Clinical chemistry الكيمياء السريرية

الكيمياء السريرية هي كيمياء تطبيقية لفهم الحالة الصحية والمرضية للإنسان ,حيث تعطي معلومات مفيدة مستحصلة من علوم شتى كالكيمياء الحياتية , والكيمياء الفيزيائية , وتعمل على تطبيق هذه المعلومات لغرض تحديد وتشخيص ومعالجة أو منع حدوث الأمراض لدى الإنسان .

يتم فحص المريض سريريا من خلال فحص عينة مأخوذة من السوائل الحياتية في جسمه ومن أهمها : الدم Blood , الإدرار Urine , السائل النخاعي ألشوكي Cerebra Spinal, السائل المعدي Gastric juice, السائل المفصلي Synovial fluid, السائل المعوي ألاثني عشري Duodenum fluid, السائل الرحمي Amniotic fluid, اللعاب Saliva, الغائط Feces, العرق Sweat... الخ من المواد .

يعتبر الدم هو الأساس في تحليلات الكيمياء السريرية (لكون اغلب مكونات الخلايا تنتقل بواسطته) , ويأتي بعده الإدرار . وعلى هذا الأساس سوف نتناول دراسة الدم ومكوناته أولا ودراسة الإدرار ومكوناته في فصل تحليل الإدرار العام الذي سيأتي لاحقا .

The blood composition الدم ومكوناته

الدم عبارة عن خلايا عالقة في قالب بروتيني ملحي وينتمي إلى نوع متخصص من الأنسجة تسمى بالأنسجة الوعائية . يتكون الدم من جزء خارجي extra cellular ويسمى البلازما ويشكل 55 % من حجم الدم وجزء خلوي cellular يشكل 45 % من حجم الدم ويضم الخلايا التي تسبح في سائل البلازما والتي تسمى بخلايا الدم blood cells, والتي تكون على ثلاثة أنواع :

1- كريات الدم الحمراء (Erythrocytes) Red Blood Cells (R.B.C)

وهي خلايا صغيرة الحجم يبلغ قطرها 7.5 مايكروميتر وسمكها 2 مايكروميتر لاتحتوي على نواة أو مايتوكوندريا , لها مساحة سطحية واسعة تسمح بتبادل الغازات وتسهل حركتها عند انتقالها في أوعية ضيقة. والمصدر الرئيسي لإنتاجها في أجنة اللبائن هو الكبد والطحال أما بعد الولادة فيكون نخاع العظم هو المصدر الرئيسي .

تحتوي كريات الدم الحمراء على صبغة الهيموكلوبين التي يعزى لها اللون الأحمر ويكون عمر الكرية قصيرا لا يتعدى (120) يوم حيث تتكسر إلى قطع صغيرة تلتهم بواسطة الجهاز الطلائي الداخلي بتحليلها إلى جزء بروتيني هو globin وجزء أخر هو الهيم heme الذي يحتوي على الحديد ومركب proto porphyrine .

Hemoglobin

↙ ↘

Globins(كلوبين)

يضاف إلى بروتينات الدم أو يستخدم بتكوين جزيئات هيموكلوبين جديدة

Heme (هيم)

يتحول بعد أن ينفصل عنه الحديد إلى أصباغ الصفراء التي تطرح مع الصفراء, أما الحديد المنفصل فيستخدم مع نخاع العظم لتكوين جزيئة هيموكلوبين جديدة وما يزيد عن الحاجة الحاجة الجسم يخزن في الكبد والطحال .

2- الكريات الدموية البيضاء (Leukocytes) White Blood Cells (W.B.C)

تعتبر خط الدفاع الأول الذي يعتمد عليه الجسم ضد غزو البكتريا والفيروسات . وسميت بالبيضاء (غير الملونة) لعدم احتوائها على صبغة الهيموكلوبين وتكون كبيرة الحجم وتحتوي على نواة ويكون عددها اقل من عدد ال RBC . إن الكريات الدموية البيضاء ليست أجسام خلوية خاصة بالدم فقط بل تتواجد مثلا في البلغم والسائل الدماغي الشوكي والعقد اللمفاوية ومناطق الالتهاب وهي بذلك تتميز بهجرة وحركة واسعتين, ولكون عملها يتم في الأنسجة فان الدم يعتبر واسطة لنقلها .

تقسم الخلايا الدموية البيضاء إلى قسمين

1- الخلايا الحبيبية Granular W.B.C والتي تقسم بدورها اعتمادا على تقبلها للصبغات إلى ثلاثة أنواع هي (المتعادلة Neutrophils , الحامضية Eosinophils و القاعدية Basophils .

2- خلايا غير حبيبية Non granuler W.B.C

وهي خلايا يكون السايتوبلازم لها خالي من الحبيبات وتنتج في الطحال والغدد اللمفاوية وتشمل

- الخلايا اللمفاوية Lymophocytes التي تمتاز بكبر حجم النواة وقلة كمية السايتوبلازم ولها دور مهم في عملية المناعة حيث تكون الأجسام الضادة Antibody لتثبيط عمل السموم .
- خلايا وحيدة الخلية Monocytes وتكون اكبر حجما والنواة فيها بشكل كلية وتشكل ملتهمات ضخمة بالدم ولها دور في مكافحة الالتهابات المزمنة .

3- الصفائح الدموية Platelets

وهي اصغر العناصر المكونة للدم وتكون بيضوية الشكل ولها حبيبات واضحة في السايتوبلازم وتتكسر بسهولة وتلعب دورا مهما في عملية تخثر الدم .

إن الغالبية العظمى من التحاليل السريرية تعتمد على الدم أولا ثم الإدرار , والفحوصات المختبرية التي تنجز على الدم تتطلب تحضيره بحيث نحصل على احد النماذج التالية :

1- **الدم الكلي Whole blood** : وهو عينة الدم التي نحصل عليها بعد إضافة مادة مضادة للتخثر ولا تحتاج لعملية الفصل بجهاز الطرد المركزي (Centrifuge) .

2- **المصل (Serum)** : السائل الأصفر الذي نحصل عليه من فصل عينة الدم بجهاز الطرد المركزي بعد تركها فترة من الزمن لتكوين الخثرة Fibrin وهي بذلك لا تحتاج إلى مضاد للتخثر .

3- **البلازما (Plasma)** سائل اصفر نحصل علية عند إضافة مضاد تخثر لعينة الدم ثم فصلها بجهاز الطرد المركزي وذلك لأنه يحوي على الفايبرينوجين المشارك بعملية التخثر . حيث تذوب في البلازما جميع مكونات الدم الكيمياوية التي تشمل **الماء** , **البروتينات** , **الحوامض الامينية** , **الدهون** , **الأملاح اللاعضوية** , **الهورمونات** , **الفيتامينات** , **والانزيمات** والكثير من **فضلات التمثيل الغذائي** .

