جامعة الشام الخاصة

كلية الصيدلة

الكيمياء الحيوية السريرية

القسم العملي

د. رغد الفيصل

د. سوسن أختريني

المحاضرة الأولى

اختبارات تقصّى وظائف الجهاز البولي Urinary system

فحص البول والراسب

يتألف الجهاز البولي أو الجهاز الكلوي renal system أو السبيل البولي urinary tract من الكليتين kidneys والحالبين ureters والمثانة bladder والاحليل urethra.

وظيفة الجهاز البولي

- التخلص من سموم الدم
- تنظيم حجم وضغط الدم
- التحكم بمستويات الشوارد والمستقلبات المنحلة
- تنظيم p H الدم

وذلك عن طريق إفراز البول

تتألف الكلية من وحدات وظيفية تدعى النفرونات nephrons، والتي تقوم بتنظيم كمية الماء والمواد المنحلة متل الصوديوم عن طريق الترشيح الكبيبي وإعادة الامتصاص النبيبي.

فحص البول والراسب البولي

يتشكل البول في الكلية عبر ترشيح الدم، ومن ثم يُخزن في المثانة لحين التبول، وهو أحد سوائل الجسم البيولوجية الهامة.

يُعدّ فحص البول فحصاً **هاماً وبسيطاً** من حيث إجراءه، فهو لا يعكس الأمراض الكلوية فقط وإنما يشير إلى كثير من الأمراض غير الكلوية.

أنواع عينة البول

Types of urine sample

Sample type	Sampling	Purpose
Random specimen	No specific time most common, taken anytime of day	Routine screening, chemical & FEME
Morning sample	First urine in the morning, most concentrated	Pregnancy test, microscopic test
Clean catch midstream	Discard first few ml, collect the rest	Culture
24 hours	All the urine passed during the day and night and next day Ist sample is collected.	used for quantitative and qualitative analysis of substances
Postprandial	2 hours after meal	Determine glucose in diabetic monitoring
Supra-pubic aspired	Needle aspiration	Obtaining sterile urine

يشمل فحص البول والراسب مايلي:

1. الفحص العياني macroscopic test: يستقصي الصفات الفيزيائية للبول.
2. الفحص الكيميائي chemical test: تقدير مكونات البول الكيميائية.
3. الفحص المجهري microscopic test: تعداد الخلايا + فحص الرواسب البولية.

<u>أولا</u>: الفحص العياني للبول

a. لون البول: اللون الطبيعي للبول أصفر كهرماني (شاحب أو غامق) بسبب وجود عدة أصبغة منحلة في البول، مثل اليوروبيلين واليوروبيلينوجين والبرفرينات والأندوكسيل واليوروكروم.
يتغير لون البول لعدة أسباب: إما غذائية أو دوائية أو إصابات جرثومية، كما أن حجم البول يؤثر عى شدة تلون البول.
أمثلة: - أزرق الميثيلين يلون البول باللون الأزرق المخضر.
- وجود الهيموغلوبين والميوغلوبين والكريات الحمر والبرفرينات تلون البول بلون أحمر برتقالي أو وردي أو أحمر بني غامق
- الشوندر والتوت الأحمر يلون البول باللون الأحمر
- الميثيل دوبا يلون البول بلون أحمر بني أو مسود

b. مظهر البول appearance: البول السليم حديث الإفراغ رائق صافي (لكن هذا لا يعني أن كل بول رائق هو سوي كحالة البيلة الغلوكوزية)
يتعكر البول لعدة أسباب: - ترسب البلورات والأملاح: الفوسفات- يورات الأمونيوم- الكربونات- حمض البول
- عناصر خلوية: بيلة قيحية (بسبب عداوى الجهاز البولي الجرثومية)
بيلة دموية (نزف في الجهاز البولي)
بيلة جرثومية
خلايا ظهارية: مثانية – احليلية – مهبلية .....

c. حجم البول: - حجم البول السوي 0.5 – 2 ليتر باليوم، ولا يتجاوز البول الليلي 400 مل.
- كمية الوارد اليومي المائي هو المحدد الرئيسي لحجم البول (بالاضافة لعوامل أخرى)

✓ زيادة حجم البول polyuria: يعتر بول بحجم أعلى من 2 ليتر باليوم حالة مرضية ومن أسبابه:
1. أمراض مثل الداء السكري – نقصان هرمون ADH
2. الإفراط بتناول البروتين والأملاح مع الغذاء
3. تناول المدرات والكافيئين والكحول

✓ نقص حجم البول oliguria: إن نقص حجم البول لأقل من 500 مل في اليوم هو حالة غير سوية وقد يصل إلى انعدام البول، ومن أسبابه:
1. حالات التجفاف نتيجة الإصابة بالاسهالات والإقياءات الشديدة
2. الأمراض القلبية والقصور الكلوي الحاد
3. وجود حصاة أو انسداد في مجرى البول وكذلك تشنجات وضيق مجرى البول

d. رائحة البول: وجود بعض الحموض العضوية الطيارة في البول يضفي عليه رائحة عطرية خفيفة، وقد يكتسب البول روائح خاصة عند تناول بعض الأدوية والأغذية.
e. الكثافة النوعية للبول specific gravity: هي نسبة وزن 1 ليتر من البول إلى وزن 1 ليتر من الماء المقطر، تتناسب تناسباً طردياً مع كمية المواد المواد المنحلة في البول.

القيم الطبيعية للأسوياء: 1.016 – 1.022

تساهم البولة وكلوريد الصوديوم والفسفات والسلفات في معظم الكثافة النوعية للبول السوي.

- ✓ تزداد الكثافة النوعية: - نقص تناول السوائل (الصيام)
  - زيادة فقد السوائل (إقياء أو اسهال)
  - بيلة بروتينية أو سكرية أو دموية أو قيحية
  - بعض الحالات المرضية: مرض كبدي – قصور قلب احتقاني
- ✓ تنخفض الكثافة النوعية: - زيادة تناول السوائل
  - التهاب حويضة وكلية، والتهاب كبيبات كلوية

ثانياً: الفحص الكيميائي للبول

- ✓ P H البول: تتراوح درجة p H البول السليم من 4.8 إلى 7.4 ويعزى ذلك إلى وجود الحموض العضوية المختلفة مثل حمض البول وحمض اللبن، تنقص p H البول بحالة الحماض الاستقلابي والحماض السكري، وترتفع إلى قيم أعلى من 7.7 في حالة القلاء الاستقلابي والتنفسي وفي حال تكاثر الجراثيم.
- ✓ الغلوكوز: يظهر في البول عندما تتجاوز مستويات غلوكوز الدم العتبة الكلوية للغلوكوز والبالغة 180 ملغ/دسل.
- ✓ الأجسام الكيتونية: الأستون – حمض الأسيتوأستيك
- ✓ الهيموغلوبين والكريات الحمر: في حال البيلة الدموية
- ✓ البروتينات: في حال البيلة البروتينية
- ✓ الأصبغة الصفراوية: في حال اليرقان

ثالثاً: الفحص المجهري أو فحص الراسب البولي

يعطي البول بعد إفراغه مباشرة أو بعد مدة من تركه راسباً قليلاً أو كثيراً.

وتشمل الرواسب البولية: إما رواسب متعضية أو رواسب غير متعضية

A. الرواسب المتعضية organic:

- ✓ كريات الدم الحمراء: تغيب تماماً في البول السوي، وتظهر في الحالات المرضية التي تسبب البيلة الدموية مثل التهاب السبيل البولي وحصياته وأورامه.
- ✓ كريات الدم البيضاء: يتراوح مقدارها في البول السوي 1 -2 كرية في الساحة، ويزداد افراغها في الأحوال المرضية وتدعى عند ذلك بالكريات القيحية.
- ✓ الخلايا الظهارية epithelial cells: وهي خلايا المسالك البولية، ويصعب معرفة منشئها أحياناً مثل: خلايا الكلية- خلايا الحويضة- خلايا المثانة، وتوحي كثرتها في الراسب البولي بوجود حالة إلتهابية.
- ✓ الأسطوانات casts: عي مادة بروتينية تأخذ شكل النبيبات الكلوية، يفرغ في البول طبيعياً حوالي 10000 اسطوانة في بول 24 ساعة، أي ما يعادل أسطوانة واحدة كل 10 ساحات

مجهرية، وتصنف الأسطوانات تبعاً لمحتواها إلى: أسطوانات الهيالين الشفافة- الأسطوانات الحبيبية (أسطوانات كريات حمر- أسطوانات كريات بيض- أسطوانات خلايا ظهارية)

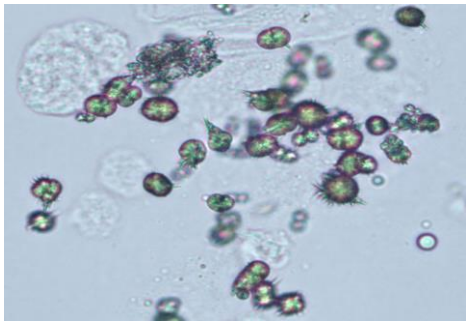
- ✓ الجراثيم: ليست ذات أهمية إذا لم يُجمع البول بطريقة عقيمة.
- ✓ الفطور: يمكن أن تُشاهد بعد تناول الصادات واسعة الطيف لفترة طويلة.
- ✓ الطفيليات والبيوض: المشعرة المهبلية وبيوض البلهارسيا والحرقص.

B. الرواسب غير المتعضية non-organic أو البلورات crystals:

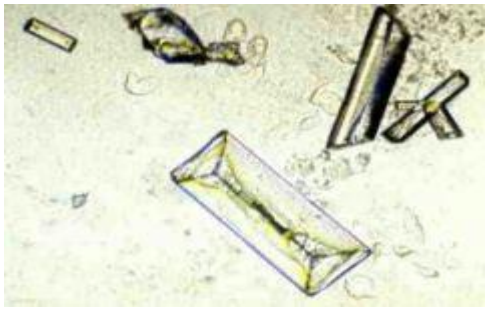
هنالك العديد من البلورات التي يمكن أن تشاهد في البول، سنذكر أكثرها مشاهدة:

- ✓ بلورات حمض البول uric acid: له أشكال متعددة بلون أصفر إلى أحمر آجري، وتوجد في البول حامضي التفاعل.

