جامعة دمشق
كلية الطب البشري
قسم الطب المخبري

دراسة معولية طريقة التعطيل بالحرارة لتحديد طراز النظائر الأنزيمية للLDH في اليرقانات الناجمة عن فاقات الدم الانحلالية والآفات الكبدية

Study of reliability of heat inactivation method for determining LDH Izoenzymes patterns in jaundices caused by hemolytic anemia and hepatic diseases

بحث علمي أعد لنيل شهادة الدراسات العليا (الماجستير) في الطب المخبري

إعداد
د.ميرنا أحمد شلوف

رئاسة
أ.د.رويدة أبو سمرة

إشراف
م.د. نزار الدين كشكة

كلمة شكر

❖مخطط الدراسة

☒ **الدراسة النظرية:**

I. مقدمة عامة.
II. بنية نازع هيدرجين اللاكتات
III. آلية عمل أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات
IV. الوظيفة التحفيزية لنازع هيدرجين اللاكتات والعوامل الناظمة
V. القيم المرجعية لنازع هيدرجين اللاكتات
VI. الأهمية التشخيصية لنازع هيدرجين اللاكتات
VII. النظائر الأنزيمية لنازع هيدرجين اللاكتات

i. مقدمة عامة
ii. بنية نظائر الأنزيم
iii. تفريق نظائر الأنزيم
iv. القيم المرجعية لنظائر الأنزيم
v. الأهمية السريرية لنظائر الأنزيم

☒ **الدراسة العملية**:

I. هدف البحث
II. أساس البحث
III. المرضى والطرائق

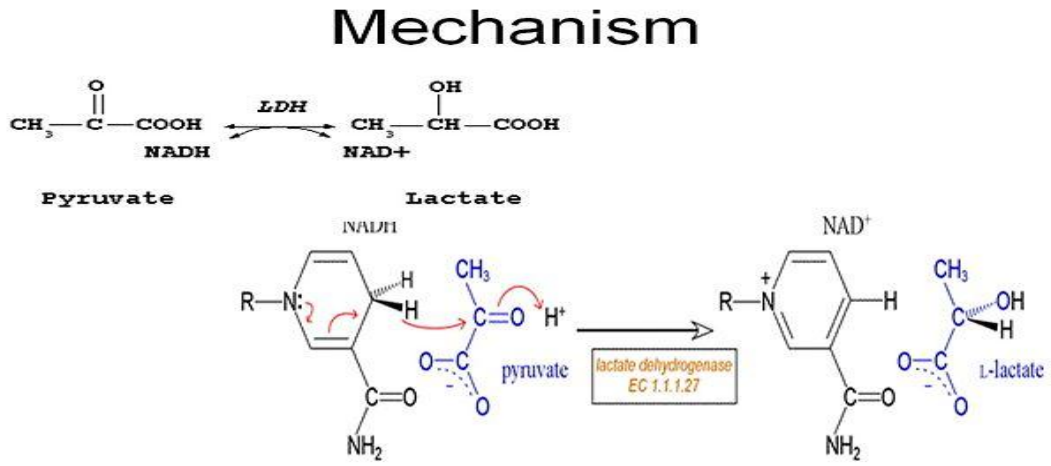
- مدة الدراسة
- مكان الدراسة
- مجموعة الدراسة
- طريقة التثبيط بالحرارة

IV. النتائج
V. المناقشة.
VI. الدراسات المقارنة
VII. الخلاصة

☒ **التوصيات والمقترحات.**
☒ **المراجع.**

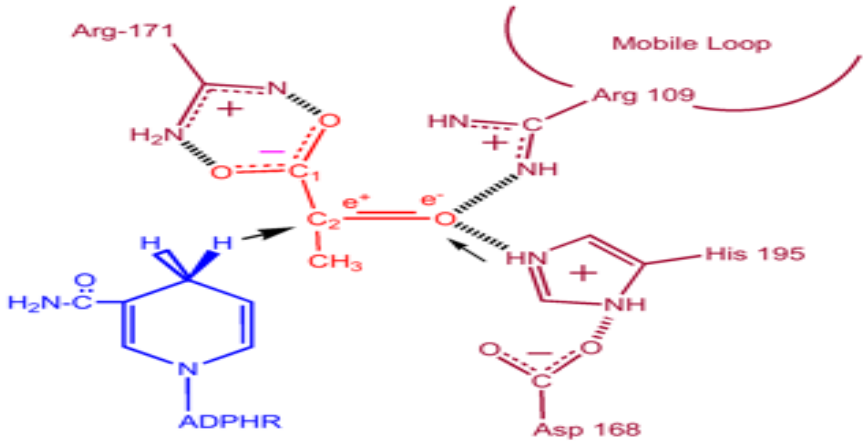
I. مقدمة عامة Introduction [٢]:

- نازع هيدروجين اللاكتات (Lactate Dehydrogenase):هو أنزيم داخل خلوي ناقل للهيدرجين يوجد بالإضافة لجسم الإنسان في النباتات، الحيوانات وحتى بدائيات النوى .(١)



الشكل (١). آلية عمل نارع هيدرجين اللاكتات

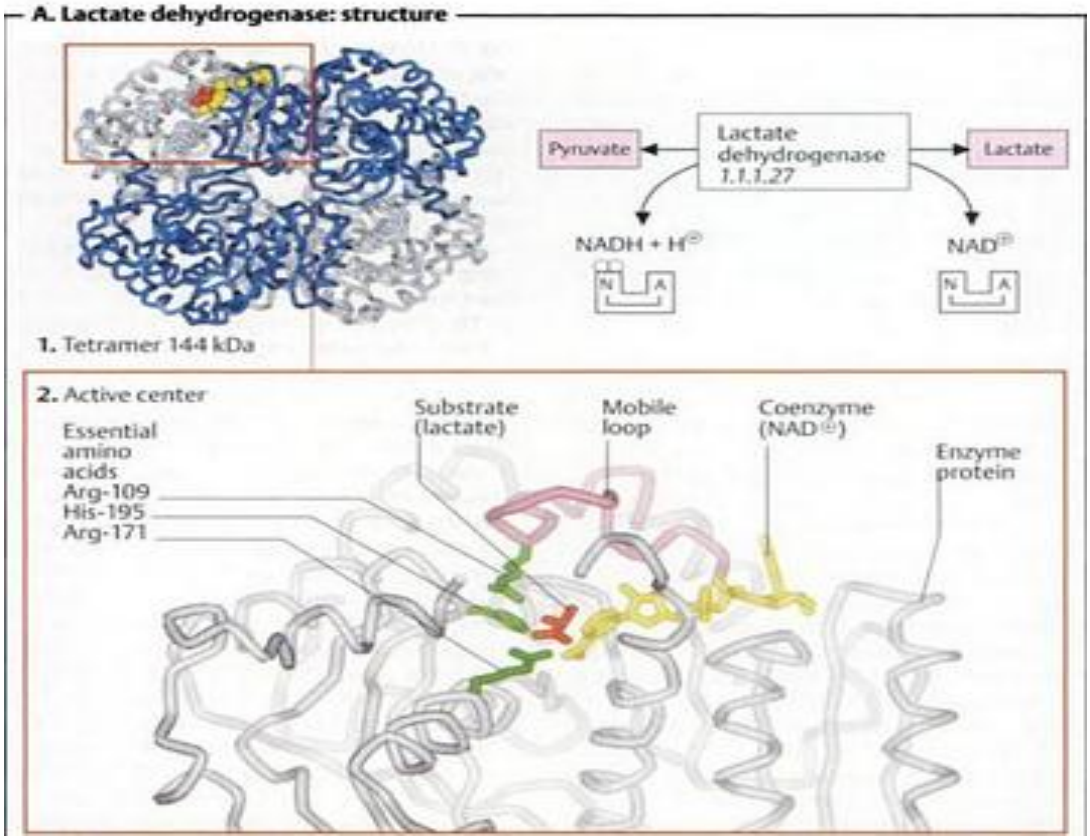
- لأنزيم نازعة هيدروجين اللاكتات أهمية طبية لأنه يوجد بشكل واسع في أنسجة الجسم، مثل كريات الدم وعضلة القلب، الكبد وغيرها، ولأنه يتحرر خلال الأذية النسيجية، اعتبر هذا الأنزيم واسم في العديد من الأمراض والأذيات الشائعة.
- نازعة الهيدرجين (Dehydrogenase) هو أنزيم ينقل الهيدريد من جزيئة لآخرى. تحفز نازعة الهيدرجين اللاكتانية التفاعل العكوس- تحول البيروفات إلى لاكتات - حيث أنها تحول NADH إلى +NADوبالعكس



الشكل (٢). بنية أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات

II. بنية نازع هيدرجين اللاكتاتThe Structure of LDH: (٨)

- الشكل الفعال من نازع هيدرجين اللاكتات (**كتلة ١٣٤- ١٤٤ كيلودالتون**) هو (**رباعي القسيماتTetramer**) ويتألف من أربع وحدات جزئية (تحت وحدة subunit) تشغل مواقع متكافئة.
- كل قسيم مكون من سلسلة ببتيدية تحوي ٣٣٤ حمضاً أمينياً (**٣٦ كيلودالتون**).
- اعتماداً على الحالات الاستقلابية، يحفز هذا الأنزيم إرجاع البيروفات المعتمد على NADH إلى لاكتات، أوأكسدة اللاكتات المعتمد على +NAD إلى بيروفات.
- المركز الفعال للوحدة الجزيئية لنازع هيدرجين اللاكتات موضح في الشكل التالي. العمود الفقري للببتيد موضح بأنبوب **أزرق** وكذلك تظهر في المخطط ركيزة اللاكتات **الموضح باللون الأحمر**، تميم الأنزيم +NAD الموضح باللون **الأصفر**، وثلاث سلاسل جانبية للحموض الأمينية. (أرجينين– ١٠٩ ، أرجينين– ١٧١ ، هيستيدين– ١٩٥: **الموضح باللون الأخضر**، والتي تتدخل في التفاعل بشكل مباشر.
- عروة الببتيد الموضح باللون **الزهري** المكونة من ثمالات الحموض الأمينية ٩٨ – ١١١ الموضحة أيضاً في الشكل.
- في غياب التميم الأنزيمي والركيزة، تكون هذه البنية الأنزيمية مفتوحة وتسمح بالوصول لموضع ارتباط الركيزة (غير موضحة في الشكل)، في مقعد أنزيم –لاكتات - +NAD الموضح، تغلق عروة الببتيد المركز الفعال.