ميكانيكية تخثر الدم The clotting process

تتكون خثرة الدم blood clot من خلال تحويل بروتين الفايبرنوجين Fibrinogen الموجود بهيئة ذائبة بالبلازما إلى كتلة بروتينية غير ذائبة هي الفايبرين Fibrin والتي سرعان ما تعمل على إيقاع خلايا الدم في شركها مكونة الخثرة التي تمنع تسرب الدم من الوعاء الدموي , ويمكن توضيح الميكانيكية كالأتي :

أ- عند حدوث جرح أو تمزق بالوعاء الدموي فان الدم (الذي هو نسيج متحرك في نظام مغلق يعرف بنظام الدورة الدموية) ينساب من الوعاء الدموي ويختلط بالنسيج وتبدأ مادة ثرمبوبلاستين thromboplastin بالتحرر من الصفائح الدموية السابحة في بلازما الدم وخلايا الأنسجة الوعائية

ب- تتحول مادة برثرومبين Prothrombin الموجودة بالدم بمساعدة ثرمبوبلاستين وايونات الكالسيوم Ca^{+2} إلى مادة الثرومبين Thrombin وهي المادة الرئيسية بعملية التخثر :

$$\text{Prothrombin} \xrightarrow[\text{Ca+2}]{\text{Thromboplstin}} \text{Thrombin}$$

$$\text{Fibrinogen} \xrightarrow{\text{Thrombin}} \text{Fibrin}$$

من خلال هذه الميكانيكية نلاحظ أهمية ايونات Ca^{+2} بعملية التخثر .

مضادات التخثر Anticoagulants

عندما يستلزم التحليل استعمال الدم الكلي أو البلازما يمكن اللجوء إلى احد مضادات التخثر التالية التي تعمل على الحيلولة دون تكوين الخثرة :

1- الهيبارين Heparin : وهي مادة موجودة أصلا في معظم أنسجة الجسم ولكن بنسبة اقل من النسبة اللازمة لمنع التخثر ومصدره في الكبد والخلايا الرئوية ويعتبر من السكريات المتعددة . ويعزى عمله إلى تصديه لمادة الثرومبين لذلك يسمى Anti thrombin حيث يقف حائلا دون تحول برثرومبين الى ثرومبين وبذلك يمنع تكون الخثرة Fibrin , يضاف بنسبة 20 وحدة لكل ملم من الدم .

2- الأوكزالات ($C_2O_4^{-2}$): وتشمل أوكزالات الصوديوم $Na_2C_2O_4$ أو البوتاسيوم $K_2C_2O_4$ أو الامونيوم $(NH_4)_2C_2O_4$ او اللثيوم $Li_2C_2O_4$ وتعمل على ترسيب ايونات Ca^{+2} التي يحتويها الدم . ومن الجدير بالذكر إن هذا الملح لا يمكن استخدامه بتحليل تعيين Ca^{+2} بالدم لأنه سوف يزيل كل ما تحتوية العينة من Ca^{+2} بترسيبه بشكل CaC_2O_4 وبذلك يفشل التحليل .

3- أثلين ثنائي الأمين رباعي حامض الخليك EDTA : يعتبر EDTA عاملا مخلبيا Chelating agent يعمل على منع تخثر الدم من خلال ارتباطه مع Ca^{+2} وعزله عن القيام بعمله ويستخدم بشكل Na_2EDTA أو K_2EDTA . يعمل على المحا فضة على المكونات الخلوية من التلف ولذلك يفضل استعماله باختبارات علم الدم Hematological Exams , إلا انه لا يفضل استخدامه عند قياس الصوديوم والكلورايد لأنه يكون مركبات ملحية معها .

4- فلوريد الصوديوم NaF : مادة مضادة لانحلال سكر الدم إضافة إلى فعاليته الضعيفة كمضاد للتخثر ويستعمل مخلوطا مع $K_2C_2O_4$لحفظ السكر من عملية التحلل Glycolysis بتركيز 2 ملغم/ مل من الدم .حيث يبدي تأثيره عن طريق تثبيط النظام الأنزيمي (تثبيط أنزيم الإينوليز الذي يشطر 1-6 ثنائي فوسفات الفركتور الى 3- فوسفات ثنائي هيدروكسي أسيتون و 3- فوسفات الكليسرالدهايد وهو تفاعل يحث في مسار التحلل الكلوكوزي Glycolysis pathway) أما إذا استعمل لوحدة كمانع للتخثر فيجب أن تكون نسبته 6-10 ملغم / مل من الدم . و كقاعدة عامة يجب منع استخدام الفلورايد عند جمع عينات الدم لتقدير النشاط الأنزيمي أو عند استخدام أنزيم في التجربة مثل طريقة تقدير اليوريا باستخدام أنزيم اليورييز .

جمع ومعاملة عينات الدم Blood collecting and handling

الأماكن التي يتم السحب منها :

1- **السحب من الأوردة** : يمكن الحصول على عينات الدم عن طريق سحب الدم مباشرة من الوريد ويسمى عندئذ بالدم الوريدي (حيث يتم سحبه لأغلب الفحوصات المختبرية مثل إيجاد تركيز السكر , الكولسترول , اليوريا , الايونات , وغيرها) حيث يكون السحب من الأوردة بالنسبة للكبار عادة من الوجه الأمامي من كوع اليد ويفضل السحب من الوريد الرأسي الوسطي وذلك لالتصاقه بالأنسجة وعدم تحركه أثناء عملية سحب الدم .

2- **السحب من الشرايين** : وهي نادرة , وتستخدم لتحديد غازات الدم مثل PO_2 ,PCO_2 أو تعيين HCO_3 ,pH وعادة يتم السحب من الشريان الفخذي .

3- **السحب من الشعيرات الدموية** : يتم السحب عادة بوخز الإصبع وتدفق الدم من الأوعية الدموية الشعرية المنتشرة في المنطقة . أما في الأطفال حديثي الولادة فيتم السحب من الكاحل (عقب الرجل) أو من لب إصبع القدم الكبير ولكن يفضل عادة السحب من أصابع اليد لتقاربه من دم الوريد.

يستخدم الرباط الضاغط Tourniquet على ذراع المريض عادة لغرض ظهور الوريد بصورة واضحة ويستحسن استخدام محقنة من النوع الذي يهمل بعد الاستعمال مباشرة disposable syringe . ويمكن توضيح مراحل جمع العينة بحيث تعطي نتائج تحليل دقيقة كالأتي :

1- مرحلة ما قبل جمع العينة .

أ- تغذية المريض : هناك فحوصات مثل فحص السكر , قياس تحمل السكر G.T.T تتطلب أن يكون المريض بحالة صوم لمدة 8-12 ساعة على الأقل مع مراعاة نوعية الغذاء المتناول خلال الأيام القليلة التي تسبق التحليل.

ب- الأدوية التي يتناولها المريض : بعض الأدوية تؤثر في التركيب الكيميائي للدم مثل الأدوية التي تحتوي على السالسليت Salicylate تعمل على خفض نسبة حامض اليورك uric acid بدرجة ملحوظة لذلك يوصى بإيقاف العلاج لبعض الأمراض التي يعاني منها المريض مؤقتا لحين إكمال الفحص .

ت- عدم سحب الدم من مريض تم حقنه وريديا بسوائل مغذية أو ما شابه ذلك , لان هذه السوائل من شانها ان تؤثر على نتيجة الفحص .

2- مرحلة جمع العينة :

أ- وضعية المريض : عند تغيير وضعية المريض من الاستلقاء إلى الوقوف فان تركيز بعض مكونات الدم تزداد بنسبة 5-15 % بسبب حركة الماء خارج وداخل الأوعية الدموية الداخلية عند الوقوف ولإزالة هذا التأثير ينصح سحب العينة من وضعية الجلوس .

ب- اختيار الوريد المناسب : يتم اختيار الوريد الأكثر وضوحا بحيث يمكن سحب العينة منه بدون إزعاج للمريض .