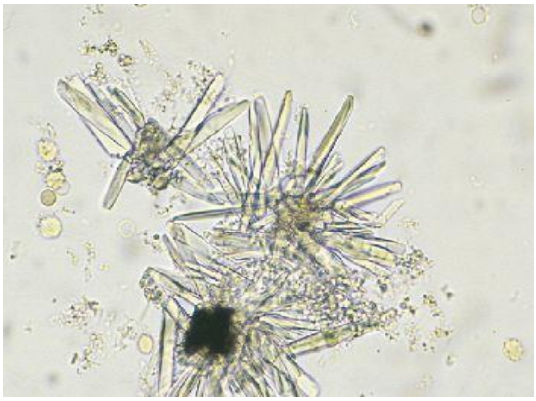
- ✓ بلورات الأمونيوم ثنائية اليورات ammonium biurate: توجد في البول القاعدي الغني بالأمونيا، وتكون قنفذية بلون مسمر.



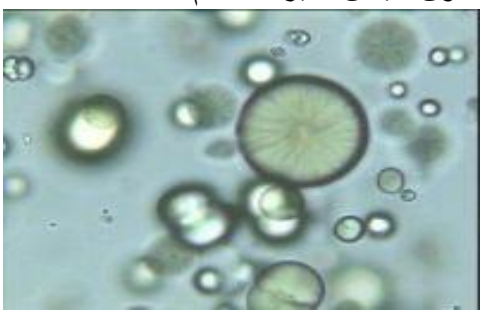
- ✓ بلورات الفوسفات الثلاثية triple phosphate: تظهر في البول قلوي التفاعل، وتكون بشكل بلورات عديمة اللون لها هيئة التابوت أو ورق السرخس، وغالباً ما تشاهد في انتانات السبيل البولي UTI.



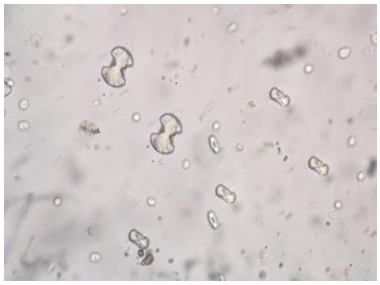
- ✓ بلورات فسفات الكالسيوم calcium phosphate: توجد في البول قلوي التفاعل، تكون بشكل بلورات ابرية موشورية وتضفي على الراسب اللون الأبيض، ولا تشير إلى مرض معين.

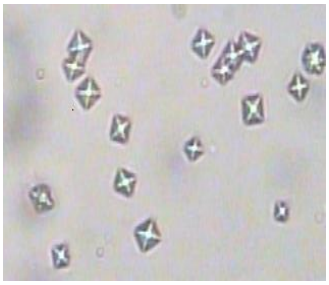


- ✓ بلورات كربونات الكالسيوم calcium carbonate: توجد في البول القلوي، وتكون بشكل حبيبات ذات لون أبيض كبيرة الحجم.



- ✓ بلورات أوكزالات الكالسيوم calcium oxalate: توجد في جميع الأبوال الحامضة والقلوية والمعتدلة، وتوجد بشكلين dihydrate غلاف الرسائل، أو monohydrate: الساعة الرملية ، هذه البلورات عديمة اللون وتتشكل مستقلة عن درجة حموضة البول، ولا تشير إلى مرض معين.





- ✓ هنالك بلورات أقل ندرة: مثل بلورات السيستيئين والتيروزين والكوليسترول.

تقرير الجلسة العملية

ناقش نتائج فحص البول المرفق.

المحاضرة الثانية

اختبارات تقصّى وظائف الجهاز البولي

التصفية الكلوية Renal clearance

حساب التصفية الكلوية للكرياتينين

- ✓ تعريف التصفية clearance: هو قياس حركية دوائية لحجم البلازما التي تتم إزالة مادة منها بالكامل في واحدة الزمن، يعبّر عنها عادة بـ ml/min أو L/h
- ✓ يتم تنقية المواد من الدم عن طريق العديد من الأعضاء: الكبد- الكلية- الرئة ....
- ✓ أغلب المواد الدوائية يتم طرحها عن طريق الإفراز الكلوي، وبالتالي من المهم قياس التصفية الكلوية لمادة ما من أجل تحديد الجرعات الدوائية، وكذلك تقييم سرعة الترشيح الكبيبي (GFR) وعود الامتصاص والإفراز النبيبي.
- ✓ التصفية الكلوية هي وظيفة: 1- الترشيح الكبيبي 2- الإفراز النبيبي 3- إعادة الإمتصاص في النبيبات.
- ✓ يمكن أن تعرّف التصفية بالنسبة لمادة ما: بأنها النسبة بين مقدار ما يُفرغ من هذه المادة بالدقيقة عن طريق البول وبين تركيزها في 1 مل من البلازما. وبالتالي يمكن أن تُحسب التصفية الكلوية باستخدام العلاقة التالية:

$$C_x = \frac{Ux}{Px} V$$

C_x= التصفية الكلوية للمادة X

U_x= تركيز المادة X في البول مقدراً بـ mg/ml

P_x= تركيز المادة X في البلازما مقدراً بـ mg/ml

V= حجم البول المفرغ بالدقيقة مقدراً بـ ml

شروط المادة المستخدمة في تعيين سرعة الترشيح الكبيبي

1. أن توجد في البلازما بشكل محلول حقيقي، أي أنها لا ترتبط مع بروتينات البلازما التي تكون غير قابلة للارتشاح.
2. أن تكون المادة خاملة وغير فعالة دوائياً بحيث لا تؤثر على وظيفة الكلية.
3. أن تكون قابلة للارتشاح تماماً من قبل الكبيبات.
4. ألا يتم إفراز هذه المادة أو يعاد امتصاصها من قبل النبيبات الكلوية.

وعند تحقق جميع هذه الشروط في مادة ما، فهذا يعني أن إفراغ هذه المادة غير مرتبط بتركيزها في الدم أو بحجم البول المطروح.

تتحقق جميع هذه الشروط في مادة عديدة السكاريد هي Inulin ذو الوزن الجزيئي 52 ألف دالتون، وبالتالي تكون سرعة تصفية الإينولين مساوية لسرعة الترشيح الكبيبي وهي تبلغ عند الأسوياء 117 ±16 مل/ د ، إلا أن إجراء اختبار تصفية الإينولين يواجه العديد من الصعوبات عند تطبيقه في المخبر ما دعى لاستبداله باختبارات أخرى من أجل تقييم وظيفة الكلية، مثل اختبار الكرياتينين واليوريا والسيستاتين-c.

تصفية الكرياتينين Creatinine clearance

- ✓ هو حجم البلازما الذي تتم تنقيته من الكرياتينين في واحدة الزمن.
- ✓ هو قياس هام من أجل تقييم GFR
- ✓ يتم إفراغ الكرياتينين بواسطة الترشيح الكبيبي والإفراز النبيبي، إلا أن الكمية المفرزة من النبيبات ضئيلة، ولهذا نلاحظ بأن قيم تصفية الكرياتينين الناتجة أعلى بحوالي 20-25 % من قيم تصفية الإينولين

معايرة الكرياتينين في البول بطريقة لونية Jaffe-reaction

المبدأ: يُشكل الكرياتينين بالتفاعل مع حمض البيكريك في وسط قلوي مركباً بلون أحمر برتقالي تتناسب شدته مع تركيز الكرياتينين في العينة.

Creatinine + picric acid ⟶ creatinine picrate complex

خطوات العمل: لأجل معايرة الكرياتينين في عينة البول، يجب أن يمدد البول أولاً 1+49 بالماء المقطر.

العينة / العياري (2mg/dl)	100 µL
كاشف العمل	1000 µL
امزج واحضن لمدة 30 ثانية، اقرأ الامتصاص A_1. ثم سجل الامتصاص A_2 بعد دقيقتين **تماماً**. $A\ \Delta = A_1 - A_2$	

طريقة الحساب: تركيز الكرياتينين في البول = $\frac{\Delta A\ (sample)}{\Delta A\ (std)}$ 100 [mg/dl]

تصفية الكرياتينين = $\frac{creatinine\ in\ urine\frac{mg}{dl} * urine\ volume\ ml/24h}{creatinine\ in\ serum\frac{mg}{dl} * 1440}$ [ml/min]

القيم المرجعية

- ✓ كرياتينين البول = 1000 – 1500 ملغ/ بول 24 ساعة
- ✓ تصفية الكرياتينين: الذكور = 98 – 156 مل/ د
  الإناث = 95 – 160 مل/ د

تفسير نتائج اختبار تصفية الكرياتينين

عادة ما تترافق قيم كرياتينين دم مرتفعة مع مستوى منخفض من التصفية الكلوية.

- ✓ تنخفض مستويات تصفية الكرياتينين:
  1. داء كلوي مزمن (انتان- انسداد مجرى البول- سرطان- فشل كلوي)
  2. الفشل القلبي
  3. تشمع الكبد

- ✓ ترتفع مستويات تصفية الكرياتينين:
  1. الاذيات العضلية مثل ضمور العضلات dystrophy
  2. قصور الدرق
  3. الحمل
  4. بعد التمارين المجهدة
  5. اتباع حمية منخفضة البروتين
- ✓ حالات تؤثر على نتائج اختبارات التصفية الكلوية:
  1. تناول أدوية تؤثر على مستويات الكرياتينين أو تصفيته مثل: الميثيل دوبا – الفيتامين سي – السيفالوسبورينات – الفينيتوئين – تريميتوبريم.
  2. القيام بمجهود عضلي مفرط خلال يومين قبل إجراء الاختبار
  3. تناول أكثر من 230 غرام من اللحوم خلال 24 ساعة قبل إجراء الاختبار

معدّل تصفية الكرياتينين المقدر estimated Cr clearance rate (ec_{cr})

باستخدام صيغة Cockcroft-Gault: هي علاقة بديلة شائعة الاستخدام من أجل تقدير تصفية الكرياتينين والتي بدورها تقدر GFR

تستخدم هذه العلاقة: قياس كرياتينين الدم ووزن المريض من أجل التنبؤ بتصفية الكرياتينين

$$ec_{cr} = \frac{(140-age)*mass\ (kg)}{72*serum\ creatinine\ (\frac{mg}{dl})} * 0.85 \text{ if female}$$

تقرير الجلسة العملية

احسب تصفية الكرياتينين، وتصفية الكرياتينين المقدرة باعتبار أن:

حجم البول= 1.5 ليتر باليوم

تركيز كرياتينين الدم = 0.75 مغ/ دسل

العمر= 30 عاماً

الجنس= ذكر

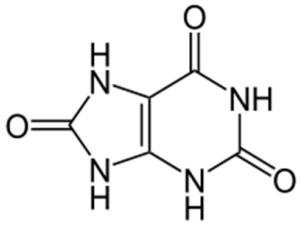
الوزن= 85 كيلوغرام

المحاضرة الثالثة

اختبارات تقصّى وظائف الجهاز البولي

مقايسة حمض البول في الدم

- حمض البول uric acid هو مركب حلقي يملك الصيغة الكيميائية التالية



- يشكل حمض البول أيونات وأملاح تدعى باليورات urates، مثل يورات الأمونيوم الحامضة.
- ينشأ حمض البول من التدرك الاستقلابي لنكليوتيدات البورينات بتواسط انزيم xanthine oxidase والذي يحفز تشكل حمض البول من الكزانتين والهيبوكزانتين.
- يطرح حمض البول عن طريق البول، إذ هو مكون طبيعي من مكوناته.
- تؤدي التراكيز المرتفعة من حمض البول في الدم إلى داء النقرس والذي يتظاهر بترسب بلورات حمض البول في المفاصل والجلد والشعيرات الدموية مسببة ألاماً شديدة، كما تؤدي التراكيز المرتفعة من حمض البول أيضاً إلى تشكيل حصيات كلوية من يورات الأمونيوم الحامضة.