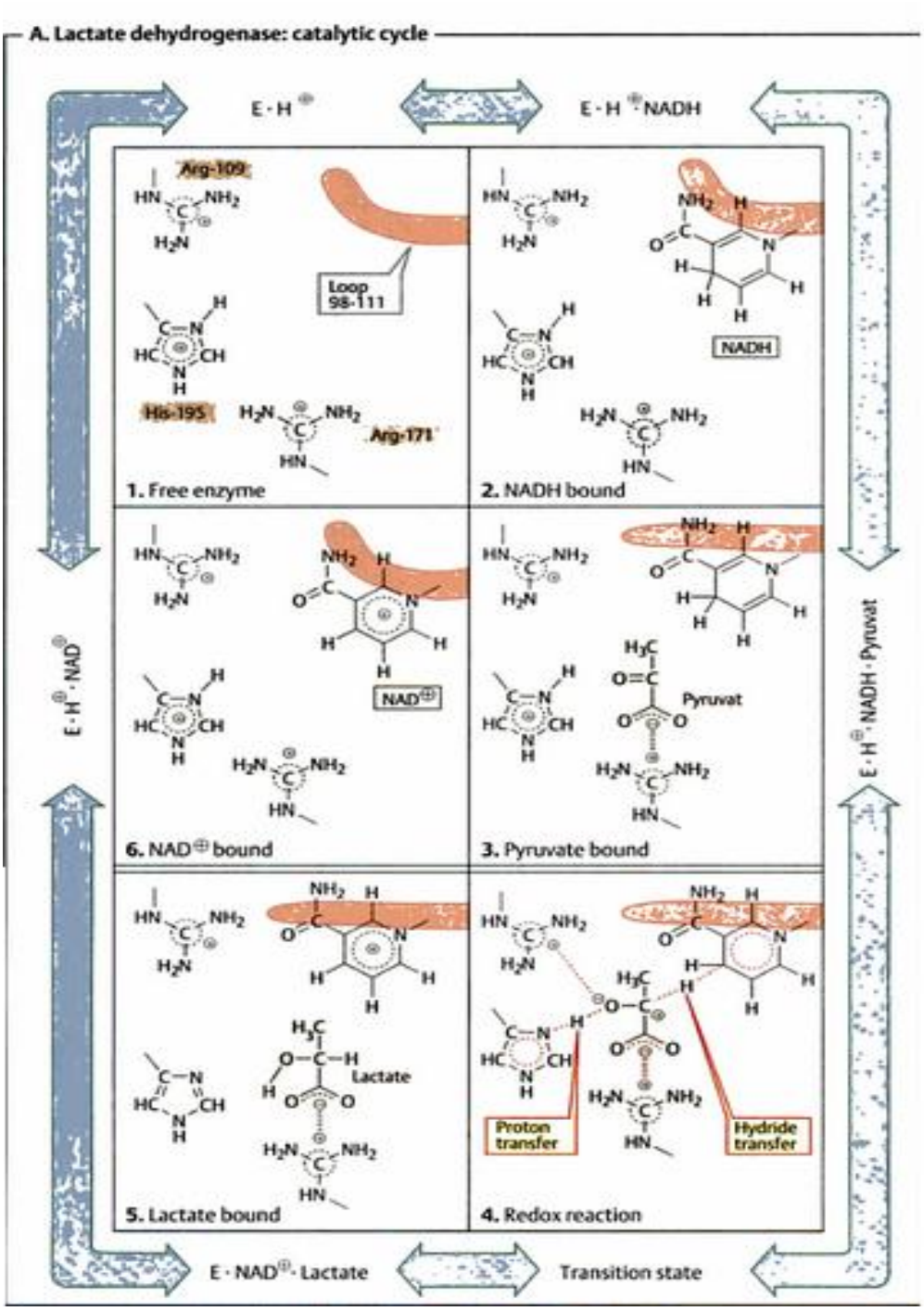
الشكل (٣). بنية أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات

III. آلية عمل نازع هيدرجين اللاكتات Mechanism of LDH Action

➢ دورة LDHالتحفيزية (التفاعلية) (٢)

- يحفز LDH نقل أيونات الهيدريد من اللاكتات إلى +NAD أو من NADH إلى البيروفات.
- يفضل توازن التفاعل بقوة تشكيل اللاكتات، على كل حال، عند وجود تراكيز عالية من اللاكتات و +NAD، تحدث أكسدة اللاكتات إلى بيروفات. يحفر نازع هيدرجين اللاكتات التفاعل في الاتجاهين لكن مثل كل الأنزيمات، ليس له أي تأثير على التوازن الكيميائي.
- لأن التفاعل عكوس، يمكن اعتبار العملية التحفيزية عروة مغلقة، تعود الدورة التحفيزية هنا لنازع هيدرجين اللاكتات إلى ست لقطات. الخطوات البينية في التفاعل كتلك الموضحة هنا قصيرة المدة جداً ولذلك من الصعب تحديدها، وتم استنتاج وجودها من عدد كبير من الموجودات التجريبية (مثال قياسات حركية وقياسات ترابطية).
- *يلعب العديد من بقايا الحموض الأمينية دوراً في مركز تفاعل نازع هيدرجين اللاكتات، حيث يمكنها توسط ربط الركيزة أو تميم الأنزيم أوتلعب دوراً في إحدى الخطوات في الدورة التفاعلية مباشرة (يظهر المخطط العديد من بقايا الحوض الأمينية).*
- مجموعة غوانيدينيوم الأرجينين- ١٧١ المشحونة إيجابياً تربط مجموعة كربوكسيلات الركيزة بواسطة تفاعل كهربائي ساكن. تعمل مجموعة إيميدازول الهيستيدين- ١٩٥ في التفاعل الحمضي القلوي والسلسلة الجانبية للأرجينين-١٠٩ هامة في تثبيت الحالة الانتقالية. بخلاف الهيستيدين- ١٩٥ الذي يغير شحنته خلال التفاعل التحفيزي، الاثنان الأساسيان من بقايا الأرجينين تنقل البروتون بشكل مستمر. إضافة لهذه البقايا الثلاثة. عروة الببتيد ٩٨ – ١١١ موضحة في الشكل، وظيفتها إغلاق المركز الفعال بعد ربط الركيزة والتميم الأنزيمي بحيث تستبعد جزيئات الماء بشكل كبير خلال نقل الالكترون.

- في الأنزيم الحر ينقل الهيستيدين– ١٩٥ البروتون (١). يوصف هذا الشكل من الأنزيم ب E.H+. يربط التميم الأنزيميNADH أولاً (٢)، تتبعه البيروفات (٣). من الهام أن يكون لمجموعة كاربونيل البيروفات في الأنزيم والموضع الفعال في حلقة النيكوتين اميد للتميم الأنزيمي موضعاً مثالياً نوعاً ما نسبة لبعضها البعض وهذا التوجيه يجب أن يصبح ثابتاً (التقارب وتوجيه الركائز). الآن تغلق العروة ٩٨ – ١١١ المركز الفعال. ينتج عن هذا نقص ملحوظ في القطبية والتي تجعل حال الانتقال أسهل (٤ = استبعاد الماء). في حال العبور، أيون الهيدريد-H، يُنقل من التميم الأنزيمي إلى كاربونيل كاربون (نقل المجموعة). الشحنة السلبية العابرة والغير محبذة بقوة – على الأكسجين والتي تحدث هنا تُثبت بقوة بواسطة التفاعل الساكن مع الأرجينين -١٠٩ (تثبيت حالة العبور) في نفس الوقت، ينقل البروتون من الهيستيدين– ١٩٥ إلى ذرة الأكسجين هذه (نقل المجموعة). مما يجعل الأنزيم يربط اللاكتات و+NAD(٥). بعد فتح العروة، تفترق اللاكتات عن الأنزيم، وبشكل مؤقت مجموعة الأيميدازول غير المشحونة في الهيستيدين– ١٩٥ مجدداً تربط البروتون من الماء المحيط (٦). أخيراً يتحرر التميم الأنزيمي المؤكسد +NAD وتستعاد الحالة الأولية (١).
- كما نلاحظ من المخطط أن البروتون الذي يظهر في مساواة التفاعل (+NADH + H)لا يرتبط مع NADH، لكن يرتبط بعد تحرر اللاكتات، يعني بين الخطوتين (٥) و(٦) من الدورة السابقة.
- كما ذكرنا سابقاً، اتجاه التفاعل العكوس لا يعتمد على الأنزيم وإنما على تراكيز كل المتفاعلات وقيمة PH.



الشكل (٤). آلية عمل أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات

IV. الوظيفة التحفيزية لنازع الهيدرجين اللاكتات والعوامل الناظمة: Catalytic Function of LDH and Regulating Factors (١٨,٢٠)

- يحفز هذا الأنزيم التحول البيني للبيروفات واللاكتات مع تحول بيني مرافق لثنائي نوكليوتيد النيكوتين أميد والأدنين المختزل(NADH) وثنائي نوكليوتيد النيكوتين اميد والأدنين +NAD. يحول هذا الأنزيم البيروفات، الذي هو المنتج النهائي لتحلل السكر، إلى لاكتات عندما يحدث نقص أوعوز للأكسجين، وكذلك يتواسط التفاعل العكوس خلال دورة كوري في الكبد،عند وجود اللاكتات بتركيز عالي.

- *العوامل المنظمة لعمل أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات:*

١. درجة الباهاء
٢. الحرارة
٣. تركيز الركيزة والدارئة

أ- بالنسبة لتحول اللاكتات إلى بيروفات بدرجة حرارة ٣٧ مئوية ، درجة الباهاء (PH) المثلى هي ٨.٨- ٩.٨ ويحوي مزيج التفاعل الأمثل لعمل نازع هيدرجين اللاكتات ،+NAD (٩ ممول/لتر) و L-لاكتات (٨٠ ممول/لتر).

ب- بالنسبة لتفاعل تحول البيروفات إلى لاكتات بدرجة حرارة ٣٧ درجة مئوية،درجة الباهاء المثلى هي ٧.٤ – ٧.٨ و NADH (٣٠٠ مكرومول/لتر) وبيروفات ٠.٨٥ ممول/لتر. (١٦)

- يتم تنظيم نازع هيدرجين اللاكتات أيضاً بواسطة التراكيز النسبية لركائزه. تصبح نازع هيدرجين اللاكتات أكثر فعالية خلال فترات النتاج العضلي المفرط بسبب الارتفاع في ركائز نازع هيدرجين اللاكتات. عندما تعمل العضلات بطاقة عظمى، تقود الحاجة للATP إلى تجمع ADP الحر، AMP وPi. يزيد تدفق حل السكر الناجم، خاصة إنتاج NADHوالبيروفات، قدرة نازعة هيدرجين البيروفات والأنزيمات الأخرى على استقلاب البيروفات.

V. القيم المرجعية لنازع هيدرجين اللاكتاتReference Values

تختلف قيمة فعالية الأنزيم باختلاف جهة التفاعل:
عندما يكون التفاعل اكسدة لاكتات الى بيروفات بدرجة حرارة ٣٧ مئوية تكون قيمة فعالية نازع هيدرجين اللاكتات (٨٠-٢٠٠) وحدة/لتر

بينما اذا كان التفاعل إرجاع البيروفات الى لاكتات بدرجة حرارة ٣٧ مئوية تكون قيمة فعالية نازع هيدرجين اللاكتات (٢٠٠-٤٠٠) وحدة/لتر

تختلف هذه القيم من مرجع لاخر

VI. الأهمية التشخيصية لنازع هيدرجين Importance of LDH (٧)

١. يطلب عيار نازع هيدرجين اللاكتات في الدم:

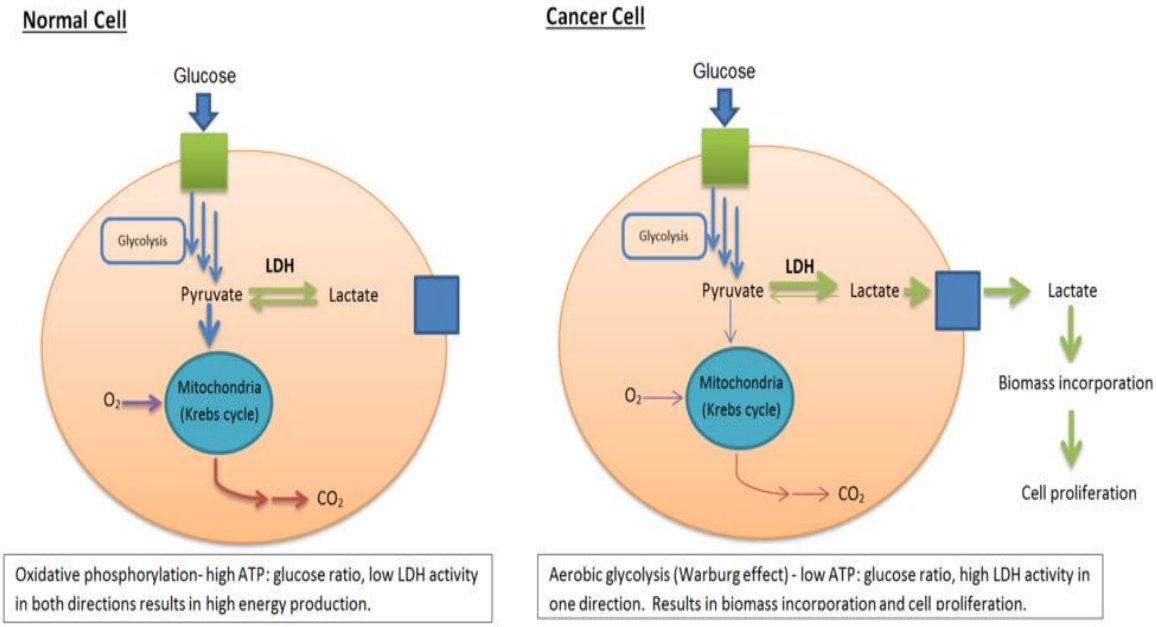
١. كمؤشر عام على وجود وشدة الأذية الخلوية أو النسيجية الحادة أوالمزمنة: يحرر تحطم النسج أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات من الخلايا لذلك يمكن أن يستخدم كمعيار لشدة التحطم وبالتالي عندما يشك الطبيب أن المرض يسبب درجة ما من الأذية الخلوية أوالنسيجية يطلب معايرة أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات. في حال كانت القيمة مرتفعة يطلب التحاليل الأكثر نوعية لتساعد في تشخيص الحالة وتحديد العضو المصاب.

٢. لتحديد ومراقبة الحالات المترقية: يرتفع أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات في الأمراض المترقية كفقر الدم الانحلالي والأخماج نتيجة التحطم الخلوي.
عند تشخيص هذه الحالات يطلب عيار نازع هيدرجين اللاكتات بفواصل منتظمة لمراقبة ترقي أوشفاء المرض

٣. الأورام : يساعد عيار الأنزيم في تحديد مرحلة الورم والإنذار ومراقبة العلاج (كيميائي).
يمكن للعديد من السرطانات أن ترفع مستويات الأنزيم لذلك يمكن أن يستخدم كواسم ورمي ولكن في الوقت نفسه يعتبر غير مفيد كواسم نوعي في أنواع معينة من السرطانات.
خلال متابعة علاج المريض الورمي يشير المستوى العالي لعدم استجابة المريض للعلاج ويعبر عن إنذار سيء (من حيث البقيا).

الخلايا السرطانية (٩) : نازع هيدرجين اللاكتات مشارك في بداية واستقلاب الأورام. تعتمد الخلايا السرطانية على التنفس اللاهوائي الذي يحول الغلوكوز إلى لاكتات حتى في الحالات التي يتوافر فيها الأكسجين بشكل كاف (العملية التي تعرف بتأثير فاربورغ). تُحفز عملية تحلل السكر التخميري بواسطة الشكل A من نازع هيدرجين اللاكتات. تسمح هذه الآلية للخلايا الورمية بتحويل معظم مخزونها من الغلوكوز إلى لاكتات بغض

النظر عن توافر الأكسجين، محولة استعمال مستقلبات الغلوكوز من إنتاج قدرة بسيطة إلى تحفيز النمو والتضاعف الخلوي المتسارع. ولهذا السبب، LDHA وإمكانية تثبيط فعاليته حددت كهدف واعد في علاج السرطانات التي ترتكز على منع الخلايا المولدة للسرطان من التكاثر.



الشكل (٥). مقارنة فعالية نازع هيدرجين اللاكتات في استقلابات الخلايا الطبيعية والسرطانية

يرتفع مستوى نازع هيدرجين اللاكتات في العديد من الحالات مما يعكس توزعه النسيجي الواسع: **(٤)**

١. **فاقات الدم الانحلالية**
٢. **فقر الدم الوبيل**
٣. **الإنتانات مثل داء وحيدات النوى، التهاب السحايا، التهاب الدماغ، الأيدز :** تسبب الانتانات نخراً خلوياً يؤدي لارتفاع قيم أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات في الدم كما ترتفع قيم الأنزيم في التهابات الدماغ والسحايا وهنا له أهمية تشخيصية في تفريق الالتهاب الجرثومي عن الفيروسي
٤. **الاحتشاء الرئوي :** يرتفع مستوى نازع هيدرجين اللاكتات خلال ٢٤ ساعة من بداية الألم الصدري. إن وجود GOT طبيعي مع نازع هيدرجين اللاكتات مرتفع والذي يستقر مستواه بعد ١-٢ يوم من بداية الألم الصدري هو مؤشر على الاحتشاء الرئوي (٦).

٥. **المرض الكبدي** (تشمع، التهاب كبد حاد)
٦. **الأذيات العضلية الحادة:** على الرغم من أن الفحص المخبري الأدق في تشخيص الأذيات العضلية هو معايرة أنزيم الكرياتين كيناز إلا أن عيار أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات مفيد في تشخيص هذ الحالات بسبب تحرره بشكل كبيرمن الأنسجة العضلية عند أذيتها.
٧. **قصور الدرق:** يرتفع أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات في قصور الدرق سواءً أكان بدئي أم ثانوي.
٨. **الاحتشاء الكلوي :** نتيجة لغنى النسيج الكلوي بأنزيم نازع هيدرجين اللاكتات يرتفع هذا الأنزيم بشكل كبير في حالات الاحتشاء الكلوي بسبب تخرب الأنسجة الكلوية المرافق.
٩. **التهاب البنكرياس:** يرتفع عيار الأنزيم في التهاب البنكرياس الحاد نتيجة التلف الكبير الحاصل في أنسجة البنكرياس والناجم عن هضم هذه الأنسجة بالأنزيمات الهاضمة.
١٠. **السرطانات، اللمفوما، اللوكيميا:** يرتفع عيار الأنزيم بشكل لانوعي في معظم السرطانات ويفيد في بعض الحالات كواسم ورمي في متابعة مرضى السرطان وتقييم الاستجابة للعلاج والنكس.
١١. **احتشاء العضلة القلبية:** استعمل نازع هيدرجين اللاكتات للمساعدة في تشخيص ومراقبة النوب القلبية لكنه استبدل حالياً بالتربونين ويعتبر نازع هيدرجين اللاكتات غير نوعي للعضلة القلبية ولا يوصى به روتينياً لتقييم مرضى الداء الإكليلي الحاد.
يرتفع مستواه عادة خلال ٣٦ ــ ٥٥ ساعة من الاحتشاء ويستمر مرتفعاً لفترة أطول من GOT أو CPK (٣-١٠ أيام).
١٢. **الانسداد والاحتشاء المعوي:** كما غيرها من الاحتشاءات النسيجية يرتفع عيار هذا الأنزيم نتيجة الأذى النسيجي والنخر الخلوي الحاصل في الخلايا المعوية.

❖ مجموعة الدراسة

أ- لمحة عن فقر الدم الانحلالي [21] (Hemolytic anemia)

بعد نهاية دورة حياتها الطبيعية (حوالي ١٢٠ يوم)، تزال كريات الدم الحمراء من الدوران. ما يحدث في الانحلال الدموي تخريب باكر وبالتالي قصر دورة حياتها. يحدث فقر الدم عندما يعجز نقي العظم على معاوضة قصر حياة الكريات الحمراء.

الأسباب

ينجم الانحلال الدموي عن :

١. **شذوذات داخل الكريات الحمراء:** تتضمن واحد أوأكثر من مكونات أووظائف كريات الدم الحمراء: الغشاء (مثل تكور الكريات)، الاستقلاب الخلوي (عوز G6PD) والخضاب (فقر الدم المنجلي والتلاسيميا).

٢. **اضطرابات خارج كريات الدم الحمراء:** غالبيتها مكتسبة، الكريات الحمر طبيعية. وتتضمن: فرط فعالية الجهاز الشبكي البطاني (فرط الطحالية)، الاضطرابات المناعية (مثال، فقر الدم الانحلالي المناعي الذاتي)، الأذيات الآلية (فقر الدم الانحلالي الرضي) وأخماج معينة (مثال السحائيات والكلوستريديا).

الفيزيولوجيا المرضية [٢١] :

قد يكون الانحلال الدموي حاداً، مزمناً أونوبياً. قد يختلط الانحلال المزمن بنوبة انعدام تنسج (فشل مؤقت في تكون الكريات الحمراء)، عادة ينجم عن خمج. يصنف الانحلال إلى داخل وخارج الأوعية أوكلاهما.

الانحلال الدموي خارج الأوعية: معظم آليات الانحلال الدموي هي خارج الأوعية وتحدث عندما تُنظف الكريات الحمراء الشاذة أوالمتأذية من الدوران بواسطة خلايا الطحال والكبد ونقي العظم . يساهم الطحال عادة في الانحلال الدموي بتخريب الكريات الشاذة أوالخلايا المغلفة بأضداد حارة. تتخرب كريات الدم الحمراء الشاذة بشدة والمغلفة بأضداد بارد أوبالمتممة (C3) في الكبد والدوران.

الانحلال الدموي داخل الأوعية : الانحلال داخل الأوعية هو سبب هام لتخرب الكريات غير الناضجة ويحدث عادة عندما يتأذى الغشاء الخلوي بشدة، سواء بسبب ظاهرة مناعية ذاتية أورض مباشر أو بسبب الذيفانات.
يسبب الانحلال داخل الأوعية تحرر الهيموغلوبين في الدم عندما يزداد مقدار الخضاب المتحرر في البلازما عن القدرة الرابطة للخضاب للهابتوغلوبين، الغلوبولين الموجود بشكل طبيعي بتركيز ١٠٠ مغ/دل في البلازما.
يحدث اليرقان وفرط بيلروبين الدم غير المباشر عندما يفوق تحول الخضاب إلى بيلروبين قدرة الكبد على قرن وطرح البيلروبين .
يستجيب نقي العظم لتخرب الكريات الزائد بتسريع إنتاج وتحرير الكريات الحمراء مما يسبب كثرة الشبكيات.
التشخيص:

- اللطاخة المحيطية، تعداد الشبكيات، بيلروبين المصل، نازعة الهيدرجين اللاكتانية و ALT.
- أحياناً، قياس الهيموسيدرين في البول والهابتوغلوبين المصلي.
- نادراً، قياس بقيا كريات الدم الحمراء باستعمال واسم مشع (radioactive label).