ت- إيقاف جريان الدم : استخدام الرباط الضاغط بأعلى الذراع ولأقصر فترة ممكنة لان الضغط على الوريد يعطي زيادة زائفة بقيم النتائج المختبرية لاحتمال تكسر وانحلال الدم وبالتالي خروج محتويات الخلايا إلى الخارج . إن أفضل النتائج يمكن الحصول عليها من وضع الرباط الضاغط لمدة ثلاث دقائق .أما في فحص تعيين نسبة Ca^{+2} بالدم فيفضل رفع الرباط الضاغط حال دخول الدم إلى المحقنة لتجنب انحلال الدم لان تركيز الكالسيوم داخل كريات الدم الحمراء أعلى من تركيزه خارجها لذلك يجب المحافظة على عدم تكسر هذه الخلايا .

ث- التأكد من سحب الدم بصورة بطيئة وانسيابية تحاشيا من التأثير على تركيز بعض المواد في الدم المسحوب كالبروتينات والمواد المرتبطة بها إضافة إلى احتمال انحلال كريات الدم hemolysis الذي يمكن تجنبه عن طريق:

- استخدام محقنة وأنابيب جمع نظيفة وجافة .
- عدم استخدام إبرة محقنة رفيعة جدا أو غليظة جدا لسحب الدم .
- استخدام الرباط الضاغط بأعلى الذراع ولأقصر فترة ممكنة .
- سحب الدم بصورة بطيئة وانسيابية.
- إزالة إبرة المحقنة بعد السحب ودفع الدم من المحقنة إلى الأنبوبة بصورة معتدلة وعدم رجها بقوة .
- عدم الإكثار من استعمال مادة الكحول (مثل الايثانول بتركيز 70 %) المستخدمة للتعقيم لتجنب اختلاطها مع الدم المسحوب من الذراع .

3- مرحلة ما بعد جمع العينة :

يترك الدم في الأنبوبة لمدة تتراوح بين 10 – 15 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة لغرض إكمال تخثره (في حالة استخدام المصل) أو يضاف له مضاد التخثر (في حالة استخدام البلازما) وفي كلتا الحالتين يتم استخدام جهاز الطرد المركزي لفصل العينة .وبعد إتمام الفصل يتم فصل المصل أو البلازما ويحول إلى أنبوبة نظيفة وجافة باستخدام الماصة المناسبة . حيث يسحب الدم بلطف وعناية لمنع اختلاط مكونات الخثرة مع السائل العلوي .

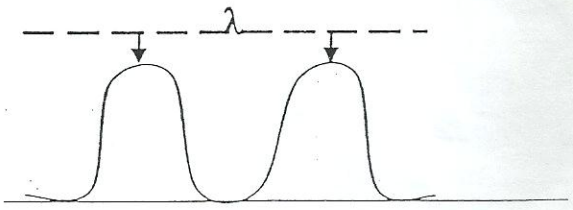
هنالك إجماع عام في معظم المختبرات على تفضيل استخدام مصل الدم بدلا من البلازما أو الدم الكلي وذلك **لسهولة الحصول عليه إضافة إلى إن معظم الأنزيمات تكون ثابتة فيه لمدة 24 ساعة على الأقل تحت التبريد $4\ C^0$ ولمدة أطول عند < - $10C^0$.كما إن الايونات اللاعضوية والكرياتنين وحامض اليورك تكون ثابتة فيه لعدة ساعات بدرجة $25C^0$ ولمدة أطول في $4\ C^0$.** إن أفضل النتائج يمكن الحصول عليها عند القيام بالتحليل حال الحصول على المصل وخاصة بتحاليل السكر والأنزيمات .

Calorimetric analysis التحاليل اللونية

معظم التجارب الكيمياحياتية تتضمن قياس نسبة مركب أو مجموعة مركبات في مزيج معقد والطريقة الأوسع انتشاراً لتعيين التركيز هي الطريقة اللونية (Colorimetry method) حيث أن الفائدة الكبيرة من هذه الطريقة هي عدم الحاجة إلى عزل تام للمركبات لذلك فتعيين نسب مركبات معينة في مزيج من مركبات معقدة مثل الدم يكون ممكناً بعد معاملة بسيطة. ولكي نفهم مبدأ العمل بجهاز المطياف Spectrophotometer المعتمد بالتحاليل اللونية علينا فهم بعض المصطلحات التي لها علاقة مباشرة بالموضوع وهي:

الضوء **light** : طاقة إشعاعية ذات أطوال موجية مرئية من قبل العين البشرية.

الطول الموجي **wave length** (λ) : المسافة المحصورة بين منحني مسار الضوء الموجي وتقاس بالنانوميتر (nm) أو ملي مايكرون (mμ) أو الأنكستروم (A°).



شكل (1) : الطول الموجي λ هو المسافة المحصورة بين قمتين موجية

الطيف Spectrum :

إنّ العين البشرية لها القدرة على مشاهدة الطاقة الإشعاعية (الضوء) في المنطقة المرئية المحصورة بين (400-750) نانوميتر ولكن أجهزة التحليل اللونى الحديثة تتمكن من تحسس أطوال موجية أقصر (فوق البنفسجية UV 180-400 نانوميتر) وأطوال موجية أطول (تحت الحمراء IR 750-2000 نانوميتر).

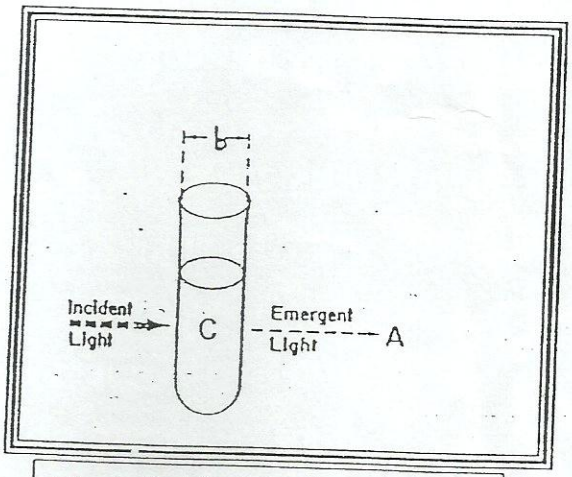
إنّ ضوء الشمس أو الضوء المنبعث من مصباح كهربائي اعتيادي هو خليط من عدة طاقات إشعاعية تعرف **بالطيف** وتكون ذات أطوال موجية مختلفة تميزها العين البشرية بشكل ضوء أبيض وما هو في الحقيقة إلا مجموعة أطياف. والجدول التالي يوضح العلاقة بين الأطوال الموجية وطبيعة لونها الملحوظ لمناطق الطيف (فوق البنفسجي والمرئي وتحت الأحمر).

اللون الملحوظ	اسم المنطقة	الاصطلاح	الطول الموجي بالنانوميتر
لا يشاهد	فوق البنفسجية القصيرة جداً	Ulrta short UV	220-180
لا يشاهد	فوق البنفسجية القصيرة	Short UV	320-220
لا يشاهد	فوق البنفسجية الطويلة	Long UV	400-320
بنفسجي	المرئية	Visible	440-400
أزرق	المرئية	Visible	500-440
أخضر	المرئية	Visible	580-500
اصفر	المرئية	Visible	600-580
برتقالي	المرئية	Visible	620-600
أحمر	المرئية	Visible	750-620
لا يشاهد	تحت الحمراء القصيرة	Short IR	2000-750

ويمكن تحليل الضوء الأبيض إلى مكوناته من الأطياف اللونية المختلفة وذلك بإسقاط حزمة ضوئية من مصدر ضوئي- كمصباح تنكستن- على موشور زجاجي فيفرقها إلى حزم ضوئية مختلفة (اشعة فوق بنفسجية UV + ألوان الطيف الشمسي +اشعة تحت الحمراء IR) يعرف كل منها بحزمة ضوئية أحادية اللون (Monochromatic light).