مقايسة حمض البول في الدم بطريقة انزيمية

المبدأ: يُؤكسَد حمض البول انزيمياً بواسطة انزيم uricase إلى ألانتوئين والماء الأكسجيني.

يتفاعل الماء الأكسجيني لاحقاً مع 4-أمينوفينازون وسلفونات ثنائي كلور الفنول بتواسط انزيم البيروكسيداز لتشكيل مركب الكينون إيمين الأحمر، والذي تتناسب شدته مع تركيز حمض البول في العينة.

$$\text{Uric acid} + 2H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{Uricase}} \text{Allantoine} + CO_2 + \mathbf{2H_2O_2}$$

$$2H_2O_2 + \text{4-AP} + \text{DCPS} \xrightarrow{\text{PO}} \text{Quinoneimine} + 4\ H_2O$$

طريقة العمل

1- اضبط الجهاز الضوئي على الصفر بالماء المقطر
2- املأ 3 محافد بالحجوم التالية

	Blank	Std	sample
Working reagent	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Standard(6mg/dl)	——	25 µl	———
Sample	——	——	25 µl

3- امزج واحضن 5 دقائق بالدرجة 37 أو 10 دقائق بالدرجة 15-25
4- اقرأ امتصاص A للعينة والعياريات مقابل الناصع
ملاحظة: اللون ثابت لمدة لا تقل عن نصف ساعة

طريقة الحساب

تركيز حمض البول في العينة (mg/dl) = $\frac{A\ sample - A\ blank}{A\ standard - A\ blank}$ * تركيز العياري (6)

القيم المرجعية

الإناث: 2.5 – 6.8 ملغ/ دسل

الذكور: 3.6 – 7.7 ملغ/ دسل

أسباب ارتفاع حمض البول في الدم

1. مدخول عالي من البورينات في الحمية الغذائية (اللحوم والمأكولات البحرية)، وكذلك المركبات السكرية الغنية بالفركتوز.
2. تناقص إفراز حمض البول عن طريق الكلية كما في الأذية الكلوية المتقدمة.
3. تناول بعض الأدوية مثل مدرات التيازيد والتي يمكن أن تزيد مستويات حمض البول عبر التداخل مع التصفية الكلوية.
4. متلازمة تحلل الورم tumor lysis syndrome وذلك بسبب تحرر الأسس النكليوتيدية والبوتاسيوم من الخلايا السرطانية إلى البلازما.

<u>تقرير الجلسة العملية</u>

- ✓ احسب تركيز حمض البول في العينة المجهولة وقارنها مع القيم المرجعية.
- ✓ كيف يمكن أن تؤثر المركبات السكرية الغنية بالفركتوز على مستويات حمض البول في الدم.

المحاضرة الرابعة

استقصاء وظائف القلب

مقايسة الكرياتين كيناز المصلي

حالة احتشاء العضلة القلبية Myocardial Infarction

يسبب حرمان الخلايا القلبية من الأكسجين زيادة في نفوذية الغشاء الخلوي للعضلة القلبية (بسبب النخر الحادث)، وبالتالي تنتشر البروتينات والانزيمات الموجودة داخل الخلية إلى مجرى الدم، وهذا ما مكّننا من قياس مستويات هذه البروتينات والإنزيمات (الواصمات الحيوية biomarkers) في الدم من أجل التشخيص أو التنبؤ بحجم الأذية الحاصلة

يلخص الجدول التالي أهم الواصمات المتوفرة للمساعدة في تشخيص أذية العضلة القلبية

الواصم	مصدر الواصم وسبب الزيادة	بداية تحرر الواصم والزمن اللازم لعودته إلى مستوياته الطبيعية	المحاسن والمساوئ
التروبونين القلبي Tn	Tn I من قبل الخلايا القلبية فقط Tn T يفرز من الخلايا القلبية والعضلات	يرتفع بعد 4-8 ساعات من الأذية يبقى مرتفعا مدة 14 يوماً	تشخيص النوبة القلبية وحجم الأذية واصم مبكر ومتأخر للأذية معاً
الكرياتين كيناز CK	CK-MB من الخلايا القلبية CK-M من العضلات الهيكلية CK-BB من خلايا الدماغ	يرتفع بعد 4-6 ساعات من الأذية ويصل الذروة خلال 12 ساعة يبقى يوم إلى يومان مالم تتجدد الأذية	واصم مبكر أقل نوعية من التروبونين القلبي
الألبومين المعدل بالإقفار (IMA) Ischemia Modified Albumin	الخلايا القلبية يفرز في حال إقفار القلب	يرتفع خلال ساعات قليلة من حصول الأذية القلبية	واصم مبكر جداً أكثر من التروبونين بحيث يمكن أن يكون إيجابيا بينما لا يزال التروبونين في مستوياته الدنيا يشخص متلازمة القلب الإكليلي

الميوغلوبين	الخلايا القلبية والخلايا العضلية	يرتفع بعد 2-3 ساعات من حدوث الأذية يعود إلى مستوياته الطبيعية خلال يوم واحد بعد الأذية	واصم مبكر جدا يجرى بالترافق مع التروبونين أقل نوعية للقلب ويرتفع في الأذيات العضلية كذلك
AST الأسبارتات أمينو ترانسفيراز	يفرز من الخلايا القلبية والكبدية		ليس نوعياً للعضلة القلبية يجري قياسه لتقييم وظيفة الكبد بالترافق مع ALT
LDH لاكتات ديهيدروجيناز	يطلب في الأذيات القلبية والكبدية والخلايا العضلية وفي السرطانات	يرتفع بعد 24-48 ساعة من الأذية يعود خلال 14 يوماً إلى مستوياته الطبيعية	يفيد لتقدير درجة الأذية النسيجية ليس نوعياً للعضلة القلبية واصم متأخر جدا للأذية القلبية استبدل حالياً باختبار التروبونين

وهنالك اختبارات متممة أو عوامل خطورة للوظيفة القلبية وهي

- ✓ البروتين المتفاعل C عالي الحساسية (hs-CRP)
- ✓ مرتسم الدسم وتضم الكوليسترول الكلي وكوليسترول HDL و LDL والشحوم الثلاثية
- ✓ الفيبرينوجين

الفحوص المخبرية

تستخدم الواصمات القلبية الحديثة لتساعد على التشخيص أو التقييم أو مراقبة المرضى المشتبه إصابتهم بالمتلازمة الإكليلية الحادة Acute Coronary Syndrome (ACS). ومن هذه الواصمات:

كرياتينين كيناز CK والنظير CK-MB والتروبونين والميوغلوبين.

وهنالك فحوصات **غير نوعية** لكشف الضرر القلبي ولا يوصى بها لتقييم مرضى القلب المشتبه بهم، حيث يُستخدم اختبار أسبارتات أمينو ترانسفيرازAST لكشف ضرر الكبد وتقترن بإنزيمات كبدية أخرى كالألانين أمينو ترانسفيراز ALT لتشخيص الاضطربات الكبدية. ويُعد هذان الإنزيمان أهم الاختبارات لتحديد أضرار الكبد.

مقايسة الكرياتين كيناز Creatine Kinase

مقدمة

يتم التعبير عن انزيم CK من قبل خلايا وأنسجة عدة

يقوم انزيم CK بتحفيز تحويل الكرياتين واستخدام ATP لإنتاج فوسفوكرياتين و ADP، وإن هذا التفاعل الإنزيمي هو تفاعل عكوس وبالتالي يمكن توليد ATP من فوسفو الكرياتين و ADP

يعمل مركب فوسفو الكرياتين كخازن للطاقة في الأنسجة والخلايا التي تستهلك ATP بسرعة وخاصة العضلات الهيكلية، ومن هنا تبرز أهمية CK في هذه الأنسجة

مبدأ المعايرة

يحفّز CK النقل العكوس لمجموعة الفوسفات إلى مركب ADP، ثم يُقرن هذا التفاعل بتفاعلان آخران بتواسط انزيمي الهكسو كيناز HK وغلوكوز 6 فوسفات ديهيدروجيناز G6P-DH كالتالي:

$$\text{Phosphocreatine + ADP} \xrightarrow{C} \text{Creatine + ATP}$$

$$\text{ATP + Glucose} \xrightarrow{HK} \text{ADP + Glucose-6-phosphate}$$

$$\text{G6P + NAD}^+ \xrightarrow{\text{G6P-DH}} \text{6-Phosphogluconate + NADPH + H}^+$$

إن معدل تشكل NADP المقاس ضوئياً بموجة طولها 340 نانومتر يعبّر عن فعالية CK في العينة

خطوات العمل

العينة: المصل أو البلازما

1. أضف كاشف العمل والعينة المطلوب قياسها إلى المحفد حسب التالي:

	30-25 درجة مئوية	37 درجة مئوية
كاشف العمل (µL)	1000	1000
العينة (µL)	40	20

2. امزج واحضن بالدرجة المطلوبة مدة دقيقتان
3. اقرأ الامتصاص الأولي A للعينة، اضبط الزمن ثم اقرأ امتصاصات العينة خلال فواصل زمنية بمقدار دقيقة واحدة لمدة 3 دقائق
4. احسب الفوارق ما بين الامتصاصات ومعدل اختلاف الامتصاص خلال الدقيقة الواحدة (ΔA/min)
5. احسب النتائج كالتالي:

30-25 درجة: (ΔA/min) * 4127 = U/L من الكرياتين كيناز

37 درجة: (ΔA/min) * 8095 = U/L من الكرياتين كيناز

القيم المرجعية

	25 درجة مئوية	37 درجة مئوية
الرجال: حتى (U/L)	80	195
الإناث: حتى (U/L)	70	170

الأهمية السريرية:

- ✓ تتم مقايسة انزيم CK في الدم كواصم يدل على تخرب الأنسجة الغنية بالكرياتين كيناز، كما في حالة احتشاء العضلة القلبية وانحلال الربيدات Rhabdomyolysis والضمور العضلي Muscular dystrophy
- ✓ غالباً ما يتم قياس CK روتينياً من أجل تحديد سبب الألم الصدري عند المريض، وقد يُستبدل هذا الاختبار باختبار التروبونين القلبي.
- ✓ **لا يجب** أن يتم الاعتماد في التشخيص السريري على نتيجة اختبار **وحيد**، وإنما يتم ربط جميع البيانات المخبرية والموجودات السريرية لأجل الوصول للتشخيص الصحيح.

