثم ١,٦ ملل من مزيج حمض الكبريتك والفوسفوريك (١٥٠ ملل حمض فوسفوريك ٨٥% إلى ١٤ ملل ماء ثم يضاف ٥٠ ملل من حمض كبرتيك مركز ويمزج جيدا ويبرد تحت الماء) وترج جيدا ثم يوضع الأنبوب فى حمام مائى يغلو / ٣٠ دقيقة ثم يبرد وتقرأ شدتها اللونية عند طول موجى ٤٨٠ نانوميتر مقابل البلانك المحتوى على الماء فى نفس الوقت يتم عمل أنبوب قياسى لليوريا وتقاس (١ملليج / ٢٠٠ ملل ماء فينتج محلول يحتوى ١ ملل منه على ٠,٠٢١٥ ملليج يوريا).

كمية اليوريا /١٠٠ ملل مصل =١٠٠ x ٠,١٢٥ / ٠,٠٢٥ x الكثافة الضوئية للعينة

الكثافة الضوئية للقياسى

= ٥٠ x الكثافة الضوئية للعينة

الكثافة الضوئية للقياسى

٣-٣-٦-تقدير محتوى الكوليستيرول فى مصل الدم (Determination of Cholesterol Content)

يشكل الكوليسترول بالدم أحدى أقسام الليبدات الهامة بمصل الدم (الليبدات والجليسريدات الثلاثية والأحماض الدهنيةوالفوسفوليبيدات و

الفوسفاتيدات و ألفا وبيتا ليبوبروتين) والمتمتع بأهمية تشخيصية عظمى للتعرف على العديد من الحالات المرضية خاصة لوظائف الكبد والكليتين عقب تعرضهم للسموم.

ويبلغ محتوى الكوليسترول الكلى بالمصل ١٥٠ - ٢٥٠ ملج / ١٠٠ ملل دم بينما الكوليسترول والاثيرى (المرتبط) ٩٠-١٣٥ ملج / ١٠٠ ملل والحر ٤٠-٧٠ ملج / ١٠٠ ملل دم.

ويرتفع محتوى الكوليسترول بالدم عند اليرقان الأنسدادى (أنسداد مجارى الصفراء) لتأثر وظيفة الكبد عقب التسمم أو عند ألتهاب الكليتين أو تصلب الشرايين فى حين يتناقص بصفة عامة عند مرض الكبد (خاصة الكوليسترول الأثيرى فى الدم) ، وكلما تناقص أنخفضت وظيفة الكبد.

٣-٣-٦-١-تقدير محتوى الكوليسترول الكلى والحر بطريقة الديجيتونين) Digitonin)

حيث يؤخذ ١ ملل مصل أو بلازما ويضاف إليها ١٠ ملل من مزيج الأسيتون والأيثانول (١:١) وتسخن حتى الغليان بلطف ثم ترفع وترج دقيقتين ثم يضاف ١٠ملل أخرى من المزيج وتعاد للغليان ثم تخرج ويكمل الحجم حتى ٢٥ ملل بالمزيج ويؤخذ ٥ ملل من المحلول السابق (المحتوى على ٠,٢ ملل) ويضاف له قطرتين من حمض الخليك ١٠% ثم ٢,٥ ملل محلول ديجيتونين ٠,٠٥% فى الكحول (باذابة ٥٠٠ ملج ديجيتونين / ١٠٠ ملل ايثانول دافىء ٦٠ °م) وترج وتترك ليلة والأنبوب مغلق وتطرد فى الصباح مركزيا ٣٠٠٠ لفة / د / ١٥ دقيقة حيث يؤخذ الطبقة العليا لأنبوب أخر ويوضع فيها ٤ ملل مزيج الاستيون و الايثير (١ : ٢) وتطرد كما سبق وتهمل الطبقة العلوية ثم يؤخذ الراسب الجاف ويوضع بماء ساخن ٤٠-٥٠ °م ثم تخرج وتكون جاهزة للتفاعل الملون، حيث يؤخذ ٢,٥ ملل من مزيج الاسيتون والإيثانول وتضاف نقطتين هيدروكسيد بوتاسيوم ١٠ عيارى وترج وتغلق وتوضع بحمام مائى ٣٧ °م /٣٠ دقيقة ثم تبرد ويكمل الحجم إلى ٥ ملل بالمزيج وترج ثم تضاف قطرة فينول فيثالين وتعادل القلوية بمحلول حمض الخليك ١٠% وببطىء حتى أختفاء اللون الأحمر ثم تضاف نقطتين حمض زيادة ثم ٢,٥ ملل ديجتيونين وترج وتترك ليلة ثم تجرى عمليات الفصل والغسل كما بالمرة السابقة فتحصل على راسب جاهز للتفاعل الملون.