كثافة الضوء وقانون بير لامبرت Light intensity and Beer`s low

إنَّ الأطوال الموجية الضوئية لها طاقات مختلفة يمكن للمواد أن تمتص قسم منها وتعكس الآخر. (هذه الظاهرة تنطبق على المحاليل الملونة فقط لأن غير الملونة ليست لها قابلية امتصاص وتسمح لنفاذ الضوء الساقط 100% تقريباً) ،لذلك فإنَّ شدة الضوء الساقط على محلول ملون تنخفض انخفاض ملحوظ نتيجة امتصاص قسم من الحزم الضوئية المكونة له كما إنَّ كمية الضوء الممتص (A) تعتمد على تركيز المادة المذابة (C) بالمول/ لتر وعمق المحلول الذي اخترقه الضوء خلال مساره في المحلول (b)، لاحظ الشكل:



$$A = a . b . c \quad ------(1)$$

قانون بير:

$$I_2 = I_1 e^{-K_1 C} \quad ---- (2)$$

حيث ان : I_2 هو الضوء النافذ و I_1 هو الضوء الساقط .

قانون لامبرت:

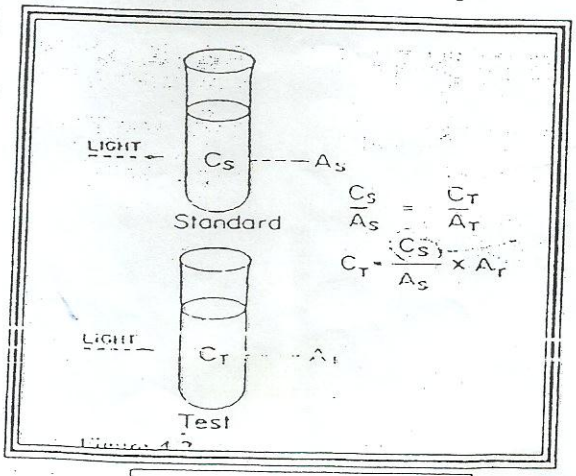
$$I_2 = I_1 e^{-K_2 b} \quad ---- (3)$$

قانون بير – لامبرت:

$$I_2 = I_1 e^{-KC b} \quad ---- (4)$$

شكل (2) علاقة تركيز المحلول بالضوء المار

العلاقة (4) توضح انه كلما ازداد تركيز المحلول او ازداد طول المسار الضوئي داخل المحلول فهناك فرصة لان يمتص الضوء بنسبة اكبر، طالما ان عدد الجزيئات الماصة الموضوعة في مسار الضوء اكثر . ان التطبيق الكمي لقانون بير يمكن عرضه بالشكل التالي:



وعند تطبيق المعادلة(1)في(4):

$$I_2 = I_1 e^{-A} \quad ---- (5)$$

هناك قياس اخر للتغير بكثافة الضوء وهو النفاذية(T) (Transmittance) و هي مقياس لكمية الضوء النافذ من المحلول:

$$T = \frac{I_2}{I_1} \quad ------ (6)$$

شكل(3) تطبيق قانون بير .

$$\therefore T = e^{-A} \rightarrow A = -\log T \quad ----- (7)$$

بما إنّ معظم أجهزة التحليل اللوني تستخدم النفوذية المئوية T% وحيث أن :T%=T×100

$$\therefore A = -\log \frac{T\%}{100}$$

$$A = -(\log T\% - \log 100)$$

$$A = -\log T\% + \log 100$$

$$\therefore A = 2 - \log T\% \quad ----(8)$$

تمثل المعادلة (8) العلاقة الجبرية للعلاقة بين الامتصاصية (A) والنفاذية (T).

❖ هناك محددات معينة يجب إتباعها عند استخدام قانون بير – لامبرت لقياس تركيز المحاليل بأجهزة التحليل اللوني وهي:

1. يجب أن تكون المحاليل المستخدمة للقياس ملونة حتى يتم الامتصاص والنفاذ وإذا لم تكن كذلك فتعامل كيماويا لإنتاج لون معين لأن شدة اللون للمحلول تتناسب طرديا مع تركيز المحلول.
2. يجب أن تكون المحاليل ذات مدى من التركيز (ليس بعالي جدا ولا واطئ جدا) حتى يمكن قراءة قيمة الامتصاصية ضمن مدى الطول الموجي الذي يسمح به الجهاز.
3. يجب أن يكون جهاز التحليل له قدرة جيدة على توليد حزمة ضوئية أحادية اللون على درجة كبيرة من النقاوة لإسقاطها على المحلول الملون.
4. يجب أن يكون المحلول الملون المراد قياسه شفافا وخاليا من الرواسب أو العكرة أو الضبابية.

ملاحظة:

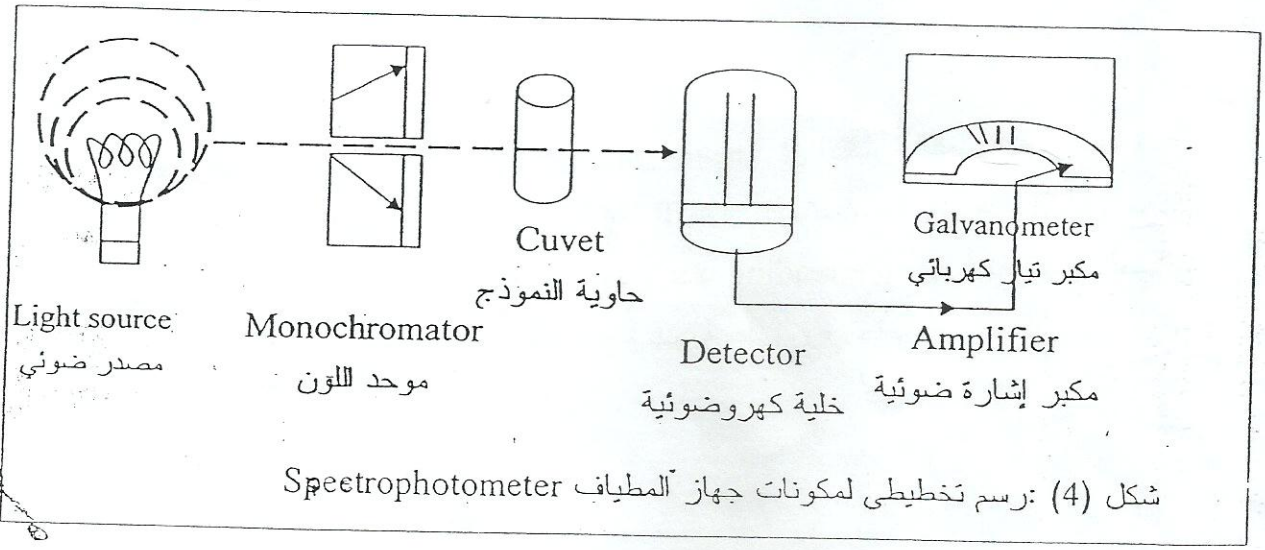
المحلول الأغمق لوناً تكون له قابلية امتصاص أكبر بينما قابلية النفاذ تكون أقل.