تقرير الجلسة العملية

احسب فعالية CK في العينة المعطاة، ومن ثم قارن النتيجة مع القيم المرجعية.

المحاضرة الخامسة

استقصاء وظائف القلب

مقايسة AST/SGOT

Aspartate Amino-Transferase

Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase

متى يطلب اختبار AST

يطلب فحص AST مع اختبارات أخرى لتقييم مرضى الاضطرابات الكبدية وفي الحالات التالية

- الأشخاص الكحولين
- الأشخاص الذين لديهم تاريخ مرض كبدي عائلي
- الأشخاص الذين يتناولون الادوية التي تسبب ضرراً كبدياً
- الأشخاص البدينين أو السكريين

ملاحظة

- ✓ ترتفع الاسبارتات ترانسفيراز AST بوضوح في الاحتشاءات الحادة للعضلة القلبية دون ان يرافقها ارتفاع في الالانين ترانسفيرازATL والتي ترتفع بدورها بوضوح في التنخر الكبدي الحاد دون أن تترافق مع ارتفاع واضح في الاسبارتات ترانسفيراز AST
- ✓ عادة ما تؤخذ عينة دم من المريض فور وصوله إلى المشفى ويتم كذلك إجراء تخطيط قلب كهربائي، يمكن تأكيد تشخيص الإصابة القلبية في حال ارتفاع الإنزيمات والبروتينات السابقة (جدول الواصمات القلبية)، وفي حال عدم ارتفاعها فيجب إجراء الاختبارات مرة أخرى بعد مرور الوقت الكافي لارتفاعها في الدم، وإن العينة المثالية هي المأخوذة بعد 6 -12 ساعة من بدء الأعراض

مبدأ الطريقة

يحفز أسبارتات أمينو ترانسفيراز نقل مجموعة الأمين من الاسبارتات إلى 2 اوكسي غلوتارات لتشكيل أوكسالوأسيتات وغلوتامات، يحدد التركيز من خلال معدل تناقص تركيز NADH المقاس بموجة طولها 340nm

$$\text{Aspartate} + \text{2-Oxoglutarate} \xrightarrow{\text{AST}} \text{Oxaloacetate} + \text{Glutamate}$$

$$\text{Oxalacetate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{MD}} \text{Malate} + \text{NAD}^+$$

العينات المستخدمة

المصل أو البلازما

خطوات العمل: يجري العمل بالدرجة 37 مئوية كالتالي

كاشف العمل	1000µl
العينة	50µl

تمزج و تحضن بالدرجة 37 ونبدأ بحساب الزمن وتسجل النتيجة بعد دقيقة، ومن ثم يتم قراءة الامتصاص للعينة بفواصل زمنية (دقيقة واحدة) لمدة 3 دقائق.

تحسب الفوارق ما بين الامتصاصات المتتابعة، ومن ثم يحسب معدل فرق الامتصاص بالدقيقة الواحدة ΔA/min

حساب النتائج

فعالية انزيم AST = (ΔA/min) * 3333 وحدة/ ليتر (U/L)

= (ΔA/min) * 55.55 ميكرو كاتال/ ليتر (µkat/L)

القيم السوية

حتى 40 وحدة/ ليتر وتعادل 0.67 ميكروكاتال/ ليتر

تقرير الجلسة العملية

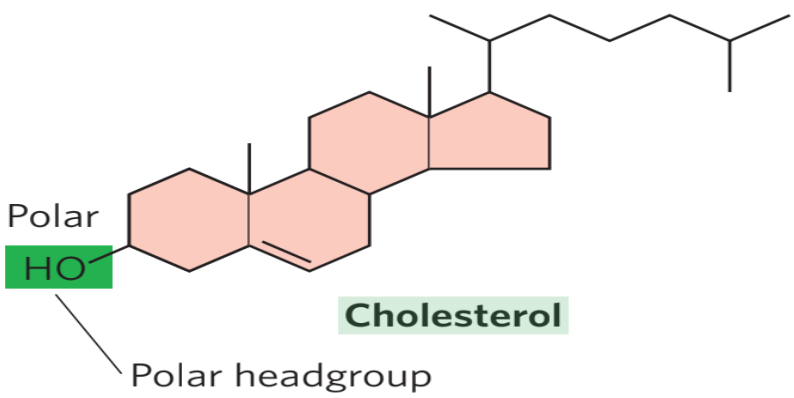
- ✓ احسب فعالية انزيم AST في العينة وقارنها مع القيم السوية
- ✓ عرف الواحدة الانزيمية والكاتال المستخدمتان من أجل التعبير عن الفعالية الانزيمية

المحاضرة السادسة

استقصاء وظائف القلب

مقايسة الكوليسترول HDL

- الكوليسترول هو مادة شحمية غير منحلة بالماء، تُصنع من قبل الكبد، ذات بنية فريدة مؤلفة من حلقات هيدروكربونية مرتبطة مع ذيل كربوني بنهايتها، بالإضافة إلى مجموعة هيدروكسيل على ذرة الكربون الثالثة، إن مجموعة الهيدروكسيل قادرة على تشكيل رابط هيدروجيني مع مجموعة الكاربونيل التابعة لرأس الفوسفوليبد والسفنفوليبد
- يعتبر الكوليسترول جزئ مذبذب amphipathic مؤلف من جزء محب للماء وآخر كاره للماء
- يتواجد الكوليسترول في أغشية أغلب الخلايا الحيوانية، ويعتبر مسؤولاً عن سيولة الغشاء حيث يتوضع ضمن الطبقة المضاعفة لأغشية الخلايا سامحاً بزيادة نفوذية الأغشية لشوارد الهيدروجين والصوديوم



الأهمية الحيوية للكوليسترول

1. اصطناع الهرمونات الستيرويدية متضمنة الفيتامين D والهرمونات الجنسية مثل التستوستيرون والاستروجين، وكذلك الكورتيزون
2. مساعدة الكبد في تصنيع الحموض الصفراوية الهامة من أجل هضم وامتصاص الفيتامينات المنحلة بالدسم
3. تكوين مادة الميلين myelin وهي المادة العازلة للخلايا العصبية، مما يساعد على الحفاظ على وظيفة الدماغ
4. المساهمة في تركيب الأغشية الخلوية وإكسابها الخاصية الأقرب للسيولة
5. مصدر للطاقة
6. الحفاظ على حرارة الجسم
7. حماية الأعضاء الداخلية

أنماط الكوليسترول

نظراً لكون الكوليسترول مادة شحمية فهو غير قابل للانحلال في الدم، وبالتالي لابد من وجود حوامل خاصة من أجل نقله إلى الخلايا المختلفة، تدعى هذه الحوامل بالبروتينات الشحمية lipoproteins

وبالتالي فإن أنماط الكوليسترول الكلي بحسب نسبة القسم البروتيني إلى الشحمي:

1. الكيلو ميكرون chylomicrons: تشكل المادة الشحمية القسم الأعظمي من هذه الجزيئات وتقوم بنقل الشحوم الثلاثية من الأنبوب الهضمي إلى أنحاء الجسم كالكبد والأنسجة الشحمية
2. VLDL البروتين الشحمي منخفض الكثافة جداً: وهو مسؤول عن نقل الشحوم الثلاثية المصنّعة من الكبد إلى الأنسجة الشحمية من أجل تخزينها، يتحول في الدوران إلى LDL
3. IDL البروتين الشحمي متوسط الكثافة: لا يتواجد في الدوران أثناء الصيام
4. LDL البروتين الشحمي منخفض الكثافة، يقوم بنقل المواد الدسمة كالشحوم الفوسفورية والكوليسترول والشحوم الثلاثية إلى الشرايين وبالتالي فإن ارتفاع مستوياته مرتبط مع التصلب العصيدي، ولهذا يعرف بالكوليسترول السيئ
5. HDL البروتين الشحمي عالي الكثافة، والمعروف بالكوليسترول الجيد، وذلك لأنه يعمل على نقل وإعادة الفائض من الجزيئات الشحمية من شحوم فوسفورية وكولسترول وشحوم ثلاثية من خلايا الجسم ومن الشرايين إلى الكبد

مقايسة البروتين الشحمي عالي الكثافة HDL

هو الجزيئة الأصغر من جزيئات البروتينات الشحمية، كونه حاوياً على النسبة الأعلى من بروتين/شحوم، وبالتالي فهو الأكثر كثافة.