لكل من الأنبوبتين يضاف ٢ ملل حمض خليك ليحل الراسب جيدا ومع التسخين الهادى فى حمام مائى لتمام النوبان ثم تخرجا ويضاف ١ ملل من مزيج أندريد الخليك (٢٠ ملل أندريد حمض الخليك إلى ١ ملل حمض الخليك إلى ١ ملل حمض كبرتيك مركز) ترج /٣٠ دقيقة ثم توضع فى حمام مائى ٢٥° م وبعد بضع دقائق يضاف لكل منهما ٤ ملل من المزيج السابق وتخلط جيدا أو تستمر فى التسخين على درجة ٢٥° م وتترك بالظلام ٣٠ دقيقة ثم تقاس على طول موجى ٦٢٠ نانوميتر بينما يقاس الأنبوب القياسى المحتوى على ٢ ملل من المحلول القياسى للكوليسترول (٠,٢ ملج) أما أنبوب البلانك فيؤخذ منه ٢ ملل حمض خليك مركز ، ٤ ملل مزيج أندريد الحمض الخليك و الكبرتيك وتقرأ سريعا.

محتوى الكوليسترول الكلى بالملج / ١٠٠ ملل مصل =

١٠٠×١/١,٠×٠,٢× الكثافة اللونية لأنبوب العينة / الكثافة اللونية لأنبوب القياسى × ٢٠٠ × الكثافة اللونية لأنبوب العينة / الكثافة اللونية لأنبوب القياسى

محتوى الكوليسترول الحر بالكلى بالملج / ١٠٠ ملل مصل =

١٠٠×١/٢,٠×٠,٢× الكثافة اللونية لأنبوب العينة / الكثافة اللونية لأنبوب القياسى × ١٠٠ × الكثافة اللونية لأنبوب العينة / الكثافة اللونية لأنبوب القياسى

٣-٣-٦-٢-٢-طريقة واتسون لتقدير الكوليسترول لونيا :

حيث تبنى أساس فكرة التفاعل على تكوين معقد ملون مع أندريد حمض الخليك و الكبريتيك المركز وذلك بوضع ٠,١ملل ماء مقطر بأنبوب ثم ٢,٥ ملل محلول أندريد حمض الخليك وحمض الخليك ٣,٥ مول/لتر (حيث يؤخذ ٣٣ملل اندريد حليك كثافة ١,٠٨ ووزن جزئى ١٠٢,٠٩ وتذاب فى ١٠٠ملل ماء فقط) ويحضر حمض الخليك ٥ مول/لتر (٣٣ملل مول/١٠٠ملل) ثم تضاف وترج جيدا وتعد كأنبوب بلانك.

يوضع ٠,١ ملل من محلول كوليسترول قياسى (من محلول ٢٠٠ ملج/لتر) ثم يضاف اليها ٢,٥ ملل من محلول أندريد الخليك وتعد كأنبوب قياسى وبأنبوب ثالث يوضع ٠,١ ملل سيرم ثم ٢,٥ ملل اندريد حمض الخليك لعينة مناسبة. ترج الأنابيب الثلاثة جيدا وتوضع فى حمام مائى على درجة ٢٥° /٥ دقيقة. يضاف بحرص على الجدران ٢/١ ملل

حمض كبريتيك مركز ثم ترج وتترك لتبرد بحمام مائى /١٥ دقيقة ثم تقرأ الكثافة اللونية :

تركيز الكوليسترول مللج/ل = امتصاص العينة × ٢٠٠
امتصاص القياس

٣-٣-٦-٢-٣-تقدير الكوليسترول الكلي بطريقة كلوريد الحديديك :