يشك بالانحلال الدموي عند المرضى المصابين بفقر دم وكثرة الشبكيات، خاصة إذا وجدت علامات أخرى مثل ضخامة الطحال.
عند الشك بالانحلال الدموي، تطلب اللطاخة المحيطية وبيلروبين المصل، نازع هيدرجين اللاكتات، و ALT. إذا كانت نتائج هذه التحاليل غير جازمة ، يطلب فحص الهموسيدرين في البول والهابتوغلوبين المصلي.
نادراً ما تكون الشذوذات في شكل كريات الدم الحمراء مشخصة لكنها غالباً ما توجه لوجود وسبب الانحلال الدموي. تتضمن الموجودات الأخرى الموجهة ازدياد مستوى نازع هيدرجين اللاكتات في المصل والبيلروبين غير مباشرمع قيمة ALT طبيعية، ووجود يوروبيلينوجين في البول. يشك بالانحلال الدموي داخل الأوعية بوجود الفصيمات الكروية في الدم (schistocytes) بدراسة اللطاخة المحيطية وبانخفاض مستويات الهابتوغلوبين المصلية.
من ناحية ثانية، يمكن أن تنخفض مستويات الهابتوغلوبين بسبب خلل الوظيفة الخلوية الكبدية ويمكن أن تزداد بسبب التهاب جهازي. ويشك كذلك بالانحلال الدموي داخل الأوعية بوجود الهيموسيدرين في البول. الخضاب

في البول، مثل البيلة الدموية وبيبلة الميوغلوبين، تعطي تفاعل بنزيدين إيجابي باختبار الغميسة: يمكن تميزه عن البيلة الدموية بوجود كريات الدم الحمراء بفحص البول المجهري. يجعل الخضاب الحر البلازما بنية محمرة، ملحوظة غالباً في الدم المثفل، بينما لا يفعل الميوغلوبين ذلك.
رغم أن الانحلال الدموي يمكن أن يشخص بهذه المعايير البسيطة، يوضع التشخيص النهائي ب: نقص بقيا كريات الدم الحمراء، خاصة باستعمال واسم مشع، مثل الكروم المشع(Cr^{51}) . حيث يمكن بهذه الطريقة تأكيد وجود انحلال دموي وأيضاً تحديد مواضع التشظي، لكن نادراً ما يستعمل هذا الإجراء.

عندما يشخص الانحلال الدموي، يمكن تتضيق مجال التشخيص التفريقي للانحلال الدموي من خلال :

١. تحري عوامل الخطورة (مثل، التوزع الجغرافي، الوراثيات، الاضطراب المستبطن)
٢. فحص المريض بحثاً عن ضخامات حشوية
٣. طلب ضد الغلوبين المباشر (كومبس) واللطاخة المحيطية

الاختبارات الأخرى التي يمكن أن تساعد في تحديد سبب الانحلال الدموي تتضمن (٢٢) :

١. الرحلان الكهربائي الكمي للخضاب
٢. المقايسة الأنزيمية لكريات الدم الحمراء
٣. عد الكريات المستمر (Flow cytometry)
٤. الراصات الباردة
٥. الهشاشة التناضحية (Osmotic fragility)

ب- لمحة عن الأمراض الكبدية (24) (Liver Diseases)

يشمل مصطلح اختبارات وظائف الكبد (LFTs) عدداً من الاختبارات الكيميائية الحيوية والتي تعكس الأذية الكبدية، الركود الصفراوي داخل وخارج الكبد، أمراض الكبد الارتشاحية، اضطراب التصنيع الكبدي، والتغيرات في الاستقلاب الكبدي.
رغم أن هذه المجموعة من الاختبارات تقيم الحالة الكبدية بشكل عام، لكن التشخيص المتكامل لأمراض الكبد يعتمد أيضاً على السريريات والفحوص الأخرى الغازية وغير الغازية.

الجدول (١). الاختبارات الشائعة في الأمراض الكبدية (٢٥)

الاختبار الكيميائي الكبدي	التطبيق السريري
ناقلة أمين الآلانين (ALT)	الأذية الخلوية الكبدية، الإصابة الكبدية
ناقلة أمين الأسبارتات (AST)	الأذية الخلوية الكبدية، أقل نوعية للإصابة الكبدية من (ALT)
نازع هيدرجناللاكتات(LDH)	قليل النوعية في الأمراض الكبدية
الفسفاتاز القلوية(ALP)	الركود الصفراوي، الارتشاح الكبدي، والانسداد الصفراوي
ناقل بيبتيدالغلوتاميل- غاما (Y-GT)	الركود الصفراوي، والانسداد الصفراوي
٥- نوكليوتيداز	الركود الصفراوي، والانسداد الصفراوي
البيللروبين	الركود الصفراوي،اضطراب الاقتران، والانسداد الصفراوي
الأمونيا	خلل وظيفة التصفية
زمن البروترومبين	خلل وظيفة التصنيع
الألبومين	خلل وظيفة التصنيع

- لأنزيم نازع هيدرجين اللاكتات الكلي نوعية قليلة في الأمراض الكبدية كونه يرتفع في العديد من الأمراض وأذيات النسج الأخرى ، لكن مع إمكانية فصل النظائر الأنزيمية تبين وجود نوعية يحملها النظير الأنزيميLDH5 في الأمراض الكبدية التي تسبب نخراً خلوياً وذلك مثبت بالدراسات المخبرية وبالرحلان الكهربائي .
- في التهاب الكبد الإقفاري، تكون التغيرات المخبرية مميزة ويمكن وضع التشخيص المخبري من خلال ملاحظة:

١. الارتفاع الملحوظ في قيم ناقلة الأمين حيث يكون مستوى ناقلة أمين الأسبارتات أعلى من ناقلة أمين الألانين (حتى ١٠٠ ضعف الطبيعي) ويحدث هذا خلال ٢٤ – ٤٨ ساعة من بداية الإصابة.

٢. العودة السريعة لناقلات الأمين إلى المستوى الطبيعي خلال ٣ – ١١ يوم بعد علاج المشكلة المسببة.

٣. الارتفاع الكبير وهبوط مستويات نازع هيدرجين اللاكتات، نسبة ALT/LDH الأقل من ١.٥ أكثر نوعية لالتهاب الكبد الإقفاري من التهاب الكبد الفيروسي. (٢٦)

٤. تبقى مستويات الفسفاتاز القلوية طبيعية

٥. قد ترتفع مستويات البيلروبين ولكن نادراً ما تكون أكثر من أربع أضعاف
٦. تطاول زمن البروترومبين بشكل بسيط

- في التهاب الكبد الفيروسي والآفات الكبدية المسببة لليرقانات (التي تسبب نخر خلوي في الكبد)، لوحظ ارتفاع كبير في قيم نازع هيدرجين اللاكتات مع نوعية خاصة للنظير الأنزيمي الخامس في هذه الحالات حيث أمكن فصله عن بقية النظائر بواسطة الطرق المذكورة سابقاً .

٢. يطلب عيار نازع هيدرجين اللاكتات في سوائل الجسم لعدة أسباب :

يطلب تحليل نازع هيدرجين اللاكتات عند المريض الذي يبدي أعراض وعلامات التهاب السحايا أوالدماغ أوفي الحالات الانصبابية مثل انصباب الجنب، التأمور أوالحبن.

١. **السائل الدماغي الشوكي (CSF)**: (٧) رغم إمكانية قياس العديد من الأنزيمات في السائل الدماغي الشوكي، إلا أن نازع هيدرجين اللاكتات يتميز بأهمية سريرية خاصة، حيث يتمتع بحساسة ونوعية بين ٧٠% و٨٥%. لأن النسيج الدماغي غني بهذا الأنزيم يحدث ارتفاع مستواه في السائل الدماغي الشوكي نتيجة أذية النسيج العصبي.
تشاهد مستويات نازع هيدرجين اللاكتات المرتفعة في:
١) ٩٠% من حالات التهاب السحايا الجرثومي
٢) في ١٠% فقط من التهاب السحايا الفيروسي
٣) الحادث الوعائي الدماغي الشديد
٤) الابيضاض واللمفوما مع ارتشاح سحائي
٥) النقائل

عندما تشاهد مستويات عالية من نازع هيدرجين اللاكتات في التهاب السحايا الفيروسي، عادة ما تترافق الحالة مع التهاب الدماغ وإنذار سيئ. ارتفاع نازع هيدرجين اللاكتات بعد الإنعاش هو إنذار سيء عند المرضى المصابين بأذية دماغية بنقص الأكسجة.

القيم المرجعية :

البالغين: أقل من ٤٠ وحدة/لتر أوتقريباً ١٠% من المستويات المصلية (فعالية نازع هيدرجين اللاكتات الكلية)

الولدان: أقل من ٧٠ وحدة/لتر

٢. سائل الجنب(Pleural Fluid):(٧.١)

- ✓ القيمة الطبيعية لنازع هيدرجين اللاكتات في سائل الجنب أقل من ٥٠% من قيمته في المصل

الجدول (٢) المعاير التشخيصية لانصبابات الجنب وفق قيم نازع هيدرجين اللاكتات

الانصباب	السبب	عيار نازع هيدرجين اللاكتات	معايير light
نضحي (exudate)	• قصور القلب الاحتقاني • المتلازمة النفروزية • الوذمة المخاطية • الانخماص الرئوي	أكثر من ٢٠٠ وحدة/لتر	١. LDH سائل الجنب/ LDHالمصل أكبر من ٠.٦ ٢. LDH سائل الجنب أكبر من ٣/٢ الحد الأعلى الطبيعي في المصل
نتحي (transudate)	• التنشؤات (ميزوتليوما) • الأخماج • الصمة الرئوية • اليوريما	أقل من ٢٠٠ وحدة/لتر	١. LDH سائل الجنب/ LDHالمصل أقل من ٠.٦ ٢. LDH سائل الجنب اقل من ٣/٢ الحد الأعلى الطبيعي في المصل

٣. **سائل الحبن (Ascitic Fluid)** : نسبة نازع هيدرجن اللاكتات (قيمته في سائل الحبن: قيمته في المصل) عادة أقل من ١.٤ في الحبن الناجم عن ارتفاع التوتر البابي بينما في الحبن الناجم عن أسباب خمجيةأوورمية تكون النسبة أكبر من ١.٤. القيمة التمييزية المطلقة تكون عادة أعلى من ٤٠٠ وحدة/لتر.

٤. **سائل التأمور (PERICARDIAL FLUID)**: يعتمد تقييم أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات على المعايير المستعملة في سائل الجنب .

I. هناك العديد من الحالات التي تسبب ارتفاع كاذب لانزيم نازع هيدرجين اللاكتات مثل(٢) :

١. انحلال عينة الدم يسبب ارتفاع مستواه بشكل كاذب.يحدث هذا لسوء التعامل مع العينة المسحوبة، تخزينها بدرجة حرارة عالية.
٢. ارتفاع مستوى الصفيحات لدى الفرد، يسبب ارتفاع مستوى نازع هيدرجين اللاكتات بشكل مصطنع ولا تعكس مستوى نازع هيدرجين اللاكتات الفعلي في الدوران.
٣. يمكن أن تسبب الأمراض الجلدية ارتفاع مستويات نازع هيدرجين اللاكتات بشكل كاذب.
٤. العديد من الأدوية يمكن أن ترفع أوتخفض مستويات نازع هيدرجين اللاكتات

كما ويمكن للتمارين العضلية العنيفة أن تسبب ارتفاع مؤقت بمستوى نازع هيدرجين اللاكتات.

.

VII. النظائر الأنزيمية Isoenzymes of LDH[١٥,١٩]

i. مقدمة عامة Introduction:

يوجد في المصل خمسة نظائر أنزيمية مميزة فيزيائياً لهذا الأنزيم وهي LDH1, LDH2, LDH3, LDH4, LDH5، حيث يعود وجود النظائر الأنزيمية المختلفة إلى الاختلاف في البنية الرباعية للبروتين الأنزيمي.

كل هذه النظائر الأنزيمية رغم أنها مختلفة من الناحية الفيزيائية، فإنها تحفز نفس التفاعل وهو تفاعل أكسدة البيروفات إلى لاكتات ولكن بمعدلات مختلفة.