البروتينات الشحمية المختلفة تحتوي على أصناف متعددة من جزيئات apolipoproteins مما يؤثر على وظيفتها، وإن apolipoprotein A1 (apo-A1) هو البروتين البنيوي الأساسي المكون لـ HDL على الرغم من وجوده في البروتينات الشحمية الاخرى ولكن بكميات قليلة، أما apolipoprotein A IV (apo-A4) يتواجد في الكيلو ميكرون و VLDL و HDL

مبدأ المقايسة

1. ترسيب البروتينات الشحمية منخفضة الكثافة (LDL و VLDL) وكذلك الكيلو ميكرون بواسطة إضافة كاشف ترسيب
2. يتم تحديد تركيز الكولسترول HDL في السائل الطافي بعد التثفيل حسب التفاعلات التالية:

$$\text{Cholesterol ester} + H_2O \xrightarrow{\text{Cholesterol Esterase}} \text{Cholesterol} + \text{Fatty acid}$$

$$\text{Cholesterol} + O_2 \xrightarrow{\text{Cholesterol}} \text{Cholesterol -3-one} + 2$$

$$2\ H_2O_2 + \text{4-Aminoantipyrine} \xrightarrow{\text{Peroxidas}} \text{Red Quinone} + 4\ H_2O$$

العينات: المصل أو البلازما المسحوبة على EDTA

طريقة العمل

1. الترسيب: ضع 500 ميكرو ليتر من العينة مع 500 ميكرو ليتر من كاشف الترسيب في انبوب تثفيل، امزج وانتظر لمدة 5 دقائق ثم ثفل الأنبوب مدة 10 دقائق، أخرج الأنبوب من المثفلة وانتبه بأن تكون الطفاوة رائقة تماماً
2. حدد تركيز الكوليسترول HDL في الطفاوة كالتالي:

	الناصع	العياري	العينة
الطفاوة	–	–	50 µl
العياري (50mg/dl)	–	50 µl	–
كاشف الكوليسترول	1000 µl	1000 µl	1000 µl

امزج ثم احضن لمدة عشر دقائق بدرجة حرارة المخبر

اقرأ الامتصاص الضوئي للعينة والعياري مقابل الناصع

طريقة الحساب:

تركيز HDL في العينة = (قراءة العينة/ قراءة العياري) * تركيز العياري * 2

HINT: يمكن حساب تركيز LDL بطريقة سريعة باستخدام علاقة Friedwald

الكوليسترول الكلي = VLDL + HDL + LDL

5 / T.G = VLDL

وبالتالي يمكن حساب مرتسم الدسم lipid profile عبر مقايسات انزيمية **للشحوم الثلاثية و HDL و الكوليسترول الكلي**، ومن ثم يتم **حساب** تركيز VLDL و LDL حسب العلاقة السابقة

<u>ولكن:</u> لا يمكن استخدام هذه العلاقة في الحالات التالية:

- ✓ تواجد الكيلو ميكرون في الدم
- ✓ عندما تكون الشحوم الثلاثية أكثر من 250
- ✓ خلال 12 ساعة بعد الوجبة وذلك لأن مستويات الشحوم الثلاثية يمكن أن تكون اكبر 20 – 30%

القيم المرجعية

Total cholesterol	Under 200 mg/dl
HDL cholesterol	Over 40 mg/dl
LDL cholesterol	Under 100 mg/dl
T.G	Under 150 mg/dl

<u>تقرير الجلسة العملية</u>

- ✓ احسب تركيز HDL في العينة المقاسة
- ✓ إذا علمت أن الكوليسترول الكلي والشحوم الثلاثية 180 و 200 ملغ/دل على التوالي، احسب تركيز LDL في العينة.

المحاضرة السابعة

اختبارات وظائف الكبد

Liver Function Tests (LFTs)

مقايسة ALT

LFTs: هي مجموعة من الاختبارات الدموية والتي تزودنا بمعلومات عن حالة الكبد وتتضمن: زمن البروترومبين (PT/INR) وزمن الترومبوبلاستين الجزئي المفعل (a PTT) والألبومين والبيليروبين (مباشر وغير المباشر)، كما وتعدّ انزيمات ناقلات الأمين ALT و AST واصمات حيوية هامة في حال أذية الخلية الكبدية

- ✓ بعض هذه الاختبارات مرتبطة بوظيفة الكبد التصنيعية كاختبار الألبومين و PT و PTT
- ✓ وبعضها مرتبط بالسلامة الخلوية مثل ناقلات الأمين والبيليروبين
- ✓ وبعضها مرتبط بوظيفة الصفراء مثل انزيمات GGT و ALP

يمكن اجراء جميع هذه الاختبارات معاً أو أي منها على حده

تجرى اختبارات الوظائف الكبدية في الحالات التالية:

- تناول أدوية يمكن أن تؤذي الكبد
- وجود داء كبدي
- وجود أعراض لداء كبدي أو الجملة الصفراوية (ألم بطني- غثيان واقياء- اصفرار الجلد)
- تناول المشروبات الكحولية بكثرة

اختبارات وظائف الكبد LFTs

أولاً: انزيمات ناقلات الأمين ALT و AST

يقوم الكبد بالعديد من الوظائف الحيوية كإزالة سمية المواد الضارة، استقلاب المواد المغذية، اصطناع البروتينات مثل الألبومين وبروتينات التخثر، ولأجل القيام بجميع هذه الوظائف فإن الخلية الكبدية تمتلك انزيمات تتواسط تلك التفاعلات وهي انزيمات ناقلات الأمين.

في حال حصول أذى أو تخرب للخلية الكبدية فسوف تتسرب هذه الانزيمات من الخلايا إلى الدم حيث يمكن قياسها، ومن هذه الانزيمات:

SGPT / ALT: انزيم يتواجد في الخلايا الكبدية بشكل حصري

SGOT /AST: انزيم يتواجد في الكبد وفي العديد من الخلايا العضلية كعضلة القلب

غالبا ما يشير ارتفاع مستويات ALT و AST معاً في الدم إلى أذية كبدية

ثانياً: الألبومين

هو بروتين يُصنع في الكبد، وتشاهد انخفاض مستويات الألبومين في الداء الكبدي المزمن كما في حالة التشمع الكبدي، وكذلك تشاهد انخفاض مستويات الألبومين في حالات مرضية أخرى غير كبدية كالمتلازمة النفروزية

ثالثاً: البيليروبين

هو ناتج تحطم الكريات الحمر، بحيث ينتج البيليروبين المرتبط في الكبد ويتم اطراحه مع البراز

يشاهد ارتفاع البيليروبين في العديد من الحالات: كالداء الكبدي واضطراب جريان الصفراء وفي أفات الدم الانحلالية

رابعاً: انزيم الفسفاتاز القلوية alkaline phosphatase (ALP) وانزيم غاما غلوتاميل ترانسفيراز gamma glutamyl transferase (GGT)

إن انتاج الصفراء هي من وظائف الكبد كذلك، وتساهم في هضم المواد الدسمة، حيث تجري الصفراء من الكبد عير الأقنية الصفراوية إلى المرارة حيث يتم تخزينها هناك

وإن انزيمات ALP و GTT تنتجها خلايا الأقنية الصفراوية، ولذلك فإنه عند حدوث ركودة صفراوية أو اضطراب أو انسداد في جريان الصفراء فسوف ترتفع هذه الانزيمات في الدم وأهمها ارتفاع ALP

خامساً: زمن البروترومبين prothrombin time (PT) وزمن الترمبوبلاستين الجزئي المفعل activated thromboplastin time (a PTT)

من وظائف الكبد كذلك اصطناع بروتينات ضرورية لعملية تخثر الدم (عوامل التخثر)، وبالتالي فإنه من ضمن اختبارات وظيفة الكبد التحري عن قدرة الكبد في اصطناع هذه البروتينات

a. PT: يستخدم لتقصي السبيل الخارجي للتخثر مراقبة المرضى المعالجين بالوارفارين، ويقيس هذا الاختبار الزمن المتطلب لأجل تخثر عينة الدم في شروط مخبرية محددة، ونلاحظ تطاول زمن البروترومبين في حال وجود مستويات منخفضة من بروتينات التخثر
b. PTT: يستخدم لتقصي السبيل الداخلي ومراقبة المرضى المعالجين بالهيبارين، حيث يتطاول زمن PTT في أمراض الكبد
c. INR: أو نسبة الأسوياء العالمية، وهو لا يعد اختباراً بحد ذاته وإنما طريقة معتمدة من أجل تقييم نتيجة اختبار PT من خلال مقارنة النتائج بشكل دقيق مع بعضها البعض

يتطاول زمن PT وترتفع نسبة INR لدى الأشخاص الذين يُكتشف لديهم خلل في اصطناع الكميات السوية من عوامل التخثر في الكبد

مقايسة ALT/SGPT

Alanine Amino Transferase

Serum Glutamic Pyruvic Transaminase

مبدأ الطريقة

يحفز ألانين أمينو ترانسفيراز نقل مجموعة الأمين من الألانين إلى 2 اوكسو غلوتارات لتشكيل بيروفات وغلوتامات، يحدد التركيز من خلال معدل تناقص تركيز NADH المقاس بموجة طولها 340nm وبتواسط انزيم اللاكتات ديهيدروجيناز

$$\text{Alanine} + \text{2-Oxoglutarate} \xrightarrow{\text{ALT}} \text{Pyruvate} + \text{Glutamate}$$

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactate} + NAD^+$$

العينات المستخدمة

المصل أو البلازما

خطوات العمل: يجري العمل بالدرجة 37 مئوية كالتالي

كاشف العمل	1000µl
العينة	50µl

تمزج و تحضن بالدرجة 37 ونبدأ بحساب الزمن وتسجل النتيجة بعد دقيقة، ومن ثم يتم قراءة الامتصاص للعينة بفواصل زمنية (دقيقة واحدة) لمدة 3 دقائق.

تحسب الفوارق ما بين الامتصاصات المتتابعة، ومن ثم يحسب معدل فرق الامتصاص بالدقيقة الواحدة ΔA/min

حساب النتائج

فعالية انزيم AST = (ΔA/min) * 3333 وحدة/ ليتر (U/L)

= (ΔA/min) * 55.55 ميكرو كاتال/ ليتر (µkat/L)

القيم السوية

حتى 40 وحدة/ ليتر وتعادل 0.67 ميكرو كاتال/ ليتر

تقرير الجلسة العملية

- ✓ احسب فعالية انزيم ALT في العينة وقارنها مع القيم السوية
- ✓ عرف الواحدة الانزيمية والكاتال المستخدمتان من أجل التعبير عن الفعالية الانزيمية

المحاضرة الثامنة

اختبارات وظائف الكبد

Liver Function Tests (LFTs)

مقايسة الألبومين Albumin

الألبومين هو بروتين ذو وزن جزيئي 66.5 كيلو دالتون، يُصنع بشكل رئيسي في الكبد وهو البروتين الأساسي في الدم بالإضافة إلى مجموعة بروتينات الغلوبلين Globulins

يمثّل الألبومين 55% إلى 65% من بروتينات البلازما

الوظائف الحيوية للألبومين:

- ✓ منع تسرب الدم من الأوعية إلى النسج المجاورة أي الحفاظ على الضغط التناضحي الغرواني colloid osmotic pressure في الأوعية
- ✓ نقل العديد من الأدوية والمواد الأخرى
- ✓ نمو النسج واستشفائها
- ✓ مصدرا للحموض الأمينية المُصنعة داخل الخلية

تعمل الكلية في الحالة الطبيعية على منع فقد الألبومين عن طريق البول، ومع ذلك يتواجد الألبومين في البول الطبيعي بكميات زهيدة جداً (لا تتجاوز 150 ملغ في اليوم)، ويتزايد هذا الإفراغ بوجود أذية على مستوى الكبيبات، ولذلك يعتبر الألبومين هو المعلَم الأهم في تحديد الخلل الوظيفي للكبيبات الكلوية