فتبنى فكرتها على ترسيب البروتين ثم تفاعل الكوليسترول مع كلوريد الحديديك وفى وجود كثافة عالية من الكبريت يتكون لون بنفسجي يتناسب كثافته مع كمية الكوليسترول حيث يوضع فى أنبوب ٠,١ ملل مصل ثم يضاف اليها ٩.٩ ملل كلوريد حديديك (باذابة ٠,٠٥ جم/١٠٠ملل حمض خليك) وترج جيدا ثم توضع فى حمام مائى /٣دقائق ثم ترشح ويؤخذ من الراشح ٥مل ثم يضاف اليها ٣ملل حمض كبريتيك مركز وترج جيدا وتترك ٥ دقائق ثم تقاس شدة الامتصاص للون البنفسجي المتكون على طول موجي قدرة ٥٦٠ نانوميتر وبأنبوب اخر قياسي يؤخذ١ ملل فى محلول الكوليسترول القياسى (١٠ مللج/ ١٠٠ ملل كلورفورم حيث يحتوى ١ ملل على ٠,١ مللج كوليسترول) وتوضع بحمام مائى حتى الجفاف ثم يضاف اليها ٥ ملل كلوريد حديديك فى الخليك وترج جيدا ثم يضاف ٣ ملل حمض كبريتيك مركز وتترك ١٠ دقائق ثم يقاس اللون .أما انبوب البلانك فيحتوى على ٥ ملل كلوريد حديديك فى الخل و ٣ ملل حمض كبريتيك مركز .

محتوى الكوليسترول/١٠٠ ملل مصل = ١٠٠ × ١ × ٠,١
٠,٠٠٥

= ٢٠٠ ×الكثافة اللونية لأنبوب العينة
الكثافة اللونية لأنبوب القياسى

٣-٣-٦-٢-٤- طريقة ليبرمان لتقدير الكوليسترول الكلى :

حيث تبنى فكرتها على ترسيب البروتين أولا بحمض (S alfo salicylic) المذاب فى حمض الخليك المركز ثم يتفاعل الكوليسترول مع أنdrيد حمض الخليك فى وجود حمض الكبريتيك المركز معطيا لون اخضر مزرق حيث يؤخذ ٠,٢ ملل مصل ويضاف اليه ١ ملل حمض السلفوساليسيليك (Salfo salicylic) (و المجهز بأذابة فى ١٢ جم من الحمض فى ٢٥٠ ملل حمض خليك ثلجى) ثم ٣ ملل اندريد حمض الخليك ويرج جيدا ويوضع فى حمام مائى بارد ثم يضاف اليه ٠,٥ ملل حمض كبريتيك مركز ويرج جيدا ثم يعاد للحمام مرة اخرى بمكان مظلم

/٢٠ دقيقة وتقاس شدة اللون المتكون (أخضر مزرق) على طول موجى ٦٣٠ نانوميتر ، أما الأنبوب القياسى فيؤخذ ٠,٢ ملل من المحلول القياسى والمحضر باذابة ٢٠٠ ملليجرام/١٠٠ حمض خليك أى أن ١ ملل يحتوى على ٢ ملليجرام ويكمل كما سبق . أما الانبوب البلانك فيؤخذ ١,٢ ملل من حمض الثيوساليسيليك، ٣ ملل اندريد الخليك ملل حمض الكبريتيك المركز .

محتوى الكوليسترول ملليجرام / ١٠٠ ملل مصل =

١٠٠ × ١,٠ × ٠,٤ × الكثافة اللونية لأنبوب العينة

الكثافة اللونية لأنبوب القياسى

= ٢٠٠ × الكثافة اللونية لأنبوب العينة

الكثافة اللونية لأنبوب القياس

٣-٣-٦-٢-٥ - تقدير محتوى الكوليسترول الكلى

حيث تبنى أساس فكرتها على تفاعل الكوليسترول مع حمض الخليك الثلجى وأندريد حمض الكبريتيك فيؤخذ ٦ ملل من جوهر الخليك الثلجى وأندريد حمض الكبريتيك المركز (١: ٢: ١) بأنبوب ثم يضاف اليها ٠,٣ ملل مصل وترج جيدا وتترك بمكان مظلم ٢٠/ د ثم تقاس كثافة اللون الاخضر المتكون على طول موجى ٦٥٠ نانوميتر . ويجهز انبوب قياسى بأخذ ٠,٣ ملل من المحلول (المجهز باذابة ١٠٠ ملليجرام كوليسترول /١٠٠ ملل حمض خليك والمحتوية على ٠,٣ ملليجرام كوليسترول) ويضاف اليها ٦ ملل من الجوهر السابق وتوضع بمكان مظلم بعد الرج لمدة ٢٠ دقيقة ثم تقاس على طول موجى ٦٥٠ نانوميتر. ويؤخذ بانبوب بلانك ٠,٣ ملل حمض خليك ثم يضاف ٦ ملل من الجوهر وترج جيدا وتوضع بمكان مظلم ثم تقاس على طول موجى ٦٥٠ نانوميتر.