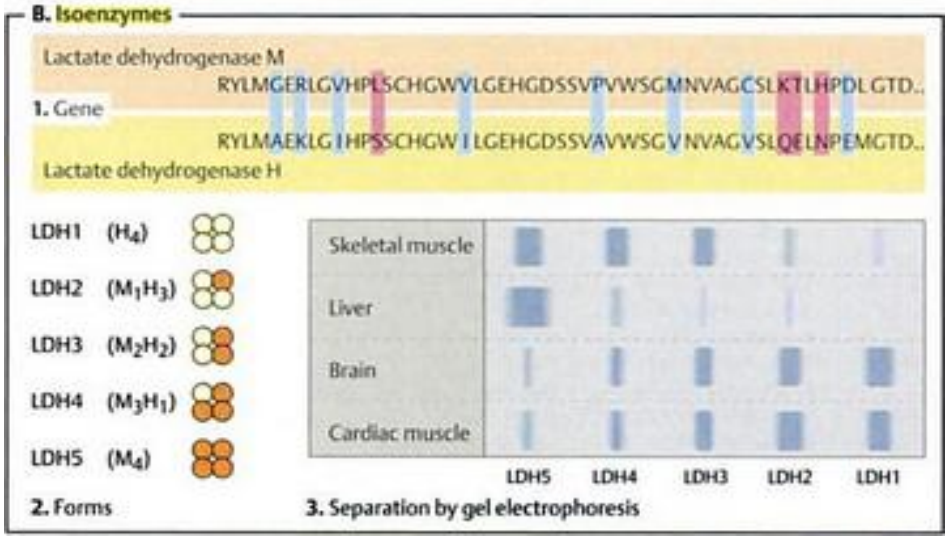
ii. بنية النظائر الأنزيمية لنازع هيدرجين اللاكتات The Structure of LDH Isoenzymes[٣]

- هناك وحدتان جزئيتيان مختلفتان لأنزيم نازع هيدرجين اللاكتات في العضوية الحية وهما **M (muscle) - H (heart)**،والتي تختلف قليلاً بتتابع الحموض الأمينية وبالتالي تختلف بالخصائص التحفيزية في التفاعلات، ونتيجة لاندماج هذه الوحدات بشكل عشوائي هناك خمسة نظائر للLDH.

تُرمز الوحدات الجزئية M و H عبر جينين مختلفين: [١]

١. ترمز الجزيئة M ب LDHA، المتوضع على الصبغي 11p15.4
٢. ترمز الجزيئة H ب LDHB، المتوضع على الصبغي 12p12.2-p12.1،

- يوضح الشكل ٣ أقسام من متتاليات الحموض الأمينية لوحدتين جزئيتين، يحتمل أن يكون الجين الطليعي المشترك قد تضاعف في موضع ما خلال التطور، ثم تابع الجينان المتشكلان التطور بشكل مستقل عن بعضهما البعض من خلال طفرة الانتقاء.
- عموماً تحوي الوحدة الجزئية H بقايا حمضية أكثر وأساسية أقل من الوحدة M،ولذلك تملك شحنة سلبية أقوى، تستخدم هذه الحقيقة لفصل النظائر بواسطة الرحلان الكهربائي. النظير الأنزيميLDH1 المؤلف من أربع وحدات H يهاجر بأكبر سرعة والنظير M4 هو الأبطأ سرعة.
- عموماً فصل وتحليل النظائر الأنزيمية في عينات الدم هام في تشخيص بعض الأمراض، حيث يحوي المصل مقداراً ضئيلاً من الفعالية الأنزيمية وعندما يتأذى عضو ما، تدخل الأنزيمات داخل الخلوية إلى الدم وعندئذ يمكن معايرتها في المصل. ***الفعالية الكلية للأنزيم تعكس شدة الأذية الحاصلة،بينما يقدم نوع نظير الأنزيم الموجود في الدم دليلاً على موضع الأذية الخلوية.***

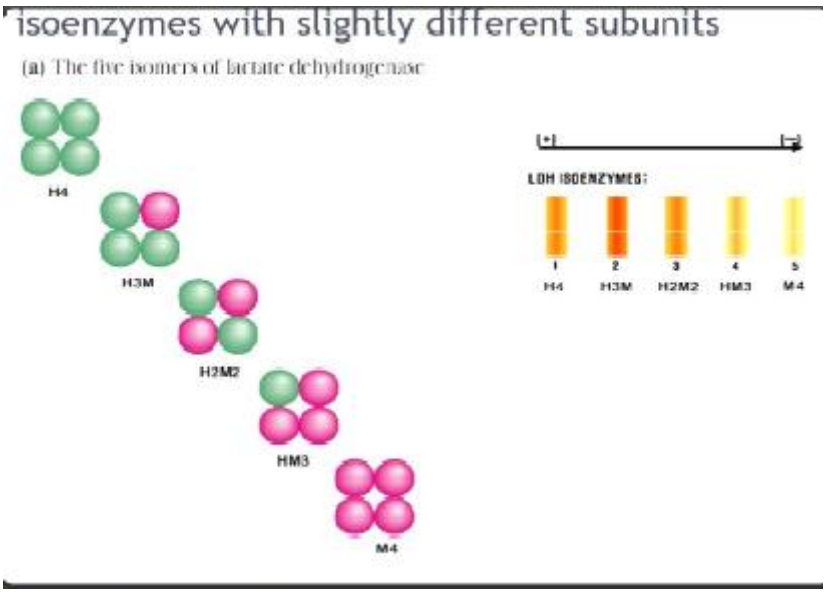


- **+**

الشكل (٦). بنية النظائر الأنزيمية وتوزعها النسيجي

الجدول رقم (٣). النظائرالأنزيمية لنازع هيدرجين اللاكتات

النظير	السلسلة عديدة الببتيد	حركية الرحلان الكهربائي	النسج الغنية بالنظير
LDH1	(H_4) H HHH	الأسرع تحركاً	العضلة القلبية وكريات الدم الحمراء
LDH2	(H_3M) H HH M		
LDH3	(H_2M_2) H H M M		
LDH4	(HM_3)H M MM		
LDH5	(M_4) M MMM	الأبطأ تحركاً	الكبد والعضلات



الشكل (٧). بنية نظائر أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات

iii. تفريق النظائر الأنزيمية لنازع هيدرجين اللاكتات[١٥] Differentiation of LDH Isoenzymes

يمكن تفريق هذه النظائر الأنزيمية بعدة طرق بسيطة وهي:

١. **التثبيط بالحرارة** : أثبتت الدراسات أن النظائر الأنزيمية لنازع هيدرجين اللاكتات منها الأول بشكل رئيسي والثاني بدرجة أقل تعتبر ثابتة بالحرارة، والنظير الخامس وبدرجة أقل الرابع تعتبر حساسة للحرارة، أي عند التعريض لدرجة حرارة ٥٦ درجة مئوية يتثبط النظير الأنزيمي الخامس بشكل أساسي ومع ارتفاع درجة الحرارة بين ٥٦ – ٦٠ (وحتى ٦٣ درجة مئوية) تبدأ النظائر الرابع والثالث وقليلاً الثاني تفقد الفعالية وبدرجة الحرارة حتى ٦٥ – ٧٠ درجة مئوية يحتفظ النظير الأنزيمي الأول بالجزء الأكبر من فعاليته وبدرجات الحرارة الأعلى من ٧٠ درجة مئوية تتثبط كل النظائر

٢. **التثبيط باليوريا والأوكزالات** : أثبتت الدراسات (Pauline and Wilkinson) أنه وبعد حضن المصل باليوريا والأكزالات لمدة نصف ساعة أن مصل المرضى المصابين بحالات ترتفع فيها قيم LDH1 و LDH2 مثل احتشاء العضلة القلبية وفقر الدم العرطل أكثر حساسية للأوكزالات مقارنة بالمصابين بأمراض كبدية مع ارتفاع قيم LDH4 و LDH5.

تبين بالدراسات أن LDH4 و LDH5 تتثبط بشكل كامل تقريباً عند الحضن باليوريا بينما يتثبط LDH1 و LDH2 بشكل طفيف.

٣. يمكن فصل هذه النظائر الأنزيمية بواسطة **الرحلان الكهربائي**. يعود الاختلاف في حركيات الرحلان الكهربائي إلى الشحنات الكهربائية المختلفة على النظائر الأنزيمية بسبب الاختلاف في محتوياتها من الحموض الأمينية الحامضية والقلوية.

الرحلان الكهربائي (Electrophoresis) (٢٣)

الرحلان الكهربائي هو طريقة لفصل الجزيئات البروتينية، متضمنة H4 و M4، عن بعضها البعض. تحمل كل جزيئة بروتينية شحنة فريدة، والتي تمثل وظيفة عدد من الحموض الأمينية في بنيتها الأولية وبنيتها الرباعية اللاحقة. عندما توضع في حقل كهربائي وبدرجة باهاء مناسبة، تهاجر البروتينات في الحقل بمعدل متناسب مع حجمها وشحنتها بتلك الدرجة من الباهاء.

تتبع حركة الأنزيمات خلال الرحلان الكهربائي بسهولة بإضافة مقدار صغير من الصباغ لكل عينة. تُستعمل زرقة البروموفينول بشكل نموذجي في أجهزة الرحلان الكهربائي التي تحدث فيها الهجرة نحو المصعد (anode). لأن غالبية البروتينات تحمل شحنة سلبية خفيفة في درجة باهاء ٦- ٨، فإنها تتحرك نحو المصعد (+).

معظم البروتينات عديمة اللون ويجب أن تلون بعد الرحلان الكهربائي لكي تصبح مرئية. إحدى الطرق هي استعمال صبغة عامة ترتبط بكل البروتينات. **الصباغان المستعملان الأكثر شيوعاً هما أسود الأميدو وزرقة كوماسي**. ينفذ هذان الصباغان في الجل بشكل كامل لكن يمكن إزالتهما من كل مناطق الجل عندما لا توجد بروتينات، لذا في نهاية فقرة إزالة الصباغ تكون شرائط البروتين المصطبغة بلون غامق مرئية في الجل الشفاف.

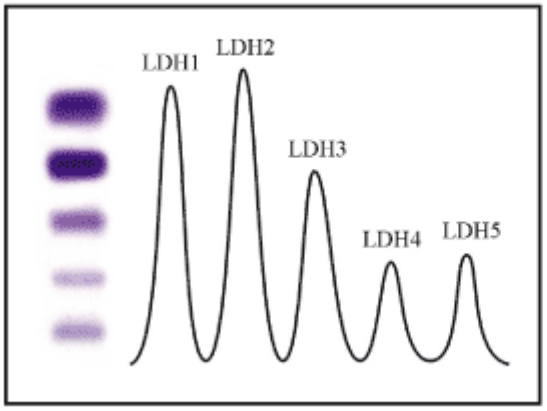
يمكن أن تستعمل طريقة بديلة لكشف البروتينات إذا كانت هذه البروتينات عبارة عن أنزيمات. أحياناً يمكن رؤية الأنزيمات اعتماداً على فعاليتها التحفيزية إذا بقيت هذه الأنزيمات فعالة بعد الرحلان الكهربائي. يمكن رؤية أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات بإضافة حمض اللاكتيك ، +NADوصباغ إلى جل البروتينات في الرحلان. يحول الأنزيم حمض اللاكتيك إلى بيروفات ويرجعNAD وبذلك الصباغ. يكون الصباغ المرجع مرئياً للعين المجردة أوبواسطة مقياس الطيف الضوئي عند ٥٩٠ نانومتر.

