معايرة البروتينات الكلية في الدم

Determination of Total Proteins in Blood

البروتينات عبارة عن مركبات عضـوية آزوتية عالية الوزن الجزيئي، تتألف جزيئاتها من ارتباط وحدات بنيوية صـغيرة نسـبياً هي الحموض الأمينية، التي ترتبط مع بعضـها البعض بروابط مشـتركة تسـمى الروابط الببتيدية. للبروتينات أهمية بيولوجية كبيرة في جسـم الكائن الحي فهي تشـكل الجزء الأكبر من المادة الحية كما أنها تقوم بالعديد من الوظائف الحيوية الهامة.

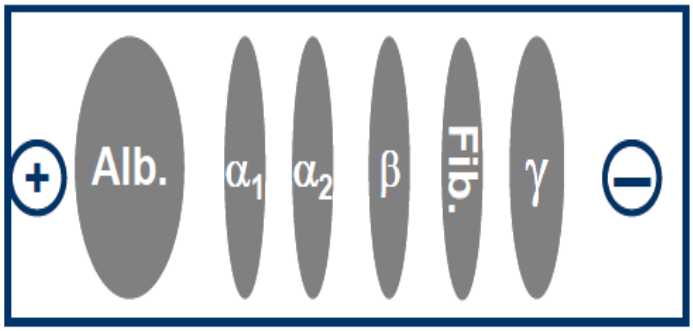
يتكون الدم من جزء خلوي (الكريات البيض والحمر والصفيحات الدموية) معلق ضمن وسط سائل يدعى البلازما.

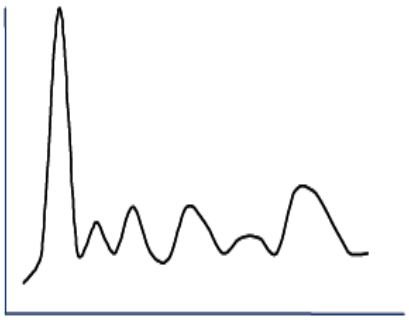
تتكون البلازما من بروتينات بنسـبة7% وغلوكوز ودهون ومواد عضـوية (حمض البول واليوريا والكرياتين و...) ومواد غير عضوية (شوارد الصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم والكلور و...).

تتوزع بروتينات الدم (الألبومين والغلوبولينات(α_1 وα_2 وβ وγ) والفبرينوجين) ما بين الخلايا والبلازما وتختلف عن بعضـها البعض بحسـب أوزانها الجزيئية ووظائفها وعدد ونوع الحموض الأمينية التي تدخل في تركيبها، وتعد جميع بروتينات البلازما هي بروتينات سكرية باستثناء الألبومين.

تُفصـل البروتينات عن بعضـها البعض بعدة طرق اعتماداً على خصـائصـها المختلفة كالحجم والشـحنة، أكثر الطرق شيوعاً الفصل بالرحلان الكهربائي الذي يعتمد على تطبيق تيار كهربائي بشدة معينة على المحلول المُحمل على وسط داعم (ورق ترشيح أو سيللوز أو هلام) فتتحرك البروتينات نحو القطب الموجب أو السالب (حسب شحنتها) وبسرعات مختلفة (حسـب كتلتها وحجمها)، فإذا وضـعت البروتينات في وسـط قلوي تصـبح سـالبة الشـحنة وتتحرك نحو القطب الموجب اعتماداً على كتلتها، بعد ذلك يضـاف كاشـف لوني فتظهر البروتينات كأشـرطة ملونة وباسـتخدام مقياس الطيف الضوئي يتم رسم مخطط الرحلان البياني وإعطاء النتائج بالأرقام.

بهذه الطريقة يتم فصـل بروتينات البلازما إلى الألبومين (الأقل كتلة) والغلوبولينات والفيبرينوجين الذي يتوضـع بين الغلوبولينات بيتا وغاما.





الألبومين المكون الرئيس للبروتين الكلي حيث يشـــكل حوالي ثلثي إجمالي البروتينات، ويعتبر أقل البروتينات وزناً جزيئياً يتجدد بسـرعة حيث يبلغ عمر النصـف له 19 يوم. يسـاهم في الحفاظ على الضـغط الحلولي للدم وعلى pH الدم كونه يعمل كمحلول منظم (موقي) نتيجة طبيعته الإمفوتيرية، يســـاهم بنقل المركبات (حمض البول والحموض الدهنية والشـــوارد المعدنية والهرمونات والفيتامينات) أيضـــاً يقوم بنقل مادة البيلروبين من أماكن تكوينها إلى الكبد ليتم فيما بعد إخراجها عبر العصارة الصفراوية.

معظم بروتينات البلازما تُصـــنع في الكبد وتفرز عبر الخلية الكبدية باســـتثناء غلوبولين γ يصـــنع في كريات الدم البيضـــاء الموجودة في الأنســـجة والخلايا اللمفاوية، أما رشـــح البروتينات في الكبيبات الكلوية يعتمد على حجمها وشـحنتها الكهربائية لذا لن يرشـح الفيبرينوجين والغلوبولينات في البول السـوي أما الألبومين يرشـح بكميات قليلة جداً لا يمكن كشفها باختبار التخثر ومع ذلك يبقى هو الأكثر قابلية للرشح في الحالات المرضية.