استناداً لما سبق يمكن القول أنّ معرفة تركيز المحلول المجهول تتطلب معرفة شدة لونه وبالتالي قياس كمية الضوء الممتص أو النافذ في المحلول بواسطة جهاز المطياف.

==

المطياف Spectrophotometer

هو جهاز قياس قابلية امتصاص المحاليل الملونة (أو قابلية النفاذية) بطـول مـوجي واحد او اكثر ، حيث ان له القابلية على انتقاء حزمة ضوئية أحادية اللون والطول الموجي Monochromatic beam للتداخل مع النموذج (هذا النوع من الضوء يجعل قانون بير اسهل بالتطبيق)باستخدامه مواشير زجاجية Prisms أو مشبكات الانكسار Diffraction grating لذلك الغرض من أجل. يتكون الجهاز من الأجزاء التالية:



شكل (4) :رسم تخطيطي لمكونات جهاز المطياف Spectrophotometer

<u>1- مصدر ضوئي Light source</u>: المصدر الشائع هو لهب مصباح التنكستن W (في حالة استخدام المنطقة المرئية 400-750 نانوميتر) أو لهب مصباح الديتيريوم (في حالة استخدام المنطقة فوق البنفسجية 200-400 نانوميتر).

<u>2- جهاز توحيد الطول الموجي Wave length selector</u>: جهاز يعمل على انتقاء طول موجي محدد من المصدر الضوئي ليتم إسقاطه على المحلول .يتكون هذا الجهاز اما من موحد اللون monochromator ، لاحظ الشكل، ويتكون من مجموعة شرائح أو عدسات وعناصر مثبتة مثل الموشور أو مشبكات انكسار.

3- خلية النموذج Sample container (cuvet): وهي عبارة عن حاوية متنقلة يوضع فيها المحلول المراد قياسه، يمكن أن تكون أنابيب زجاجية مربعة او دائرية مصنوعة من البلاستيك (للقياس الذي يتضمن الاطوال الموجية من 320-1000nm) او خلايا كوارتز (للقياسات دون 320 nm) لأن الزجاج الاعتيادي تكون له امتصاصية على طول منطقة UV.

4- المحسس Detector: وهي خلية تقيس شدة الضوء بتحويله من اشارة ضوئية إلى اشارة كهربائية (كلما كانت الشدة عالية كلما كانت الاشارة الضوئية اعلى).تستخدم اجهزة متنوعة بهذا المجال واهمها الطبقات الحاجزة barrier layers والخلية المضعفةالضوئيةphotomultiplier tubes . وتستعمل ايضا الخلايا الضوئية الخلايا الكهروضوئية .

5- جهاز قياس التيار الكهربائي read out device: ان الاشارة الكهربائية الصادرة من المحسس ممكن تقرأ بدلالة النفونية المئوية T% او الامتصاصية A .هذا القياس ممكن ان يتم باجهزة الكترونية ، قراءة ابرية على عداد needle reading ، مقياس كلفاني galvanometer scale او بواسطة اشارة حبرية على ورق خاص.

الأجهزة والأدوات المستخدمة في المختبرات الطبية:

1- مطياف ضوئي
2- جهاز طرد مركزي
3- حاضنة أو حمام مائي
4- سرنجات (استخدام لمرة واحدة)
5- قطن طبي
6- كحول اثيلي بتركيز 70% للتعقيم
7- أنابيب اختبار نظيفة
8- ماصات مايكروية

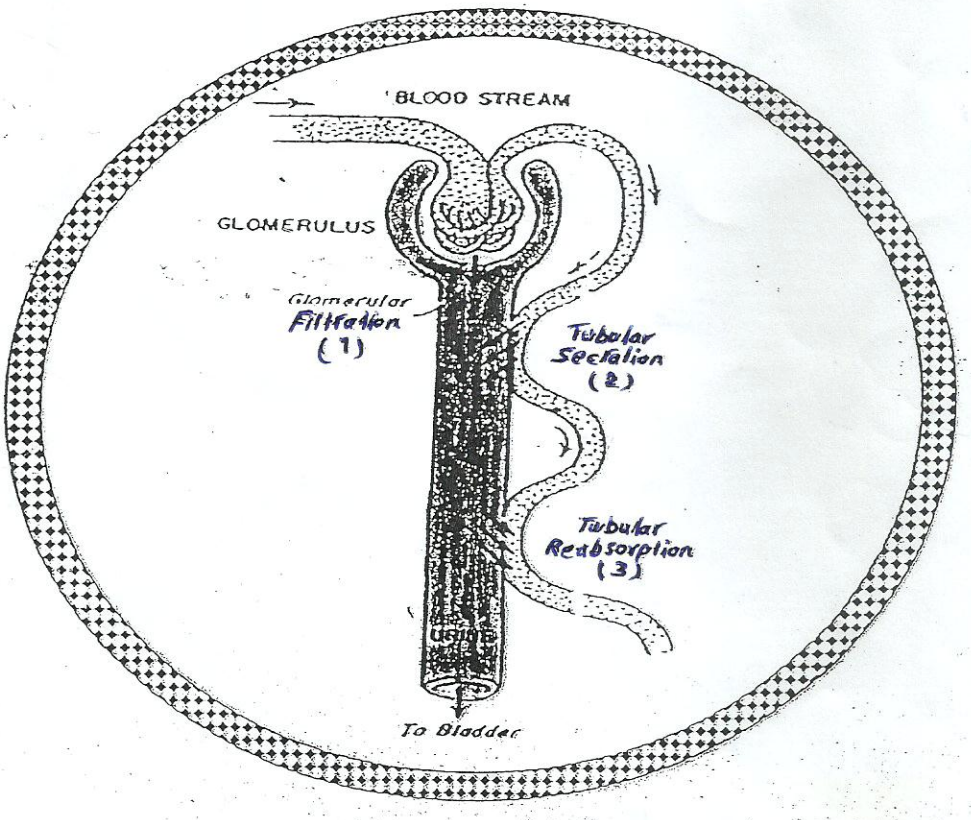
General analysis of the urine تحليل الادرار العام

1. اختبارات وظيفة الكلية Kidney function tests
2. اختبارات وظيفة الكبد Liver function tests
3. اختبارات وظيفة البنكرياس Pancrease function tests

ان عمل العضيات الداخلية بالجسم ينظم بواسطة جزئين رئيسيين هما :

a. الرئتين : تنظم تركيز O_2 ، CO_2 .

b. الكليتين : تنظم وتحافظ على التركيب الكيمياوي لسوائل الجسم المختلفة لذلك سنعرض هنا فسلجة عامة عن الكلية. كل كلية تحتوي على مليون وحدة عاملة تقريبا تدعى النفرون nephrons ويتكون كل نفرون من الكبيبات الكلوية glumerulus لمرتبطة مع قناة انبوبية صغيرة تدعى الانبيب الكلوي tubule ، لاحظ الشكل -5- .



تركيب النفرون

تطرح نواتج التايض من خلال 3 عمليات رئيسية تحدث داخل النفرون nephron وينتج الادرار عن هذه العمليات مجتمعة ، والتي يمكن تلخيصها كما يلي :

1. الترشيح الكليوي *Glumerular filtration* :

عند جريان الدم خلال الانابيب الشعريه للكبيبات giumeruius ستجري عليه عملية ترشيح ، ثم يمر الراشح الناتج إلى الانيبب tubule من خلال أغشية الكبيبات. إن الراشح الكبيبي يحتوي على معظم مكونات الدم الداخل ماعدا البروتين الذي لايمر عبر الاغشية الكبيبة الطبيعية بأي كمية كانت .