محتوى الكوليسترول (ملليجرام /١٠٠ ملل مصل) =

١٠٠ × ١,٠ × ٠,٣/٠,٣ × الكثافة اللونية لأنبوب العينة

الكثافة اللونية لأنبوب القياس

= ١٠٠ × الكثافة اللونية لأنبوب العينة

الكثافة اللونية لأنبوب القياس

٣-٣-٦-٢-٦-تقدير محتوى السيفالين كوليسترول بالمصل :

حيث يؤخذ ٠,٢ ملل مصل حديث بأنبوب ويضاف اليه ٤ ملل مصل فسيولوجى (كلوريد صوديوم ٠,٩ %) . ثم ١ ملل مستحلب سيفالين كوليسترول (المجهز باذابة ١٠٠ ملليج سيفالين ، ٣٠٠ ملل كوليسترول فى ٨ ملل اثير) ثم يؤخذ ١ ملل منه ببطىء مع الرج المستمر الى ٣٥ ملل ماء مقطر مسخن لدرجة ٦٥ - ٩٠ درجة مئوية ثم يسخن ببطىء للغليان ويترك ليصير حجم ٣٠ ملل فيظهر مستحلب شفاف راق ثم يبرد لدرجة حرارة المعمل ويرج جيدا ويترك ٢٤ - ٤٨ ساعة بالظلام فتلاحظ عكارة (فى حالة التهاب الكبد أوتندهن الكبد لتغطى) .

٣-٣-٧-محتوى السكر بالدم(Determination of Glucose content):

تشكل النسبة المئوية الجلوكوز بالدم أعلى نسبة للسكريات الموجودة حيث يكون الكبد مصدرة الوحيد لتفكك الجليكوجين (الجليكلية Glycolysis) تفككا مائيا بملامسة انزيم الفوسفوريليز (Phosphorylase) (حيث تبيلغ ٦٥ - ٩٥ ملليجم /١٠٠ ملل دم بشرى). وتبنى فكرة التقدير على أساس تفاعل السكريات الالدهنية مع الاورثوتولودين بعد ترسيب البروتين الكلى فيعطى محلول ازرق مخضر يثبت بأضافة الثيويوريا ($Thiourea : NH_2 -S- NH_2$) فى نفس الوقت تمنع حدوث أكسدة الأمين بالهواء الجوى حيث يؤخذ ٠,٦ ملل دم ويضاف اليه ٥٠٤ ملل ترای كلورو استيك (٣%) وترج جيدا وبعد ١٠ دقائق تطرد مركزيا ٥٠٠ لفه/د. ثم يؤخذ ١ ملل (او ملل دم) ويضاف اليه الأورثوتولويدن (١,٥ جم ثيوريا فى ٩٤٠ ملل حمض خليك ثلجى ثم ٦٠ ملل أورثوتولويدين وترج وتحفظ بزجاجة بنية معتمة ٥ يوم قبل الاستعمال ويبقى صالح للاستعمال ٥ شهر) ثم تسخن الانبوب ١٠ دقائق فى حمام مائى لتكون اللون الذى يقاس على ٦٥٠ نانوميتر ، ويقاس كذلك البلانك المحتوى على ١ ملل ماء مقطر و الأنبوب القياسى المحتوى على ٠,١ ملليج جلوكوز

كمية السكر بالملليج /١٠٠ ملل دم =

١٠٠ x ١,٠ x ٠,١/٠,١ x الكثافة الضوئية لأنبوب العينة

الكثافة الضوئية لأنبوب العيارى

= ١٠٠ x الكثافة الضوئية لأنبوب العينة

الكثافة الضوئية لأنبوب العيارى

٣-٣-٧-١- بطريقة فولين :