<u>أهمية البروتينات</u>

للبروتينات أهمية كبيرة في الجسم حيث تساهم بوظائف متنوعة منها:

وظيفة بنيوية أو هيكلية (كولاجين النســـيج الضـــام)، وظيفة النقل (كعملية نقل الأكســـجين الجزيئي بواســـطة الهيموغلوبين)، وظيفة دفاعية (كالغلوبولينات المناعية التي تؤمن تثبيط الفعالية الحيوية للأجســام الغريبة والحفاظ على الحالة الطبيعية للجسم)، وظيفة الحركة والتقلص (تسـاهم البروتينات في عملية التقلص والاسـترخاء العضـلي)، وظيفة وساطية (جميع الوسطاء الحيوية المعروفة عند الكائنات الحية هي عبارة عن مركبات بروتينية).

لا يوجد إنزيمات في البلازما إلا إنزيمات التجلط وأي وجود لإنزيمات أخرى يكون مصـــدرها من الخلايا المتموتة، وبالتالي فإن زيادة تلك الإنزيمات هي مقياس على زيادة معدل تدمير الخلايا ودليل على وجود مرض في العضـــو الذي يشـتق منه الإنزيم الزائد في الدم (مثال زيادة الأميلاز دليل على التهاب البنكرياس، زيادة الفوسـفاتاز القلوي دليل على التهاب الصفراء).

<u>أهمية معايرة البروتينات</u>

للتحري عن وظائف الكبد (تصنيع) ووظائف الكلية (إطراح) وكذلك عن نشاط الخلايا المصورية (تصنيع الأضداد).

هناك حالات خاصـة يتم فيها قياس بروتينات محددة لتشـخيص أمراض معينة كالترانسـفيرين والفيريتين في تقييم حالات الحديد والبروثرومبين والفبرينوجين لتقييم وظيفة التخثر.

القيم المرجعية

يبلغ المســـتوى الطبيعي للبروتينات الكلية 6–8 غ/د.ل، ترتفع قيم البروتينات عن المســـتوى الطبيعي لها في حالات التجفاف والورم النقوي العديد والأمراض المناعية والانتانات المزمنة.

وتنخفض في حالات القصور الكبدي وسوء التغذية وسوء الامتصاص والأمراض الكلوية (يزداد الرشح الكبي) وزيادة التقويض وزيادة حجم الدم خلال الحمل.

معايرة البروتينات

يمكن معايرة البروتينات في المصـــل أو البلازما، ويتم الحصـــول على البلازما بأخذ عينة الدم في أنبوب يحتوي على (الهيبارين أو سيترات الصوديوم أو فلورايد الصوديوم أو EDTA) مما يمنع التخثر ويبقى البروثرومبين والفيبرينوجين، أما المصـل يتم الحصـول عليه بعد ترك الدم يتخثر في الأنبوب حيث يتحول البروثرومبين والفبرينوجين إلى الثرومبين والفيبرين ولم يعودا موجودين في المصل. بالتالي بروتينات البلازما = بروتينات المصل + الفيبرينوجين والبروثرومبين.

تفاعل البيوريت

تتم معايرة البروتينات وفق طريقة النقطة النهائية حيث يعتمد مبدأ المعايرة على ارتباط ذرات الأزوت (بروابط مشـتركة) والأكسـجين (بروابط تسـاندية) في البروتين مع شـوارد النحاس الموجودة في كاشـف يدعى كاشـف البيوريت (كبريتات النحاس في وسـط قلوي) ليتشـكل معقد ذو لون بنفسـجي تزداد شـدته اللونية مع ازدياد عدد الروابط الببتيدية (أي مع ازدياد تركيز البروتين).

طريقة العمل: تتم الإضافات في الأنابيب الثلاثة بالترتيب وفق الجدول التالي:

تسلسل الإضافة	الأنبوب -1 B	الأنبوب -2 St	الأنبوب -3 x
كاشف البيوريت	1000 µl	1000 µl	1000 µl
ماء مقطر	20 µl	.....	.....
العياري Stander	.....	20 µl	.....
العينة Sample	.....	.....	20 µl

تُمزج المحاليل جيداً وتحضن لمدة **10 دقائق** بدرجة الحرارة الغرفة ثم تقاس شدة امتصاص المحاليل OD عند **546 نانو متر** باستخدام مقياس الطيف الضوئي في المجال المرئي.

يحسب تركيز البروتين في العينة المجهولة مقدراً بـ (غ/د.ل) باستخدام العلاقة التالية: $Cx = \frac{ODx}{OD\ st} \times Cst$

حيث أن Cst تركيز محلول بروتين الألبومين العياري ويســـاوي 6 غ/د.ل، ODx امتصـــاصـــية العينة المجهولة، ODst امتصاصية العينة العيارية.