2. إعادة امتصاص الانيبب *Tubular reabsorption* :

إعادة امتصاص مواد معينة بواسطة الإنيبب الكليوي tubular بحيث تحافظ على عمل العضيات الداخلية . هناك مواد يعاد امتصاصها بنسبة عالية مثل الأحماض الأمينية ، الكلوكوز ، الالكتروليتات، وهناك مواد لايعاد امتصاصها جزئيا مثل اليوريا، حامض اليوريك كما ان هناك مواد لايعاد امتصاصها نهائيا مثل الكرياتنين .

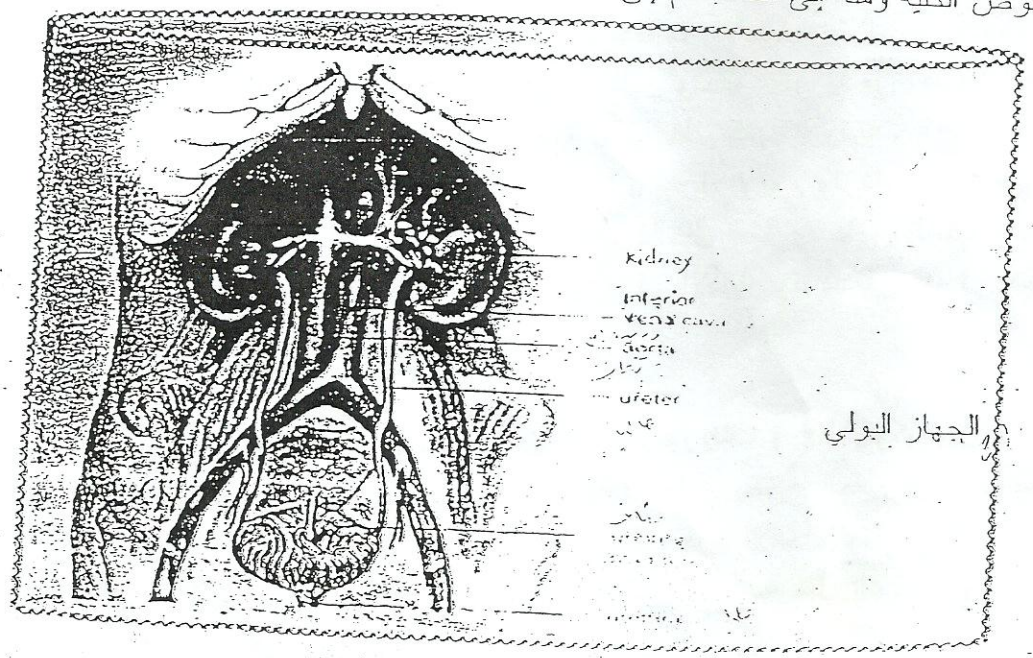
3. افرازات الانيبب *Tubular secretion* :

تفرزبعض المواد من الانيبب الكليوي لاضافتها الى الادرار مثال ذلك : قد تطرح بعض المواد التي ترتفع نسبتها بالدم عن الحد الطبيعي . كما يحدث تبادل بايونات الهيدروجين لانتاج الامونيا .

بعد اتمام العمليات المذكورة يتكون سائل شفاف ذو لون اصفر فاتح وتركيز هيدروجيني واطئ قليلا وله كثافة نوعية اكبر من الكثافة النوعية للماء ، هذا السائل هو الادرار .

يتجمع الادرار بعد تكونه بواسطة الانيبب الجامع collecting tubules الذي يأخذه إلى حوض الكلية ومنه إلى الحالب ثم إلى المثانة واخيرا إلى الاحليل

الجهاز البولي



المكونات الطبيعية في الإدرار:

بالإضافة إلى الماء يحتوي الإدرار على مجموعتين من المكونات , مركبات غير عضوية ومركبات عضوية .

المركبات غير العضوية :

1- **الصوديوم** : أهم الأملاح اللاعضوية في الإدرار هو كلوريد الصوديوم ويرتبط وجوده وتركيزه بنوع المواد الغذائية التي يتناولها الإنسان . تبلغ كمية الملح المطرود في اليوم حوالي 8-15 غرام .

2- **البوتاسيوم والكالسيوم والمغنيسيوم** : مصدر أملاح البوتاسيوم الداخلة للجسم البشري هي الأغذية النباتية , ويبلغ ما يطرده الجسم يوميا 1.5 مرة اقل من الصوديوم, أما ما يطرد من كاتيونات الكالسيوم والمنغنسيوم فيقدر بحوالي 0.1 – 0.2 غرام يوميا .

3- **الأمونيا** : تطرح الأمونيا مع الإدرار على شكل أملاح أمونيوم ,وتزداد نسبة ما يطرح من هذه الأملاح في الإدرار عند الإصابة بالحماض Acidosis كما هو الحال عند مرضى السكري .

4- **الكبريتات** : تنشا الكبريتات بصورة رئيسية من الكبريت الموجود في الأحماض الامينية مثل السستائين Cysteine السستين Cystine والمثيونين Methionine. وتبلغ كمية الكبريتات المطروحة يوميا مع الإدرار 2.5 – 3.0 غرام .

5- **الفوسفات :** مصدر الفوسفات هي المواد الغذائية وجزء أخر يأتي من عمليات تفكك المركبات العضوية المحتوية على الفسفور مثل البروتينات الفسفورية والنووية والدهون الفسفورية . تبلغ كمية الفوسفات المطرودة يوميا في الإدرار حوالي 4.0 غرام , وتزداد هذه الكمية المطرودة في حالات السرطان .

المكونات العضوية

1- **اليوريا** : تصنع اليوريا في الكبد من الأمونيا نتيجة نزعها من الأحماض الامينية . وهذا الاصطناع الحيوي هو الوسيلة الرئيسية لطرد النتروجين الزائد في الجسم . وتعتبر اليوريا من أهم النواتج النهائية لعمليات أيض البروتينات . وتعتمد كمية اليوريا المطرودة يوميا على كمية بروتينات الغذاء .ففي ظروف التغذية الاعتيادية تبلغ كمية اليوريا المطرودة مابين 25- 43 غرام / يوم وتزداد الكمية في مرضى السكري وتنخفض في أمراض الكبد (تليف , سرطان , ..). فالخلل الطارئ على وظائف الكبد يمكن أن ينعكس على عمليات اصطناع اليوريا . كذلك تقل كمية اليوريا في الإدرار وتزداد في الدم في حالة حدوث خلل في وظائف الكلى الإفرازية.

2- **حامض اليوريك** : وهو ناتج نفاياتي ينتج من أيض البيورينات (أدنين وكوانيين) الغذائية أو التي تم اصطناعها داخل الجسم أو تكسر الأحماض النووية الداخلية. يطرح الجسم يوميا ما مقداره 0.6 – 0.7 غرام أما عن طريق الإدرار أو عن طريق الهدم من قبل بكتريا الأمعاء. وتزداد الكمية المطرودة من الجسم بزيادة الأغذية الغنية بمركبات البيورينات وفي الحالات المرضية مثل اللوكيميا والحالات الحادة لمرض الكبد ومرض النقرس .