تكون كمية الألبومين في الدم أكثر قليلاً من كمية الغلوبلين مما يجعل النسبة السوية بينهما أكبر قليلاً من 1 لصالح الألبومين، وإن النسبة التي تكون أقل من 1 أو أكبر بكثير من 1 تدل على حالة غير سوية

يجرى اختبار معايرة الألبومين في الدم في الحالات التالية:

- تقييم وظيفتي الكبد والكلية
- معرفة ما إذا كانت الحمية حاوية على كمية كافية من البروتين
- المساعدة في تحديد أسباب الوذمات (في الكاحل أو في البطن أو وذمة رئوية)

ملحوظة:

- ✓ يفقد الكبد المتضرر القدرة على تصنيع البروتينات، ومع ذلك فإن البروتين المُصنع مسبقاً يستمر وجوده في الدم لمدة 12 إلى 18 يوم، ولذلك فقد تنخفض مستويات البروتين الكلي في الدم فقط بعد أسبوعين من حدوث الأذية الكبدية
- ✓ يمكن أن ُطلب قياس مستوى البروتين في البول كذلك كما ذُكر سابقاً

مقايسة الألبومين في الدم

مبدأ الطريقة:

يتفاعل الألبومين بشكل نوعي (دون الحاجة إلى عملية فصل مسبقة) مع الأنيون من مركب tetra Bromo Cresolsulfon Phthalein بحيث يُعبر تزايد الامتصاص الضوئي عن تراكيز الألبومين في العينة

العينات المستخدمة: المصل

خطوات العمل:

	ناصع	عياري	عينة
العياري	ـــ	10 ميكرو ليتر	ـــ
العينة	ـــ	ـــ	10 ميكرو ليتر
الكاشف	2.5 مل	2.5 مل	2.5 مل

تمزج وتحضن بدرجة حرارة المخبر لمدة 10 دقائق، تُقرأ الكثافة الضوئية بموجة طولها 625 نانو متر مقابل الناصع

ملاحظة: اللون ثابت مدة 20 دقيقة بعد إتمام التفاعل

حساب النتائج

تركيز الألبومين في العينة (dl/g) = (قراءة العينة /قراءة العياري) * تركيز العياري

القيم السوية

تركيز الألبومين عند البالغين = 3.5 – 4.8 ml100/g

2.2 – 1.2 =G/A

التغيرات السريرية

- ترتفع مستويات الألبومين في المصل في حالة التجفاف الشديد severe dehydration أو اتباع حمية عالية البروتين
- تنخفض مستويات الألبومين في الدم في الحالات التالية:
  - ✓ الداء الكبدي (التهاب- تشمع- تنخر)
  - ✓ سوء التغذية
  - ✓ الداء الكلوي مثل المتلازمة النفروزية
  - ✓ Crohn's disease
  - ✓ Celiac disease
  - ✓ Inflammation
  - ✓ الامراض المناعية الذاتية مثل الذئبة الحمامية والتهاب المفاصل الروماتويدي

تقرير الجلسة العملية

- ✓ احسب تركيز الألبومين في العينة وقارنها مع القيم السوية
- ✓ ما هو برأيك سبب عدم تمكننا من استخدام البلازما في هذه المعايرة

المحاضرتين التاسعة والعاشرة

استقصاء وظائف البنكرياس

البنكرياس: غدة مختلطة تقع خلف المعدة، يعمل البنكرياس كغدة صماء endocrine gland يقوم بإفراز هرمونات إلى الدم تعمل على تنظيم مستويات سكر الدم وأهمها هرموني الأنسولين والغلوكاجون، ويعمل كغدة خارجية الإفراز exocrine gland يقوم بإفراز العصارة البنكرياسية إلى الاثنى عشر عبر الأقنية البنكرياسية، وتحوي هذه العصارة على الإنزيمات الهاضمة وهي:

- انزيمات تساهم في هضم البروتينات: التربسينوجين (يتم تفعيله إلى تربسين)
  الكيموتريبسينوجين (يتم تفعيله إلى كيموتريبسين)
- انزيمات تساهم في هضم الدسم: الليباز – الفوسفوليباز – ليزو فوسفوليباز – كوليسترول استراز
- انزيمات تساهم في هضم النشا والكربوهيدرات: الأميلاز

انزيم الأميلاز

α – amylase / 1,4-D-glucan glucanohydrolase

يعمل البنكرياس كغدة خارجية الإفراز على إفراز انزيم الأميلاز، كما تقوم الغدد اللعابية كذلك بإفراز انزيم الأميلاز اللعابي

يقوم الأميلاز بتحفيز حلمهة الروابط الغليكوزيدية من نوع 1–4 في السكريات المتعددة كالنشا والغليكوجين إلى سكاكر ثنائية وثلاثية، لتقوم انزيمات أخرى فيما بعد بتحويله إلى سكر الغلوكوز ليتم امتصاصه من قبل الزعابات المعوية

طرق معايرة انزيم الأميلاز

يوجد العديد من طرق معايرة الأميلاز، منها ما يعتمد على تقدير كمية ركيزة النشا غير المتفككة، ومنها ما يعتمد على حساب تركيز الغلوكوز أو المالتوز المتشكل في نهاية التفاعل

تصنف طرق معايرة الأميلاز إلى أربعة أصناف

1) قياس فعل الأميلاز الحال للنشا: حيث يقاس تركيز النشا قبل وبعد الفعل الانزيمي للأميلاز بإحدى الطرق التالية

قياس اللزوجة viscosimeter

قياس العكر Turbidometry

قياس الكدر Nephelometry

مقياس اليود

2) معايرة السكاكر الناتجة عن التفاعل: تتم معايرة السكاكر المرجعة الناتجة عن الحلمهة مثل المالتوز والمالتوتريوز والغلوكوز

ولكن هذه الطرق ذات حساسية ضعيفة وتحتاج إلى تجريد المصل من البروتينات قبل العمل

3) الطرق المولدة للون chromogenic: حيث يتم ربط عديدات السكاريد بأصبغة معينة، وعندما يتم تفاعل الحلمهة يتحرر الصباغ الذي يقاس لونيا فيما بعد

4) الطرق الانزيمية الحركية Kinetic: يعاير فيها المالتوز الناتج عن فعل الأميلاز في ركائزه باستعمال تفاعل انزيمي مساعد وجملة انزيمية كاشفة، والركائز المستخدمة هي النشا ثم المالتوبنتوز ثم المالتوتتروز فالمالتوتريوز

يعدّ غلاء ثمن المواد المستخدمة بالإضافة لعدم ثبات محاليل الركائز من العيوب التي تحدّ من تطبيقها

مثال: ركيزة maltopentose

$$\text{Maltopentose} \xrightarrow{\alpha\text{-amylase}} \text{Maltotriose} + \text{Maltose}$$

$$\text{Maltotriose} + \text{Maltose} \xrightarrow{\alpha\text{-}} 5\ \text{Glucose}$$

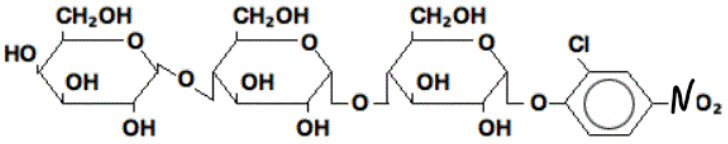
$$\text{Glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{hexokina}} \text{G-6-P} + \text{ADP}$$

$$\text{G-6-P} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{G6PDH}} \text{Gluconate 6-P} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

معايرة الأميلاز في الدم

المبدأ: طريقة لونية حركية kinetic colorimetric method، يحفز انزيم الأميلاز حلمهة الركازة 2–كلورو 4–نيتروفينيل غالاكتوبيرانوزيل مالتوزيد مؤدياً إلى تحرير 2–كلورو 4– نيتروفينول (CNP) والذي يقاس لونياً بموجة طولها 405 نانومتر حيث يُعبر تزايد الامتصاص الضوئي عن فعالية الأميلاز.

ملاحظات جمع العينات



- العينات المستخدمة: المصل أو البلازما المسحوبة على الهبارين
- يعاير الأميلاز في البول بعد تمديده بنسبة (1+2) بمحلول ملحي 0.9% ثم تُضرب النتيجة بـ 3
- بعض مضادات التخثر مثل EDTA والسترات ترتبط بالكالسيوم الضروري من أجل فعالية الأميلاز وبالتالي يجب ألا تستخدم البلازما المسحوبة على مضادات التخثر السابقة
- اللعاب والجلد حاويان على الأميلاز وبالتالي يجب تجنب استخدام الممصات عبر الفم وتجنب احتكاك الجلد مع الكاشف

طريقة العمل: يتم حضن كاشف العمل أولاً بالدرجة 37 قبل الاستخدام

الكاشف	1000 µL
العينة	20 µL

يمزج ويُحضن بالدرجة 37 لمدة دقيقتين، يتم قراءة التغير في الإمتصاص كل دقيقة ولمدة 3 دقائق أخرى، يتم بعدها حساب وسطي التغير في امتصاص العينة لكل دقيقة ΔA/min

- ✓ امزج محتويات المحفد وضعه في الحاضنة وابدأ بحساب الزمن بخطوات سريعة
- ✓ سجل امتصاص العينة بعد دقيقتين
- ✓ سجل الامتصاص لمدة 3 دقائق بفواصل زمنية دقيقة واحدة بين القراءة والأخرى

- ✓ احسب الفرق ما بين الامتصاصات المتتالية، ثم احسب معدل اختلاف الامتصاص في الدقيقة الواحدة ΔA/min

حساب النتيجة

تركيز الأميلاز في الدم = (ΔA/min) * 3800 = U/L

القيم المرجعية

في الدم: حتى 120 وحدة/ ليتر

في البول: حتى 600 وحدة/ ليتر

أهمية معايرة الأميلاز سريرياً

- ➢ يعد قياس فعالية الأميلاز في الدم والبول ذو أهمية كبيرة من أجل تشخيص التهاب البنكرياس الحاد والمزمن وخاصة عند وجود ألم في الربع العلوي للبطن
- ➢ يشاهد ارتفاع أميلاز الدم أيضا في حالة القصور الكلوي – الأمراض البطنية الحادة – آفات الغدد اللعابية – الأميلازمية الكبرى macroamylasemia
- ➢ يشاهد انخفاض فعالية أميلاز الدم في الحالات التالية: قصور البنكرياس – التليف الكيسي البنكرياسي – استئصال البنكرياس

انزيم الليباز

يعمل الليباز على تحفيز حلمهة hydrolysis الدهون، ومن ركائزه المفضلة: الشحوم الثلاثية واسترات الكوليسترول والشحوم الفوسفورية، يؤدّي الليباز دوراً هاماً في عملية هضم ونقل ومعالجة الشحوم.