☒ الرحلان الكهربائي لنظائر نازع هيدرجين اللاكتات:

المبدأ: بدرجة الباهاء المستعملة (٨.٦) وبدرجة حرارة ٢٠ درجة مئوية، تهاجر النظائر الأنزيمية من LDH1 و LDH4نحو المصعد (anode) وLDH5 نحو المهبط على فلم الآغاروز. تحدد النظائر الأنزيمية لنازع هيدرجين اللاكتات بعد الحضن لفترة قصيرة مع سائل يحوي L–لاكتات و +NAD.

L- لاكتات + NAD^+←بيروفات + NADH + H^+ ينتج هذا التفاعل NADH، والتي تتألق في الباهاء القلوي بعد الاستثارة بالضوء عند طول موجة ٣٦٠ نانومتر. تحسب النظائر الأنزيمية بنسبة التألق المتولد بواسطة كل شريط أنزيمي.

ISOENZYMES LDH INTERPRETATION



Normal values range

Fraction	Tot. LDH %
LDH1	20-30
LDH2	30-40
LDH3	20-25
LDH4	7-15
LDH5	5-15

الشكل (٨). القيم المرجعية الطبيعية لنظائر الأنزيم

☒ التفسير السريري وفق الرحلان: (٢٣)

- النماذج الشاذة الأكثر شيوعاً هي ارتفاع في المنطقة المصعدية (يعني LDH1 و LDH2) وفي المنطقة المهبطية (يعني LDH5). من غير الشائع مشاهدة ارتفاعات في المنطقة المتوسطة (mid-zone) يعني LDH3.
- تلاحظ النتائج الطبيعية مع فعالية LDH الكلية فوق الطبيعي (الارتفاع التشاكلي (ISOMORPHIC) لنموذج نظير أنزيمي طبيعي) وتحدث عادة بعد إصابة متعددة الأجهزة.
- يحدث الازدياد في النظائر المصعدية بسبب الانحلال الدموي وكثر الحمر غير الفعالة، الاحتشاء الكلوي وأورام الخلايا المنتشة أواحتشاء العضلة القلبية. نؤكد أن الانحلال الدموي، سواء في الزجاج أوعند

الأحياء، أو كثرة الحمر غير الفعالة .يجب دائماً أن تبقى في البال قدر الإمكان قبل الافتراض أن نخر العضلة القلبية قد حصل، ***كما يحدث عند مرضى صمامات القلب الصنعية حيث يشاهد الانحلال الدموي بكثرة.***

- تعطي أورام الخلايا المنتشة والاحتشاء الكلوي نموذجاً مصعدياً رغم أن هذه الأورام يمكن أن تظهر ازدياداً غير متناسب في LDH1.
- في احتشاء العضلة القلبية، يزداد LDH1 في المصل لكن امتداد هذا الازدياد متغير بشكل كبير. باستعمال النظام التحليلي وجدنا أن :

١. يمكن الحصول على نتائج مفيدة من الناحية التشخيصية بذكر فعاليات النظائر الأنزيمية المفردة سواء كنسبة مئوية من الفعالية الكلية أو كوحدات (UNITES) مطلقة من الفعالية النزيمية.
٢. لا يحدث تقلب (FLIPPING) LDH1 في كل حالة، إنما في ١٢% على الأقل من حالات احتشاء العضلة القلبية.
٣. نسبة LDH2/LDH1، هو اختبار بديل لاحتشاء العضلة القلبية، وتعتبر غير طبيعية عندما تكون النسبة فوق المجال المرجعي ٠.٤٥ – ٠.٧٤، ولهذا الاختبار حساسة ١٠٠% ونوعية ٩٠.٥% في وحدة العناية المشددة.

- تشير النماذج المهبطية لأذية كبدية أوفي العضلات الهيكلية وحسب خبرتنا يعتبر قصور القلب الاحتقاني السبب الأشيع لارتفاع LDH5 عند مرضى المشافي وذلك بسبب الإصابة الكبدية الناجمة عنه. من المهم أن تعرف أن نصف عمر LDH5 الوسطي هو ١٠ ساعات لذا قد يكون ارتفاعه مؤقتاً، بينما نصف عمر GPTهو ٥-٦ أضعاف عمر LDH5 لذا يبقى عدة أيام بعد تحرره إلى الدوران. لوحظ أن قصور القلب الاحتقاني غير العكوس يترافق مع ازدياد LDH5 بنسبة تفوق ٧٠% من فعالية LDH الكلية في المصل.
- الارتفاعات في المنطقة المتوسطة (LDH3) نادرة نسبياً، لكنها تشاهد في حالات داء وحيدات النوى الخمجي (أي إصابة النسيج اللمفي) وفي أي حالة يحدث فيها تخرب الصفيحات بسرعة (مثل التخثر المنتشر داخل الأوعية DIC).

iv. القيم المرجعية لنظائر نازع هيدرجين اللاكتات Reference

(١٣) Values of LDH Isoenzymes

- LDH 1: ١٧%-٢٧% من الكلي أو ٠.١٧- ٠.٢٧
- LDH2: ٢٩%-٣٩% من الكلي أو ٠.٢٩- ٠.٣٩
- LDH3: ١٩%-٢٧% من الكلي أو ٠.١٩- ٠.٢٧
- LDH4: ٨%- ١٦% من الكلي أو ٠.٠٨- ٠.١٦
- LDH5: ٦%-١٦% من الكلي أو ٠.٠٦- ٠.١٦

v.الأهمية السريرية لنظائر نازع هيدرجين اللاكتات

- في المصل الطبيعي، LDH2(H3M) هو النظير الأنزيمي الأعلى نسبة بينما الأقل نسبة هو النظير الأنزيمي الأبطأ LDH5 .
- بعد احتشاء العضلة القلبية وفي الفاقات الدموية الانحلالية يسيطر النظير الأنزيميLDH1 و LDH2 .
- في التهاب الكبد الفيروسي الحاد يسيطر النظير الأنزيميLDH4و LDH5 الأبطأ.

معايرة هذه النظائر مهمة في التشخيص التفريقي للاحتشاء الحاد، فقر الدم العرطل (بعوز الفولات، فقر الدم الوبيل)، فقر الدم الانحلالي، والاحتشاء الكلوي. تتميز هذه الحالات بارتفاع مستوى LD1، غالباً مع انقلاب النسبة LD1:LD2 (flip).

- يرتفع مستوى LDH5 خاصة في الحالات التالية:
  a. تشمع الكبد والتهاب الكبد، سرطان الكبد
  b. قصور القلب الاحتقاني والوذمة الرئوية
  c. أذيات العضلات المخططة والحروق

- في غالبية السرطانات، يرتفع واحد على الأقل من (LDH2,LDH3 و LDH4). **الاستثناء هو** في الورم المنوي والورم الانتاشي (dysgerminoma)، التي يرتفع فيها LDH1 (تقريباً في ٦٠% من الحالات). أحياناً يكون ارتفاع LDH3 هو المؤشر الأول على وجود السرطان. **(١٧)**

- يلاحظ ازدياد نسبة LDH5 في سرطان الثدي وخباثات الجهاز العصبي المركزي وسرطان البروستات.
  وفي ابيضاضات الدم، يلاحظ ارتفاع كل من LDH3و LDH2 .
  تبدي الأورام الخبيثة في الخصية والمبيض ارتفاع كل من LDH2، LDH3وLDH4.(٦)

أحياناً يرتفع مستوى LDH3 في الاحتشاء الرئوي أوذات الرئة. (١٧)

يستعمل عيار نظائر نازع هيدرجين اللاكتات في السائل الدماغي الشوكي في التفريق بين التهاب السحايا الفيروسي والجرثومي:

١. وجود النظائر ١ و٢ و٣ تعكس ارتكاس اللمفاويات في الجملة العصبية مما يشير لالتهاب سحايا فيروسي
٢. وجود النظائر ٤ و٥ ارتكاس المحببات (العدلات) في الجملة العصبية مما يشير لالتهاب سحايا جرثومي.
٣. المستويات العالية من النظائر ١ و٢ تعبر عن أذية شديدة (تخرب دماغي) وإنذار سيء
٤. المستويات العالية من النظائر ٣ و٤ تشير لابيضاض لمفاوي أولمفوما

المرض	LDH1	LDH2	LDH3	LDH4	LDH5
احتشاء العضلة القلبية	X	X			
الاحتشاء الرئوي				X	X
قصور القلب الاحتقاني				X	X
التهاب الكبد الفيروسي				X	X
اللوكيميا		X	X		
التهاب البنكرياس		X	X		
الداء السرطاني المنتشر		X	X		
فقر الدم العرطل	X	X			
فقر الدم الانحلالي	X	X			
الحثل العضلي	X	X			

الجدول (٤). نماذج نظائر نازع هيدرجين اللاكتات في الأمراض

الدراسة العملية

عنوان الرسالة :

دراسة معولية طريقة التعطيل بالحرارة لتحديد طراز النظائر الأنزيمية للLDH في اليرقانات الناجمة عن فاقات الدم الانحلالية والآفات الكبدية

Study of reliability of heat inactivation method for determining LDH Izoenzymes patterns in jaundices caused by hemolytic anemia and hepatic diseases

تمهيد :

تعتبر المعايرات الأنزيمية هامة جداً في مقاربة المرضى المصابين بآفات كبدية وفاقات دموية انحلالية وهنا نخص أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات الذي يعاير بشكل روتيني عند المرضى المصابين بآفات كبدية ودموية ومنها المصابين بيرقانات سواءاً من مصدر كبدي أوانحلالي دموي وخاصة أن نظائره الأنزيمية تبدي توزعاً خلوياً فريداً وتتمتع بخصائص كيميائية فريدة تمكن من معايرتها بطرق بسيطة وعلمية ولذلك أجريت هذه الدراسة لتقييم معولية معايرة هذه النظائر اعتماداً على حساسيتها للحرارة كموجه قوي لمصدر الإصابة كبدية أم دموية وممكن كمساعد في المتابعة والتقييم لتطور الحالة بعد العلاج أولتقييم النكس حيث تعتبر هذه الطريقة بسيطة وسريعة ولا تحتاج أكثر من الحد الأدنى من التجهيزات المخبرية.

I. هدف البحث

تجربة إمكانية تطبيق طريقة بسيطة لمعايرة النظائر الأنزيمية لنازع هيدرجين اللاكتات بحيث يمكن استخدامها في التشخيص التفريقي للأمراض المترافقة بنخر خلوي ويرقانات والمسببة لزيادة في أنواع محددة من نظائر أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات وبيان نوع نظير الأنزيم الموجود في كل نوع من هذه الأمراض (ثابت أم غير ثابت بالحرارة)

II. أساس البحث

- يوجد أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات في كل خلايا وأنسجة الجسم لكنه يتركز بشكل أساسي في العضلات القلبية والهيكلية والكبد والكريات الحمراء والكلية والرئة والكريات البيضاء ، وهو أنزيم يساعد في تحويل السكر إلى قدرة لكي تستفيد منه الخلايا.
- عندما تتعرض الخلية للمرض أولأذية وفي الآفات المترافقة بنخر خلوي، يرتفع مستوى هذا الأنزيم في الدم، وتشير مستوياته العالية لأذية خلوية حادة أومزمنة عاكسة شدة واتساع الآفة النخرية .

تتزامن الآفات ذات التظاهرات النخرية الخلوية والنسيجية الكبيرة عادة بخروج لمحتوى الخلايا من الأنزيمات بشكل خاص نازع هيدرجين اللاكتات والمكونات الأخرى حيث تعاير في الدوران للاستدلال على النخر الخلوي وتموضعه النسيجي وبذلك تستخدم في مجالات التشخيص والتشخيص التفريقي ومتابعة العلاج .