تبنى فكرتها على أساس ترسيب كبريتات النحاس بصورة اكسيد نحاس بوسط قلوى بعد ترسيب البروتين حيث يتفاعل مع حمض فوسفوموليبديك فيتكون معقد ازرق يتناسب شدته كثافة طرديا مع التركيز لأكسيد النحاس وتتناسب طرديا في نفس الوقت مع تركيز السكر بالدم حيث يؤخذ بأنبوب سبق غسله بمحلول كلوريد صوديوم مخفف لمنع حدوث التحلل ٠,٥ ملل دم أو مصل ثم يضاف اليها ٣,٥ ملل ماء ثم ٠,٥ ملل تنجستات الصوديوم (١٠%) ثم ٠,٥ ملل حمض كبريتيك ترج جيدا وتترك وتترشح . ثم يؤخذ منها ١ ملل من الراشح (٠,١ ملل دم) ثم يضاف اليها ١ ملل كبريتات نحاس قلوية (أ) ٥٠ جم كربونات صوديوم لامائية ، ٥٠ جم طرطرات ، ٤ جم بيكربونات صوديوم ، ٤٠٠ جم كربونات صوديوم فى لتر ماء وتذاب جيدا ثم تكمل الى ٢ لتر ماء ، (ب) ١٥٠ جم كبريتات نحاس مائية تذاب فى الماء ويكمل الحجم الى لتر ثم يضاف ٠,٥ ملل حمض كبريتيك مركز حيث يؤخذ ٤ ملل من (أ) وتكمل للتر من (ب) وترج الأنبوب جيدا ثم توضع بحمام مائى /٧ دقائق ثم تخرج وتبرد وتضاف اليها ١ ملل حمض فوسفوموليبديك (٣٥ جم من حمض الموليبديك و ٥ جم تنجستات صوديوم فى ٢٠٠ ملل هيدروكسيد صوديوم (١٠ %) ثم يضاف إليها ٢٠٠ملل ماء وتغلى على النار ٣٠-٤٠ دقيقة لطرد النشادر ثم تبرد وتنقل لدورق معيارى ٥٠٠ ملل ثم يضاف ١٢,٥ ملل حمض فوسفوريك كثافة ١,٧٥ ثم يكمل الحجم بالماء المقطر حتى ٥٠٠ ملل ثم يعاد للحمام المائى/٣دقيقة ثم تبرد ويضاف ١٠٠ملل وترج بشدة ويقاس اللون على طول موجى ٤٢٠ نانوميتر (مقابل البلانك المحتوى على الماء المقطر والأنبوب العيارى المحتوى على ٠,١ ملليج جلوكوز).

كمية الجلوكوز ملليج/١٠٠ملل دم =

$$= \frac{\text{الكثافة اللونية للعينة}}{\text{الكثافة اللونية للعيارى}} \times ٠,١ \times ٠,١/٠,١ \times ١٠٠ = \frac{\text{الكثافة اللونية للعينة}}{\text{الكثافة اللونية للعيارى}} \times ١٠٠$$

٣-٣-٧-٢-طريقة تقدير الجلوكوز أنزيميا :

حيث تجرى بأكسدة الجلوكوز بإنزيم جلوكوز أكسيديز (COD) فينتج حمض الجلوكونيك (Gluconic acid) وفوق أكسيد الهيدروجين (H_2O_2).

$$\text{Glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{GOD}} \text{Gluconic acid} + H_2O$$

$$H_2O + \text{4- AP} + \text{phenol} \xrightarrow{\text{POD}} \text{4-(P-benzoquinone monoimino) Phenozone}$$

حيث ناتج الأكسدة المزدوج يعطى لون القراولة الأحمر الثابت والمقاس على طول موجى ٥٠٥ نانوميتر . فيؤخذ ٠,٤ ملل كبريتات زنك ٥% ثم ٠,٤ ملل هيدروكسيد صوديوم ٠,٣ عيارى ثم ٠,١ ملل كلوريد صوديوم ٠,٩% وتزج جيدا ثم يضاف ٠,١ ملل دم وتزج جيدا وترشح (أو تطرد مركزيا). ثم يؤخذ ١ ملل من الطبق الرائقة (الراشحة) ويضاف إليها ٣ ملل من محلول دسكول الأنزيم GOD [المجهز بإذابة ٠,٥ جم من مستحضر الأنزيم الجاف فى ٨٠ملل من محلول منظم (pH=5) حيث يؤخذ ٣ جم حمض الخليك ، ٠,١٥ مول + ٧جم ٠,١٥ مول خلات صوديوم ، ١٧,٧ جم خلات صوديوم فى لتر ماء مقطر] ثم يضاف إليها ٥ ملل من محلول الأنزيم (المجهز بإذابة ٢٠ ملج بلورات المستحضر الأنزيمى فى ١٠٠ ملل من محلول المنظم السابق وترج جيدا ثم يضاف إليها ١ ملل أوزثوتولويدين ويكمل الحجم إلى ١٠٠ ملل بمحلول مقطر). ثم تقرأ الكثافة اللونية بعد ١٠ دقائق على طول موجى ٦٢٥ نانوميتر مقارنة بالأنبوب القياسى (١ملل جلوكوز ٠,١ ملل فى محلول حمض البنزويك ٠,٣%) مقارنة بالبلانك المحتوى على الماء.

$$\text{كمية الجلوكوز (ملج/١٠٠ملل دم)} = \frac{\text{الكثافة اللونية لأنبوب العينة}}{\text{الكثافة اللونية للأنبوب القياسى}} \times ٠,١/١ \times ١٠٠$$