يقوم الليباز البنكرياسي بتحويل ركازة الشحوم الثلاثية إلى monoglyceride وجزيئتان من الحموض الدسمة.

معايرة الليباز في الدم

المبدأ: طريقة لونية حركية، انشطار ركيزة الليباز المولّدة للّون (DGGR) بواسطة الفعل التحفيزي لليباز، لتشكيل 1,2-O-dilauryl-rac-glycerol ومركّب وسطي غير ثابت glutaric acid-(6-methyl-resorufin) ester والذي يتحلّل تلقائياً في المحاليل القلوية لتشكيل glutaric acid و methylresorufin، المسؤول عن تشكّل اللون الأحمر في المحلول، تُقاس كثافته الضوئية وتكون متناسبة مع فعالية الليباز في الوسط.

$$\text{DGGR} \xrightarrow[\text{lipase}]{} \text{1,2-O-dilauryl-rac-glycerol + glutaric acid-(6-methyl-resorufin) ester}$$

glutaric acid-(6-methyl-resorufin) ester —(تحلل تلقائي)→ glutaric acid+ methylresorufin

DGGR= 1,2-O-dilauryl-rac-glycerol-3-glutaric acid-(6-methyl-resorufin) ester

خطوات العمل

	Blank	Calibrator	Sample
ماء مقطر	10 µL	---	---
calibrator	---	10 µL	---
العينة	---	---	10 µL
الكاشف 1	1000 µL	1000 µL	1000 µL
امزج واحضن مدة 5 دقائق بالدرجة 37°			
الكاشف 2	200 µL	200 µL	200 µL
امزج واحضن مدة دقيقة واحدة بالدرجة 37°، اقرأ التغير في الامتصاص مقابل الناصع عند طول موجة 580 نانومتر كل دقيقة ولمدة دقيقتان، احسب التغير في الامتصاص وسطياً لكل دقيقة (ΔA/ min) لكلٍّ من العينة والمعيّر.			

الحساب: فعالية الليباز (وحدة/ليتر) = $\frac{(\Delta A/\ min)_{\text{للعينة}}}{(\Delta A/\ min)_{\text{للمعيّر}}}$ * تركيز المعيّر

القيم المرجعية: للذكور والإناث حتى 38 وحدة/ ليتر.

أهمية معايرة الليباز سريرياً

يُستخدم اختبار ليباز المصل لتشخيص التهاب البنكرياس الحاد والمزمن والتليّف الكيسي البنكرياسي.

الأميلاز Vs الليباز

كلاهما من الانزيمات الهاضمة التي تتحرّر طبيعياً من الخلايا الغديّة البنكرياسية إلى الاثني عشر، أما في حال أذية البنكرياس، تتحرّر تلك الانزيمات إلى الدوران حيث يتم تصفية الأميلاز عن طريق البول، فيما يُعاد امتصاص الليباز إلى الدوران.

في التهاب البنكرياس الحاد: يرتفع الأميلاز سريعاً خلال 3–6 ساعات من بداية الأعراض، ويمكن أن يبقى مرتفعاً مدة 5 أيام، بينما تكون ذروة ارتفاع الليباز عند 24 ساعة من حدوث الأذية، مع بقاء تراكيزه المصلية مرتفعة مدة 8–14 يوماً.

تقرير الجلسة العملية

- ✓ احسب فعالية انزيمي الأميلاز والليباز في عينة المصل مقدرة بالواحدة/ ليتر وقارنها بالقيم المرجعية، ثم علّق على النتيجة.
- ✓ ماهي العلاقة ما بين الواحدة الانزيمية والميكرو كاتال (معامل التحويل).

المحاضرة الحادية عشر

فحص السائل المنوي

Seminal Fluid Test

يجرى فحص السائل المنوي عادة كجزء من دراسة تشمل الزوجين المشاركين بزواج عقيم لأكثر من سنتين، ونظرا لبساطة هذا الفحص فإنه يطلب قبل إجراء فحوصات الأنثى الهرمونية والتي تعد أكثر كلفة وتعقيدا، هذا ويشكّل العامل الذكري حوالي 40% من حالات العقم عند الأزواج.

من الجدير بالذكر أن دراسة السائل المنوي وحدها لا تعطي دليلاً مطلقاً على الإخصاب أو العقم، كما أنه يُنصح بتكرار فحص السائل المنوي أكثر من مرة في حال كانت النتائج غير طبيعية نظراً لأن دورة تجدد الحيوانات المنوية تمتد نحو 75 يوماً، ولتجنَب التأثيرات الدوائية والنفسية كذلك.

يمكن أن يطلب فحص السائل المنوي في حالات أخرى غير العقم مثل الحالات الجنائية.

فيزيولوجيا السائل المنوي

السائل المنوي عبارة عن محلول مركّب بتشكّل في الخصيتين وأعضاء التناسل الذكرية الثانوية

يتألف السائل المنوي من حيوانات منوية spermatozoa تكون معلّقة في البلازما المنوية seminal plasma وظيفتها الأساسية تكمن في تأمين وسط مغذي ذو أوسمولية وحجم كافيين لإيصال الحيوانات المنوية إلى مخاطية عنق الرحم حيث ينتهي دوره في عملية الإخصاب.

تتولد مكونات السائل المنوي من:

- الخصى Testis: تُخزن الحيوانات المنوية (والتي تشكل 5% من حجم السائل المنوي) في الأنابيب المنوية لحين القذف، وتكون هذه الحيوانات المخزنة غير ناشطة تقريبا، حيث تقدر مدة حياتها في هذا المكان بنحو الشهر
- الحويصلات المنوية Seminal Vesicles: يتولد نحو 60% من السائل المنوي في الحويصلات المنوية، ويكون هذا المفرز عبارة عن سائل لزج معتدل أو قليل القلوية، ذو لون أصفر بسبب احتوائه على الفلافين، وتعد الحويصلات المنوية المصدر الرئيسي لمحتوى السائل المنوي من الفركتوز (المغذّي الرئيسي للنطاف)، كما تفرز الحويصلات المنوية الركيزة المسؤولة عن تخثر السائل المنوي بعد القذف
- الموثة أو البروستات Prostate: تساهم البروستات بحوالي 20% من حجم السائل المنوي، وتفرز سائلاً حليبياً خفيف الحموضة (p H = 6.5) وذلك بسبب محتواه من حمض الليمون، كما أن مفرزات البروستات غنية بالأنزيمات والفوسفاتاز الحامضة المسؤولة عن تخثر السائل المنوي وتمييعه
- تسهم مفرزات البربخ Epididymis والغدد الاحليلية Urethral glands بنحو 10 -15 % من حجم السائل المنوي

جمع العينات

هنالك شروط خاصة لجمع عينة السائل المنوي من أجل التحليل (مرفقة مع الجلسة)

وإن أفضل العينات هي التي يتم جمعها في المخبر السريري بطريقة الاستمناء بحيث نستبعد حدوث صدمة باردة أثناء جلب العينات إلى المخبر، يتم جمع العينة في وعاء بلاستيكي نظيف واسع الفتحة

تعليمات خاصة عند جمع العينات

- ✓ فحص العينة بأسرع ما يمكن وعدم تركها لأكثر من ساعتين إلى ثلاث ساعات بعد جمعها
- ✓ عدم تعريض العينة إلى درجة حرارة عالية أثناء نقلها إلى المخبر
- ✓ يُفضل تدفئة الوعاء قبل عملية الجمع للدرجة 37 مئوية
- ✓ حفظ العينة بعد عملية الجمع في الحاضنة (37 مئوية) حتى تتم عملية تمييع الخثرة (20 دقيقة)

فحص السائل المنوي

الفحص العياني للسائل المنوي Macroscopic evaluation

- الصفات الفيزيائية appearance: السائل المنوي حديث القذف هو خثارة عالية اللزوجة بيضاء غير شفافة ذات رائحة حادة، تتميع تلقائياً خلال 10 -20 دقيقة ليتشكل بعدها سائل نصف شفاف عكر ولزج خفيف القلوية (p H = 7.7)، وتشير قيم الـ p H الأخفض إلى سائل منوي من منشأ موثي ناجم عن عدم تنشؤ خلقي في الحويصلات المنوية.
أما زيادة العكر فإنها تشير إلى زيادة الكريات البيض المترافقة مع حالة التهابية في بعض أجزاء الجهاز التناسلي.
- اللزوجة viscosity: يمكن تقدير لزوجة السائل حين صب العينة إلى انبوب مدرج لقياس الحجم، حيث تُصب العينة ذات اللزوجة الطبيعية قطرة فقطرة، توضع اللزوجة في الحسبان إذا كانت تعيق حركة الحيوانات المنوية وذلك لأن اللزوجة الزائدة تترافق مع مرور سيئ للحيوانات المنوية إلى مخاطية عنق الرحم.
- فحص التخثر والتميع Coagulation and Liquefaction: يتم على ثلاث مراحل:
  1. يتم التخثر بفعل انزيم البروستات المخثرة بفعل تشكل مركب يشبه الفيبرينوجين في الحويصلات المنوية.
  2. تبدأ عملية التميع بفعل انزيمات من منشأ موثي.
  3. تتحول جزيئات البروتين إلى حموض أمينية حرة وأمونيا بفعل انزيمات حالة للبروتين مثل الأمينوبيتيداز والببسين.

يجب أن تتم عملية التميع في غضون نصف ساعة، ولهذا يجب أن نميزما بين زيادة اللزوجة وتأخر عملية التميع.

- الحجم volume: يجب ألا يقل حجم السائل عن 1.5 مل في الدفقة الواحدة، كما لوحظ أن معظم الرجال المشاركين بزواج عقيم يكون لديهم زيادة في حجم السائل مترافق مع كمية ضئيلة من الحيوانات المنوية، كما أن قلة حجم السائل تؤدي إلى ضعف دخول الحيوانات المنوية إلى مخاطية عنق الرحم.