3- **الأحماض الامينية:** تدخل الأحماض الامينية الحرة أو المرتبطة (ببتيدات قصيرة) في تركيب الإدرار ولكن بكميات صغيرة . وهنالك أحماض أمينية توجد في الإدرار بكميات كبيرة مثل الهستدين وحامض الكلوتاميك . أما الأحماض الامينية التي توجد بكميات قليلة هي المثيونيين , الفينايل الانين . وفي الحالات المرضية تزداد كمية الأحماض الامينية المطرودة من البول .

لا تنفذ الأحماض الامينية من الكبيبات الكلوية وان حدث فانه يعاد امتصاصها من قبل الانابيب الكلوية القريبة . وفي حالة الأمراض الكلوية يكون امتصاص الأحماض الامينية ضعيفا مما ينتج عنه البول الحمضي الاميني Aminoaciduria ومثال ذلك حالة البول السستيني Cystinuria وهي حالة فشل إعادة امتصاص الأحماض الامينية ثنائية القاعدية التالية : السستين , اللايسين , الارجنين , الاورنيثين .

4- **الكرياتين والكرياتنين : Creatine and Creatinine**

تعمل فوسفات الكرياتين كمخزن عال الطاقة إذ تتحول بسرعة إلى ATP في العضلات والأنسجة الأخرى :

$$CrP + ADP \rightarrow Cr + ATP$$

(كرياتين = Cr)

يصطنع الكرياتين في الكبد والبنكرياس من ثلاثة أحماض أمينية هي الارجنين والكلايسين والمثيونين . وينتشر بعد الاصطناع في الأوعية الدموية وبالتالي تمد لأنواع كثيرة من الخلايا وخاصة خلايا العضلات حيث يتم فسفرته . تصل كمية الكرياتين وفوسفات الكرياتين إلى 400 ملغرام / 100 غرام عضلات طازجة . ويتحول كل من هذين المركبين بصفة مستمرة الى كرياتنين بمعدل 2% يوميا. يعتبر الكرياتنين ناتج نفاياتي يطرد عن طريق الكلى بترشيحه عن طريق الكبيبات ولا يعاد امتصاصه من قبل الأنابيب الكلوية لذلك يخرج مع الإدرار . يزداد الكرياتنين في الدم في حالة الفشل الكلوي , فإذا زاد عن 2-4 ملغم/ 100 مل دل على تلف معتدل إلى شديد الكلى .

المكونات غير الطبيعية في الإدرار

تظهر في عدد من الحالات المرضية بعض المركبات التي لا وجود لها في الحالة الطبيعية . إن تحديد وجود هذه المواد له أهمية سريريه بالغة بحيث يمكن تشخيص الحالة المرضية وبدقة من خلال التقدير الكمي لأحد المكونات تلك . والتي تشمل :

أولا : فحص السكر في الإدرار Glycosuria test

وجود السكر بالإدرار يحدث عند الإصابة بمرض البول السكري Diabetes M. الذي يتميز بعجز الجسم عن الانتفاع من السكر فيطرح خارجا مع الإدرار على شكل كلوكوز . ومن الجدير بالذكر إن الكلوكوز يبدأ ظهوره في الإدرار عندما ترتفع نسبته بالدم عن 180 ملغم / 100 مل عندئذ سيعبر سكر الكلوكوز الحاجز الكلوي Renal threshold ويخرج مع الإدرار ويطلق عليه Glycosuria الذي يمكن الكشف عنه باستخدام كاشف فهلنك أو كاشف بندكت . ومن أهم أعراض المرض :

- زيادة العطش وجفاف الفم .
- الإجهاد السريع .
- الشعور بالجوع والضعف العام .
- زيادة السكر وظهوره في الإدرار .
- التهاب اللثة واللسان وغيرها .

وهنالك حالات يظهر بها السكر بالإدرار وهي لا تتعلق بالبول السكري مثل :

- ظهور سكر اللاكتوز بالإدرار Lactosuria أثناء الحمل والرضاعة .
- ظهور السكر الكبدي Hepaturia نتيجة لعدم قدرة الكبد على خزن السكر .

علما بان كل من الوراثة والبدانة ونقص الأنسولين تعتبر من أهم الأسباب المساعدة على الإصابة بالبول السكري .

ثانيا : فحص البروتين

توجد البروتينات في إدرار الإنسان في الحالة الطبيعية بكميات ضئيلة جدا , إلا انه في حالة التهاب الكليتين يظهر بروتين الألبومين في الإدرار وتوصف هذه الحالة بالتبول الألبوميني Albuminuria .حيث يغادر بروتين الألبومين المجرى الدموي ليتسرب من خلال المرشحات الكلوية التي حل بها التلف وينزل مع الإدرار . أن النسبة الطبيعية للبروتين بالإدرار تبلغ 150 ملغم / لتر / 24 ساعة أو 20 ملغم / لتر عشوائيا .

هنالك بروتينات من نوع خاص تدعى بروتينات بنس جونس Bence Jone's تظهر بشكل خاص في حالة وجود الأورام الخبيثة واللوكيميا وخاصة تلك التي تصيب خلايا البلازما . ولهذا البروتين خواص مميزة إذ انه يترسب عند تسخين الإدرار إلى 50 – 60 C° ثم يعود للذوبان إذا ارتفعت درجة الحرارة إلى 80 C° فإذا برد الإدرار الساخن مرة أخرى فان بروتين بنس جونس تترسب عند درجة 50 – 60 C° على حد سواء .

ثالثا : الأجسام الكيتونية

في حالة الإصابة بمرض البول السكري لا يمكن لسكر الكلوكوز أن يتأكسد لإعطاء الطاقة اللازمة فتعتمد خلايا الجسم على أكسدة الدهون للحصول على الطاقة كتعويض للنقص الحاصل بأكسدة الكلوكوز . تسمى هذه الحالة بالايض الهرمي غير الطبيعي للدهون وينتج من هذه العملية (1) حامض ثنائي الخليك (2) الأسيتون (3) حامض البيتا هيدروكسي بيوتاريك. وعند ظهور أحد هذه الأجسام الكيتونية أو جميعها في الإدرار تسمى الحالة Ketosis . كذلك يمكن أن تظهر هذه الأجسام الكيتونية في حالات الجوع أو تناول كميات من الدهون بدون كربوهيدرات معها ,وكذلك حالات سوء التغذية والتقيؤ .

تستخدم حاليا شرائط Strips (keto stix) لاختبار وجود الأجسام الكيتونية في الإدرار حيث تحتوي في تركيبها على Na-nitroprusside + Na_2SO_4 + Glycine فوجود الحامض الاميني كلايسين يساعد على تكوين مركب بنفسجي اللون بين الأجسام الكيتونية وناتروبرسيد الصوديوم .

تحليل الادرار الروتيني Routine urinalyssis

ان التحليل النموذجي للادرار يتطلب جمع العينات صباحا ويفضل قبل الافطار لانها تكون عينات مركزة بالمحتويات وذات تركيز هيدروجيني حامضي ، ويفضل اجراء فحوصات الادرار حال جمعه من المريض freshly spectimen.. لان الكلوكوز (ان وجد) يتضاعف تحلله بفعل البكتريا طالما بقيت العينة ، كما ان تحلل اليوريا بواسطة البكتريا يجعل الادرار قاعديا . اما اذا تعذر تحليله بنفس وقت جمع العينات فيفضل عندئذ حفظه في الثلاجة في عبوات نظيفة لحين التحليل .