الجدول (١). القيم المرجعية لنظائر * LDH (٧)

	الكلي %
LD1	14-26
LD2	29-39
LD3	20-26
LD4	8-16
LD5	6-16

- *هذه القيم مأخوذة من مصادر مختلفة. .القيم الطبيعية الفعلية قد تتغير من مخبر لآخر

- نظراً لانخفاض نوعية هذا الأنزيم ، من الصعب الاستدلال على مصدر النخر الخلوي عند المعايرة الكلية للأنزيم، لذا من الضروري تفريق نظائر الأنزيم إلى مكوناتها الخمسة لمعرفة المصدر النوعي للأنزيم.
- هناك عدة طرق لتفريق هذه النظائر الأنزيمية (٦):
  ١. الرحلان الكهربائي
  ٢. استخدام ركيزة معينة
  ٣. التثبيط بالحرارة أواليوريا
- على حد علمنا لا يوجد أي مختبر جامعي أومركز طبي يجرى فيه الرحلان الكهربائي لنظائر الأنزيم أومعايرة نظير الأنزيم الأول والثاني بواسطة aHBDH، أوالتثبيط بالطرق المختلفة لذلك في بحثنا هذا سنحاول استخدام طريقة بسيطة وغير مكلفة لتفريق النظائر الثابتة وغير الثابتة بالحرارة وتبيان النتائج على مجموعتي المرضى.

III. المرضى والطرق

أجريت هذه الدراسة المقطعية المستعرضة Cross - Sectional على ٧٥ مريض من المراجعين لمستشفى المواساة الجامعي بدمشق وذلك خلال الفترة الممتدة من ٢٠١٣/١٢/١ لغاية ٢٠١٤/١٢/١، بالاضافة الى ٢٥ عينة شاهد طبيعي.

مجموعة الدراسة : اشتملت الدراسة كل من :

١. المرضى المقبولون في شعبة الأمراض الهضمية في مستشفى المواساة الجامعي بدمشق والذين راجعوا المستشفى بسبب يرقان ثبت أنه ناجم عن أمراض كبدية وترافق مع ارتفاع في قيم أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات
٢. المرضى المقبولون في شعبة الأمراض الدموية في مستشفى المواساة الجامعي بدمشق والذين راجعوا المستشفى بسبب يرقان ثبت أنه ناجم عن أمراض دموية ذات آلية انحلالية وترافق مع ارتفاع في قيم أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات

تم استبعاد مجموعة المرضى التالية من الدراسة :

١. المرضى الذين لديهم ارتفاع في قيم أنزيم نازع هيدرجن اللاكتات والمقبولين في الشعبة الهضمية أوالدموية والذين تبين من خلال إضبارة المريض أن لديهم أمراض مشتركة (مثلاً سرطان بنكرياس مع نقائل كبدية) تعتبر سبباًلارتفاع قيم الأنزيم.
٢. الحوامل المقبولين في الشعبة الهضمية أوالدموية ولديهم ارتفاع في قيم الأنزيم (ارتفاع كاذب)

قسم المرضى إلى مجموعتين (تم تصنيفهم وفق التشخيص الموضوع من قبل الأطباء السريريين في الشعب المقبولين فيها):

١. **المجموعة الأولى** : المصابين بآفات كبدية وعددهم ٤٠
٢. **المجموعة الثانية** : المصابين بفاقات دم انحلالية وعددهم ٣٥

❖ تضمنت **المجموعة الأولى** مرضى :
١. التهاب الكبد وعددهم ٢٥ مريض (١٤ ذكور ، ١١اناث)
- مرضى التهاب الكبد A وعددهم ١٤
- مرضى التهاب الكبدB وعددهم ٧
- مرضى التهاب الكبد C وعددهم ٤

٢. مرضى تشمع كبد تالي للالتهاب وعددهم ١٠ (٧ ذكور ، ٣ اناث)
٣. مرضى سرطان الكبد وعددهم ٥ (٤ ذكور ، ١ اناث)

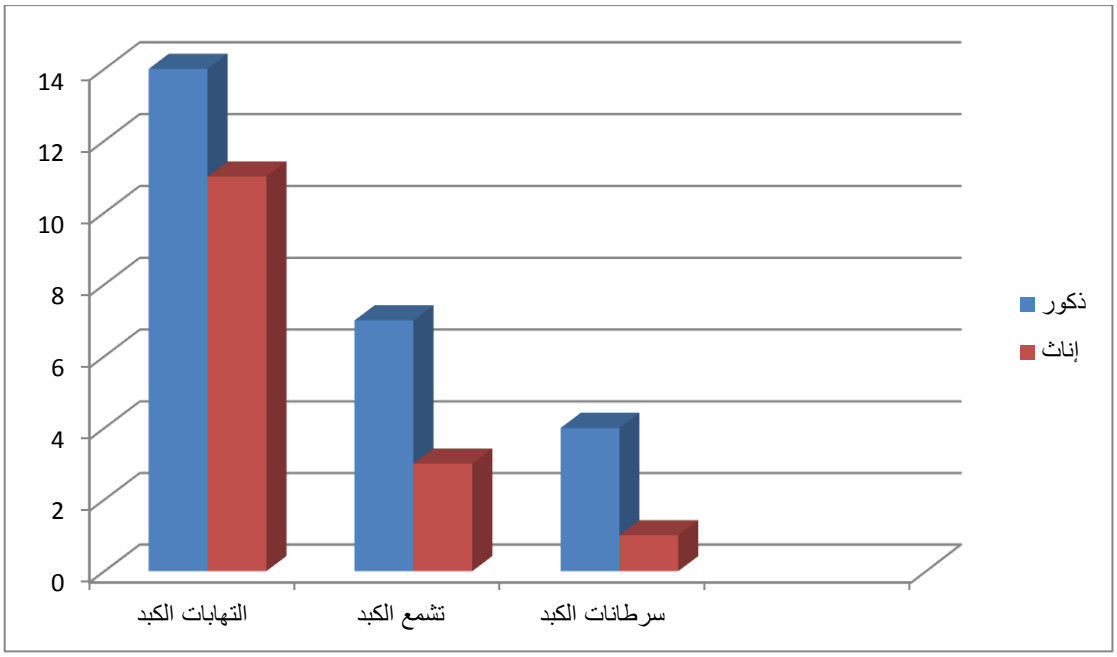
❖ **تضمنت المجموعة الثانية :**
١. مرضى فاقات الدم الانحلالية وعددهم ٢٥(١٢ ذكور ، ١٣ اناث)
- مرضى تلاسيميا وعددهم ١٢
- مرض فقر دم منجلي وعددهم ٩
- مرضى عوز G6PD وعددهم ٤

٢. مرضى فقر الدم عرطل الكريات وعددهم ١٠(٤ ذكور ، ٦ اناث)

بالنسبة للمجموعة الأولى :

الجدول (٢). توزع الحالات حسب الجنس

المرض	ذكور	إناث
التهابات الكبد	١٤	١١
تشمع الكبد	٧	٣
سرطانات الكبد	٤	١



الشكل (١). توزع حالات أمراض الكبد حسب الجنس

- نلاحظ من الجدول أن نسبة الذكور الذين دخلو في الدراسة والمصابين بأمراض كبدية هي ٦٢.٥% مقابل ٣٧.٥% إناث مع ملاحظة أن عدد الذكور ضعف عدد الإناث في حالات تشمع الكبد وهذه النسب لا تؤثر على نتيجة الدراسة لكنها وضعت لأغراض إحصائية.

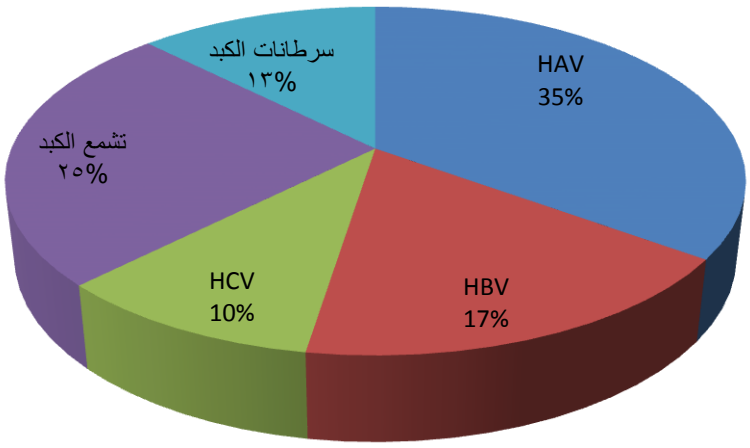
الجدول (٣). توزع الحالات حسب العمر

المرض	العمر
التهابات الكبد	١٨- ٤٠
تشمع الكبد	٥٠ -٦٠
سرطانات الكبد	٥٥- ٦٠

- نلاحظ من الجدول أن متوسط أعمار المرضى الذين دخلوا في الدراسة والمصابين بالتهابات كبدية هو ٢٩ سنة وذلك لشيوع عدد حالات التهاب الكبد A خلال فترة إجراء الدراسة
- بينما نلاحظ أن المرضى المصابين بأورام الكبد وتشمع الكبد من الفئة العمرية الأكبر من ٥٠ سنة حيث تشيع هذه الأمراض في هذه الفئة العمرية.
- لا يؤثر هذا التوزع العمري على نتائج الدراسة وهنا نؤكد على المرضى المسنين حيث تم التأكد من عدم إصابتهم بحالات مرضية مرافقة ترفع قيم أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات ولذا فإن هذه القيم وضعت بغرض إحصائي.

الجدول (٤). توزع الحالات حسب المرض المستبطن المسبب لارتفاع قيم LDH في المجموعة الاولى

المرض		عدد الحالات
التهابات الكبد	**A**	14
	B	7
	C	4
تشمع الكبد		10
سرطانات الكبد		5



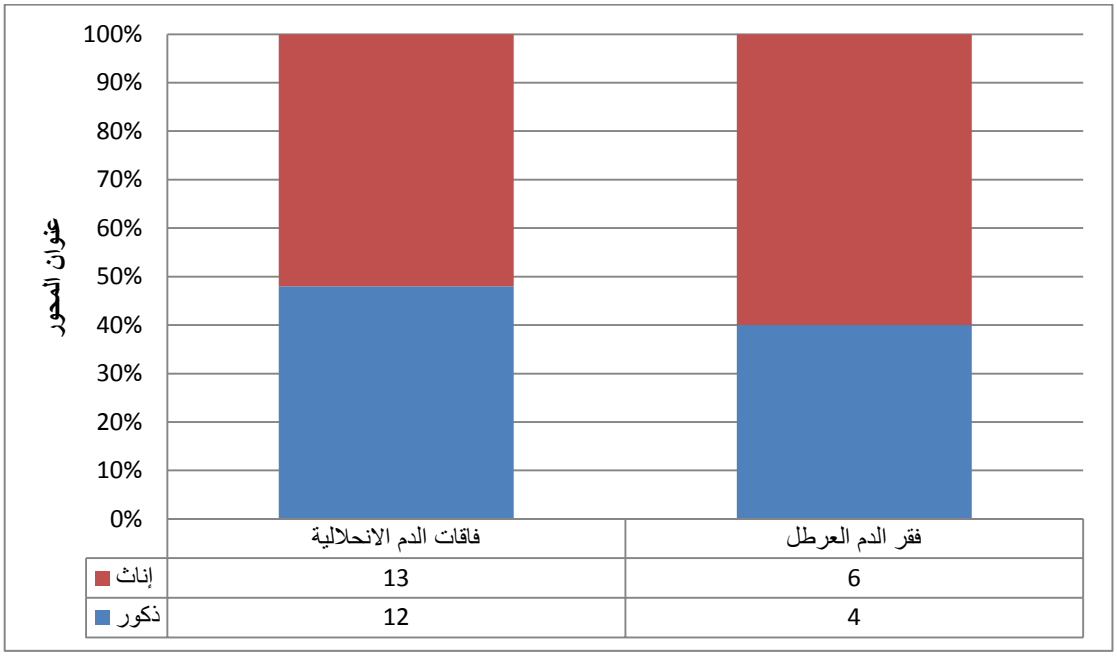
الشكل (2). توزع حالات أمراض الكبد حسب السبب المستبطن