الفحص المجهري للسائل المنوي Microscopic investigation

- تعداد الحيوانات المنوية Concentration: يمكن عد الحيوانات المنوية بعد تمييع السائل وتمديده بنسبة 20% بسائل التمديد (بيكاربونات الصوديوم – فورمالين – ماء مقطر)
تستعمل عدادة الكريات البيض وتملأ بالسائل الممدد وتترك دقيقتين حتى ترقد الحيوانات المنوية المثبتة، ثم تُعد الحيوانات المنوية في مربعين كبيرين من مربعات الكريات البيض ويُضرب العدد بـ 100000، فينتج لدينا عدد الحيوانات المنوية في 1 مل من السائل، يجب تكرار عملية العد مرتين على الأقل ويُحسب المتوسط.
يجب ألا يقل عدد الحيوانات المنوية عن 15 مليون/مل في الحالات الطبيعية حتى يحدث إلقاحاً ناجحاً.
- الحركة Motility: لكي تستطيع الحيوانات المنوية عبور مخاطية الرحم وتلقيح البويضة في أنابيب فالوب لابد أن تكون لها حركة نشيطة، لأجل تقدير حركة الحيوانات المنوية توضع قطرة صغيرة من السائل بعد التمييع على صفيحة مدفأة مسبقا (37 درجة) وتغطى بساترة، وتقدّر الحركة بمسح عدة ساحات مجهرية بحيث يمكن مراقبة 200 حيوان منوي على الأقل، يجب أن يكون فحص الساحة المجهرية جيداً بحيث يشمل الحيوانات المنوية غير المتحركة التي تكون مستقرة في الأسفل، تحسب نسبة الحيوانات المنوية بحيث تُصنف حسب حركتها إلى:
  a. حركة تقدمية خطية سريعة (تغطي مسافة لا تقل عن نصف طول الحيوان المنوي في الثانية)
  b. حركة تقدمية بطيئة
  c. حركة غير تقدمية
  d. عديم الحركة

يجب ألا تقل نسبة الحيوانات المتحركة (a+b) عن 32%

يعتمد تقدير الحركة على الفحص المباشر وبعد ساعة وبعد ساعتين وبعد 3 ساعات من جمع العينة، وتجدر الإشارة إلى ان البلازما المنوية لا تشكل وسطاً مناسباً من الناحية الفيزيولوجية من أجل مدة نشاط طويلة للحيوانات المنوية، كما أن النشاط الاستقلابي للحيوانات المنوية ونمو الجراثيم كل ذلك يؤدي إلى تغير في حموضة السائل بعد ساعات قليلة من أخذ العينة مما يسبب توقف حركة الحيوانات المنوية.

- أشكال الحيوانات المنوية Morphology: يمكن دراسة أشكال الحيوانات المنوية بتحضير لطاخات ملونة من أجل رؤية الأشكال الطبيعية والشاذة، تُحضر اللطاخات على صفائح مجهرية نظيفة (كتحضير اللطاخات الدموية) ثم تلون بملون بابا نيكولا وذلك بعد تثبيت اللطاخة بمزيج من الإيتر والكحول ومن ثم تجفيفها، كما يمكن استخدام ملونات أخرى مثل الهيماتوكسيلين، ملون غيمزا، بنفسجية الجانسيان، او ملون رايت، ثم يُفحص نحو 200 حيوان منوي باستخدام العدسة الغاطسة، تُحسب نسبة الأشكال غير الطبيعية، ويجب ألا تقل نسبة الحيوانات المنوية ذات الاشكال الطبيعية غير الشاذة عن 4% حتى يكون السائل طبيعياً.
يجب تسجيل عيوب الأشكال في النواحي التالية
  - عيوب الرأس: حجم الرأس (كبير – صغير – كمثري – مستدق) – وجود رأسين
  - عيوب العنق والجزء الأوسط (قطعة وسطى منتفخة – مثنية – الرفيعة)
  - عيوب الذيل (قصير – متعدد – مكسور – غير منتظم)

يجب الانتباه إلى امكانية وجود كريات حمر أو بيض أو خلايا بطانية في العينة، كما تظهر حيوانات منوية غير ناضجة وبالتالي يجب تفريقها عن الكريات البيض

- العيوشية أو الحيوية Vitality: يسمح التلوين الحيوي للحيوانات المنوي بإضافة قطرة من ملون الأيوزين إلى قطرة من السائل المنوي في درجة حرارة الغرفة بحساب نسبة الخلايا الحية بشكل مستقل عن حركتها، حيث يتم تصنيف 100 حيوان منوي إما إلى خلايا ميتة (ملونة بلون أحمر برتقالي) أو خلايا حية غير ملونة.

يجب ألا تقل نسبة الخلايا الحية عن 58% حتى يكون السائل طبيعيا

- معايرة فركتوز السائل المنوي

يشكل الفركتوز حوالي 40% من مجموع السكاكر الموجودة في البلازما المنوية، حيث تفرزه الحويصلات المنوية تحت التأثير الاندروجيني المحرض للتستوستيرون، هذا وتكفي تراكيز قليلة من التستوستيرون لتحريض انشاء الفركتوز وإفرازه، وبالتالي فإن الارتفاع الملحوظ في تراكيز التستوستيرون ستعمل على انخفاض تركيز الفركتوز إما بتأثير التلقيم الراجع السلبي أو بسبب استنفاد طاقة الحويصلات المنوية.

يتعلق عدد النطاف في السائل المنوي بتركيز الفركتوز، إذ تترافق زيادة عدد النطاف بنقصان واضح في تركيز الفركتوز في السائل المنوي

كما يتعلق تركيز الفركتوز بعمر المريض، حيث ينخفض إنتاج التستوستيرون مع التقدم في السن، والذي يترافق بانخفاض مماثل للفركتوز في السائل المنوي

هذا ويؤدي الامتناع الجنسي لأكثر من ثمانية أيام إلى انخفاض تركيز فركتوز السائل المنوي

طرائق معايرة الفركتوز في السائل المنوي

1. الطرق الانزيمية

مبدأ المعايرة

$$\text{Fructose + ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{Fructose-6-P + ADP}$$

$$\text{Fructose-6-P} \xrightarrow{\text{PGI}} \text{Glucose-6-P}$$

$$\text{Glucose-6-P + NADP}^{+} \xrightarrow{\text{G6P}} \text{Gluconate-6-P + NADPH + H}^{+}$$

حيث تتناسب كمية الشكل المرجع NADH طرداً مع تركيز الفركتوز في العينة، حيث تقاس الكمية المتشكلة من NADH بموجة طولها 340 نانومتر.

2. الطرق الكيميائية اللونية
   a. طريقة سيلفانوف
   b. طريقة التكاثف مع اندول 3 حمض الخل (I3AA)

طريقة سيلفانوف لمعايرة الفركتوز

المبدأ: يعطي الفركتوز لوناً أحمراً بالتسخين مع حمض كلور الماء الكثيف وبوجود الريزورسينول وذلك بعد تجريد السائل من الأشكال الخلوية والبروتين باستعمال محلول من سلفات الزنك وماءات الباريوم

خطوات العمل: في ثلاث أنابيب اختبار يوضع مايلي:

	الناصع	العياري	الرشاحة
الرشاحة المجردة	ـــــ	ـــ	1 مل
كاشف الريزورسينول	1 مل	1 مل	1 مل
ماء مقطر	1 مل	ـــ	ـــ
العياري (200mg/dl)	ـــ	1 مل	ـــ

تمزج الأنابيب جيداً وتوضع في حمام مائي غالي مدة 10 دقائق، تبرد ويقرأ امتصاص العياري والعينة مقابل الناصع بموجة طولها 490 نانو متر.

طريقة الحساب

تركيز الفركتوز في العينة (mg/dl) = (الكثافة الضوئية للعينة / الكثافة الضوئية للعياري)* تركيز العياري

القيم السوية

يجب أن يكون تركيز الفركتوز في السائل المنوي أكثر من 150 ملغ/ دل في الحالة الطبيعية

الجداول التالية توضح أحدث المعايير الموصى بها من قبل منظمة الصحة العالمية (2010) فيما يخص فحص السائل المنوي ومقارنتها مع المعايير في السنوات السابقة.

Parameters (WHO criteria 2010)

Parameter	Lower Reference Limit
Semen volume (ml)	1.5
Sperm concentration (10^6/ml)	15
Total sperm number (10^6/ejaculate)	39
Progressive motility (PR, %)	32
Total motility (PR +NP, %)	40
Vitality (live sperms, %)	58
Sperm morphology (NF, %)	4
pH*	>/=7.2
Leucocyte* (10^6/ml)	<1
MAR/Immunobead test* (%)	<50

WHO reference values changed

	1980	1987	1992	1999	2010
Volume (mL)	ND	≥2	≥2	≥2	≥1.5
Count (10^6/mL)	20-200	≥20	≥20	≥20	≥15
Total count (10^6)	ND	≥40	≥40	≥40	≥39
Motility (%)	≥ 60	≥50	≥50	≥50	≥40
Progressive (%)	≥ 2	≥25%	≥25% (a)	≥25% (a)	≥32%
Vitality (%)	ND	≥50	≥75	≥75	≥58
Morphology (%)	80.5	≥50	≥30	(14)*	≥4*
Leukocytes (10^6/mL)	<4.7	<1.0	<1.0	<1.0	1.0

*Strict criteria (Tygerberg); Esteves et al. *Urology* 2012

ملحق الجلسة

شروط إعطاء عينة السائل المنوي لأجل الفحص المخبري

1. الامتناع عن الجماع لمدة 2 -6 أيام، أي عدم المعاشرة الزوجية أو الاستمناء أو الاحتلام لمدة لا تقل عن يومين ولا تزيد عن 6 أيام.
2. غسل الأعضاء التناسلية واليدين بالصابون جيداً ثم التنظيف جيداً بالماء عدة مرات.
3. يفضل وضع العينة بطريقة الاستمناء (خوفاً من اختلاطها بمفرزات المهبل).
4. تجمع العينة في وعاء نظيف ومعقم (من المخبر).
5. عدم فتح غطاء الوعاء الخاص لجمع العينة إلا مباشرة قبل الإستعمال وحفظه في مكان دافئ (عدم وضعه في الثلاجة).
6. الحرص على عدم فقدان أي كمية من العينة خارج وعاء الجمع، وإذا حصل ذلك فالرجاء إعلام المخبر.
7. الحرص على عدم نزول منظفات أو ماء أو صابون ضمن العينة، لأنها ستغير من نتيجة التحليل.
8. يفضل إعطاء العينة في الغرف الخاصة والمجهزة لقطف النطاف داخل المشفى أو المخبر.
9. في حالات خاصة يمكن إعطاء العينة في المنزل شريطة الحصول على وعاء جمع معقم من المخبر مع مراعاة إيصالها خلال ساعة.
10. يجب المحافظة على دفء العينة أثناء نقلها إلى المخبر (بوضعها في منطقة ملاصقة للجسم أو في راحة اليد).
11. التأكد من كتابة الاسم الكامل بوضوح مع تاريخ وزمن إعطاء العينة.

مع الشكر لمخبر مشفى الشرق لمعالجة العقم وطفل الأنبوب