هناك بعض التحليلات تتطلب حساب حجم البول المتراكم في (24 ساعة مثل حسابات فحص تصفية الكرياتنين لذلك يجب مراعاة مايلي :

يحفظ وعاء جمع الإدرار في الثلاجة أثناء فترة الجمع ويحسب حجم الإدرار المتراكم في 24 ساعة باستخدام اسطوانة خاصة لهذا الغرض أو يقاس الفرق بين وزن قنينة الإدرار وهي مملوءة بعينات 24 ساعة ووزنها وهي فارغة والفرق يكون مساوي لوزن الإدرار المتجمع والذي يضرب في الوزن النوعي للإدرار للحصول على حجم الإدرار الكلي .

☒ لإغراض التحليل العام الروتيني فيمكن استخدام عينة الإدرار في أي وقت من اليوم وهذا ما تقوم به معظم مختبراتنا.

إن التحليل النموذجي للإدرار يتضمن :

1. فحوصات فيزياوية *physical tests* : الكمية، فحص اللون و الشفافية ، ، الكثافة النوعية ، التركيز الهيدروجيني ، ولختبار الرواسب الظاهرة للعين .
2. فحوصات كيماوية *chemical tests* : السكر، البروتين ، الأجسام الكيتونية ، الكرياتنين ، الأجسام الصفراء .
3. فحوصات حصى الادرار *urincalculi tests*: وتشمل فحص انواع الحصوات التي تظهر بالادرار ومكوناتها .
4. فحوصات تحت مجهرية *microscopic tests* : ويتم فيها ملاحظة الرواسب التي تظهر بالإدرار وتشخيصها .
5. تحضير أوساط بكتيرية خاصة *bacterioligical tests*

اختبارات وظيفة الكلية Kidney function tests

الفحوصات الفيزياوية Physical tests

أ- الحجم او الكمية Volume or Quantity:

حجم وكمية الإدرار يعتمد على كمية السوائل ونوع الطعام المأخوذين. تتراوح الكمية الطبيعية بين 1200-1500 مل/ 24 ساعة .وتكون الكمية المطروحة اثناء النهار أكبر منها ليلا.

- *تحدث حالة زيادة الإفراز Increased excretion* نتيجة شرب السوائل بكثـــرة أو في حالة مرض البول السكري (poly urea) . أو في حالة التهاب الغدة الدرقية .
- *قلة إفراز الإدرار Diminished excretion* تحدث نتيجة قلة بتنـــاول الســـوائل أو بسبب الإسهال diarrhea، التقيؤ vomiting والحمى fever .
- *أما احتباس الإدرار Unuria:* فيحصل نتيجة فشل بإنتاج اليوريا أو توقـــف الإدرار الكامل نتيجة وجود حصى بالمجاري البولية.

ب- اللون والشفافية Color & Clarity:

يكون الإدرار الطبيعي شفاف ذو لون أصفر فاتح ويوصف بأنه Clear ،أما إذا كان الإدرار مضبب clowdy فيكون السبب وجود قيح أو أملاح متبلورة مثل اليوريت او الفوسفات(للتأكد من سبب الضبابية يرشح الادرار فأذا بقى نقي بعد الترشيح فهذا يعني وجود أملاح فوسفاتية أو أملاح اليوريت urate أو الأوكزالات) .اما اذا كان الادرار عكرا بشكل غير طبيعي ، فقد يرجع السبب اما لوجود كميات كبيرة من الخلايا(حمراء ، بيضاء او مخاطية) ، او لوجـــود البكتريا . ان المصطلحات الدارجة لوصف مدى شفافية الادرار هـــي "شـــفاف clear " ، "مضبب cloudy" او "عكر turbid " .ان لون الادرار الطبيعي لشخص سليم يعود ســـببه الي وجود صبغات , urochrome ويتراوح لونها من عديمة اللون - اصفر غـــامق ، تبعا لتركيز عينة الادرار ، اذ كلما كانت اكثر تركيزا ، مالت الى الاصفر الغامق وبالعكس. الجدول التالي يوضح العلاقة مابين لون الادرار والسبب المعتاد لذلك التلون :

السبب الاعتيادي	اللون
وجود صبغة اليوري Urochrome	أصفر (فاتح – غامق)
انخفاض بتركيز الإدرار	عديم اللون
وجود دم قد يكون بسبب نزف بأحد أجزاء الجهاز البولي	بني داخن
وجود تقيحات ، بكتيريا بأحد أجزاء الجهاز البولي، خلايا جراحية	فضي لامع أو حليبي
مرض الملاريا	اسود
وجود مادة الصفراء	أصفر ذو رغوة
نتيجة تناول عقاقير مختلفة مثل الانتراسين، المثيلين الأزرق، او أقراص الحديد على التوالي، حسب ترتيب الالوان المذكورة	برتقالي، أخضر، رمادي
وجود مادة بورفرين	وردي فاتح

ج- الوزن النوعي (sp.gr.) Specific gravity :

يعتمد الوزن النوعي على كثافة ، ووزن المواد المذابة في الادرار.(بالنسبة للادرار فان الوزن النوعي له هو النسبة بين وزن حجم معين من البول ووزن نفس الحجم من الماء.

الوزن النوعي أو الكثافة النوعية للإدرار الطبيعي تكون متغيرة على مدى اليوم . ولكن عادة يكون الوزن النوعي مابين 1.008–1.025 اما اذا حدث اختلاف فيرجع سببه الى :

- *يزداد الوزن النوعي للإدرار بحالات:* التهابات الكلية Nephritis، قلة بتناول السوائل و ظهور الكلوكوز(البول السكري Diabet. M) او البروتين .
- *يقل الوزن النوعي للإدرار بحالات:* التهاب الكلية المزمن Chronic nephritis ، كثرة تناول السوائل. غالباً ما يستخدم جهاز urinometer الموضب لقياس الوزن النوعي او تستخدم الشرائط strips والحبوب tablets المعدة لاختبارات الادرار والتي تكون بهيئة شريط بلاستيكي له طرف يشبه الوسادة يحمل مزيج المواد الكيماوية او حبوب تخلق فيها المواد الكيماوية ، ان النتيجة الايجابية في هذه الحالة تتميز بظهور الوان محددة نسبة الى الوان مرجعية .

د – فحص الحموضة pH :

ان التركيز الهيدروجيني للادرار يتغير من 4.5 – 8 ويقترب من الرقم الحامضي 5.5 بالحالة الطبيعية .ان الادرار الصباحي يكون عادة حامضي وعند تركه فترة من الوقت يتحول إلى قاعدي نتيجة تحلل اليوريا إلى أمونيا. كما أن تناول بعضاً من الأدوية تغير من قيمة pH للإدرار.

- *الحموضة العالية Acidurine* تحدث في : البول السكري (D.M.)،تناول اللحوم والخبز بكثرة (بسبب تكوين حامض الكبريتيك والفوسفوريك)، أوعند تناول فواكه حمضية.

- *أما القاعدية العالية Alkaline urin* فتحدث في: احتجاز الإدرار Unuria(قد يشير الى تلف كلبوي) أوعند تناول الخضروات(بسبب تكون الكاربونات القاعدية).

طريقة العمل Method :

اغسل ورقة اللتموس المتعادلة بكمية صغيرة من الإدرار ثم انتظر لمدة ½ دقيقة ثم سجل اللون الظاهر، إذا كان : – اللون وردي فهذا يعني أن الإدرار حامضي ،

– اللون أزرق فالإدرار قاعدي.

–لم يحدث تغيير لوني فالإدرار متعادل.

وممكن استخدام الشرائط التجارية لقياس الحموضة.