- نلاحظ من الجدول السابق أن ثلثي المرضى (٦٢.٥%) الذين دخلوا في الدراسة مصابون بالتهابات كبدية وفق قبولات الشعبة الهضمية في مشفى المواساة الجامعي
- نسبة المرضى المصابين بالتهاب كبد أ هي ٥٦% وذلك لعودة ظهور المرض خلال الفترة التي تمت فيها دراسة المرضى بينما بقية التهابات الكبد ب و ج شكلت ٤٤%
- مرضى تشمع الكبد وأورام الكبد نسبتهم (٣٧.٥%) وهنا نشير أن نسبة قبولات مرضى هذه الحالات كانت أعلى لكن لم يحقق سوى ١٥ مريض ضمن عدد المرضى الذين دخلو في الدراسة معايير الدخول في الدراسة
- توزع الأمراض في هذه الحالات الكبدية لا يؤثر على نتائج الدراسة من الناحية العملية حيث تختلف هذه الأمراض بالنسبة لدراستنا فقط بقيم ارتفاع أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات ونخص LDH5 المؤكد ارتفاعه النوعي في هذه الحالات المرضية وفق دراسات الرحلان الكهربائي.

بالنسبة للمجموعة الثانية :

الجدول (٥). توزع الحالات حسب الجنس

المرض	ذكور	إناث
فاقات الدم الانحلالية	12	13
فقر الدم العرطل	4	6



الشكل (٣). توزع مرضى فاقات الدم الانحلالية وفقر الدم العرطل حسب الجنس

- نلاحظ من الجدول أن نسبة الذكور الذين دخلو في الدراسة هي ٤٦% مقابل ٥٤% إناث مع ملاحظة أن عدد الذكور يساوي تقريباً عدد الإناث وهذه النسب لا تؤثر على نتيجة الدراسة لكنها وضعت لأغراض إحصائية.

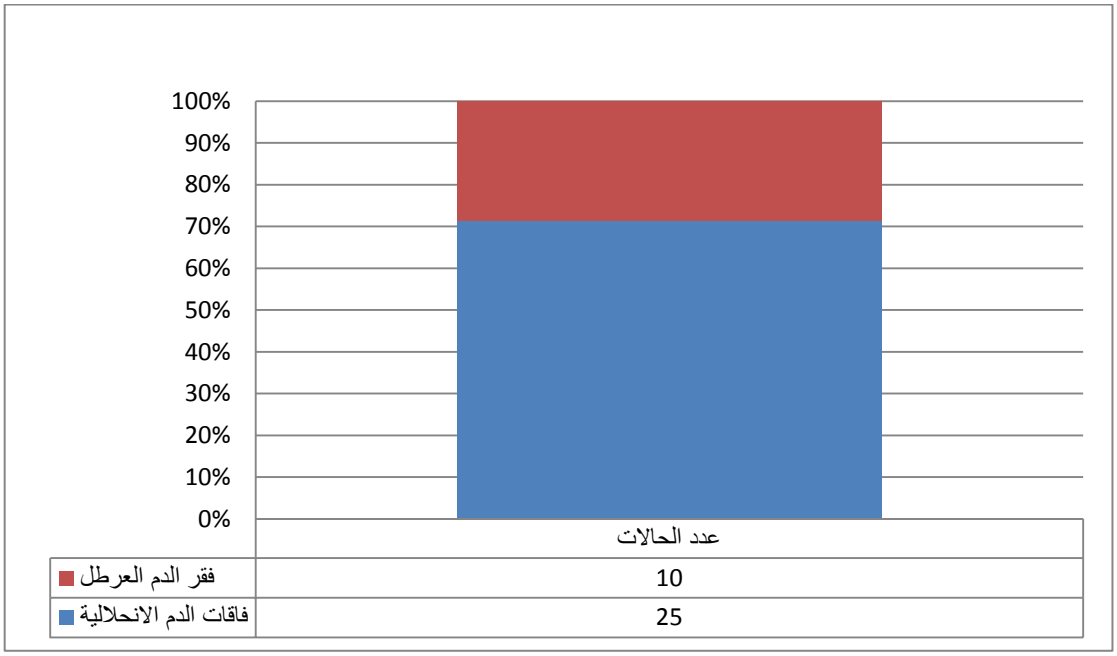
الجدول (٦). توزع الحالات حسب العمر

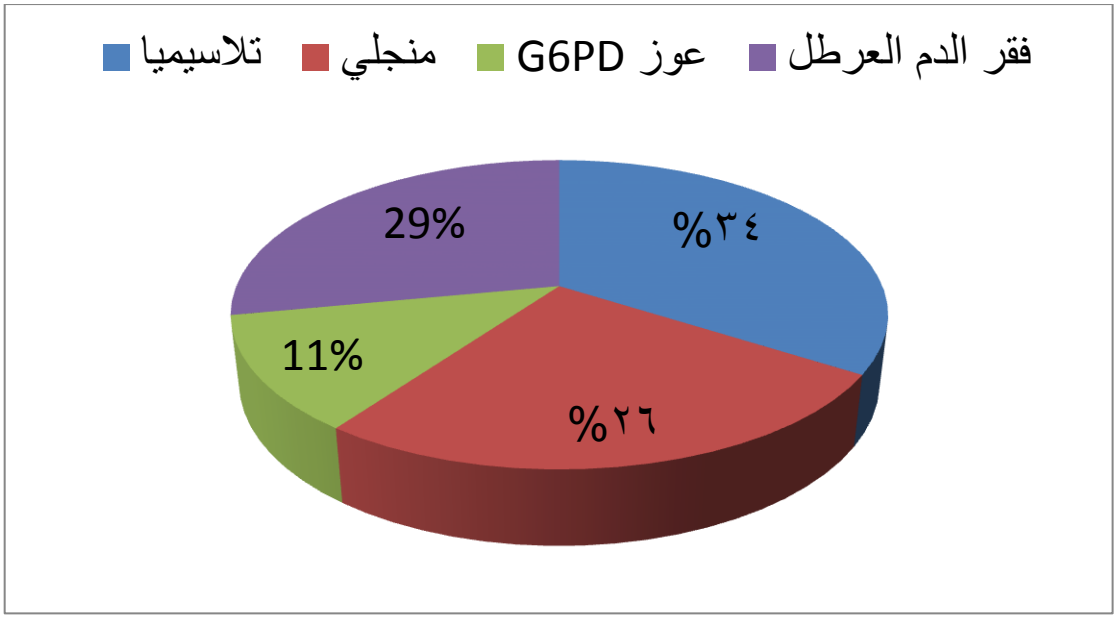
المرض	العمر
فاقات الدم الانحلالية	20 – 30
فقر الدم العرطل	62 – 53

- نلاحظ من الجدول أن متوسط أعمار المرضى الذين دخلوا في الدراسة والمصابين بأمراض دموية هو ٤٦ سنة وذلك وفقاً لقبولات شعبة أمراض الدم في مستشفى المواساة الجامعي علماً أن هذه الأمراض تشيع في هذه الفئة العمرية.

الجدول (٧). توزع الحالات حسب المرض المستبطن المسبب لارتفاع قيم LDH في المجموعة الثانية

المرض	عدد الحالات
فاقات الدم الانحلالية	25
فقر الدم العرطل	10





الشكل(٤). توزع حالات فاقات الدم حسب المرض المستبطن

- نلاحظ من الجدول أن نسبة المرضى المصابين بفاقات دموية انحلالية في الدراسة هي ٧١% .
- نسبة مرضى فقر الدم العرطل هي ٢٩% علماً أن فقر الدم العرطل لا يصنف وفق أمراض الدم ضمن فاقات الدم الانحلالية بشكل مباشر لكنه يسبب انحلال دموي في بعض حالاته ويرتفع فيه أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات بشكل مميز
- هنا نؤكد على تفرد النظير الأنزيمي (LDH1) في هذه الحالات المرضية والمؤكد بدراسة النظائر الأنزيمية بالرحلان الكهربائي.

آلية العمل

تمت الدراسة في مخبر مستشفى المواساة الجامعي بعد أخذ موافقة المرضى.

يراجع المرضى مشفى المواساة الجامعي قسم العيادات الخارجية أمراض الدم والأمراض الهضمية حيث تتم معاينة المريض وقبوله حسب الحالة.

قمنا بالمراجعة اليومية لقبولات الشعبتين الهضمية والدموية في المستشفى وانتقاء المرضى الذين تتحقق فيهم شروط الدراسة وذلك بعد سحب عينات الدم الروتينية في المشفى والتأكد من ارتفاع قيم أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات لديهم وذلك بالاطلاع على الملف الخاص بكل مريض بعد موافقة الشعبتين المذكورتين وبعد أخذ موافقة كل مريض مع التأكيد على المحافظة على السرية التامة للمعلومات الواردة في كل ملف.

تم سحب عينات الدم على انابيب تحتوي على الهيبارين وإجراء المعايرة باتباع الخطوات التالية:

١- تثفيل عينات الدم
٢- تقسيم المصل الطافي في كل عينة الى ثلاث كوفيتات.
٣- معايرة فعالية الأنزيم في الكوفيت الأول لكل عينة مباشرة.
٤- معايرة فعالية الأنزيم في الكوفيت الثاني لكل عينة بعد حضنه مدة نصف ساعة في محم مائي(ميمرت) بدرجة حرارة ٥٦درجة مئوية.
٥- معايرة فعالية الانزيم في الكوفيت الثالث لكل عينة بعد حضنه مدة نصف ساعة في محم مائي بدرجة حرارة ٦٠ درجة مئوية.

بالرغم من ان المحم يعاير حرارته تلقائيا عند تحديد درجة الحرارة المطلوبة، تم التأكد من حرارته باستخدام ميزان حرارة زئبقيٍ.

طريقة المعايرة:

تتم المعايرة إما من بيروفات إلى لاكتات أو من لاكتات الى بيروفات.

تختلف نتائج فعالية الأنزيم بشكل كبير بين الطريقتين حين معايرة فعالية الأنزيم لعينة واحدة.

في الممارسة الطبية يجب وضع القيم المرجعية الطبيعية الى جانب النتيجة المخبرية.

حين استخدام عيار الانزيم في مراقبة تطور حالة مرضية معينة يجب استخدام نفس الطريقة وتوحيد الشروط المخبرية قدر الامكان لكي تكون مقدار التغيرات ذات مصداقية وفائدة في المتابعة.

طريقة المعايرة باستخدام جهاز human auto analysis:

LDH SCE mod اختبار الأمواج فوق البنفسجية

نازع هيدرجين اللاكتات (EC1.1.1.27)

أحجام المجموعات : المرجعية (REF) :

- ١٢٢١٤ ١٦×٥ مل كيت اختبار M كامل
- ١٢٠١٤ ١٠×١٠ مل كيت كامل
- ١٢٠٢٤ ٨×٥٠مل كيت كامل

الطريقة

طريقة معدلة اعتماداً على توصيات اللجنة الاسكندنافية لدراسة الأنزيمات (SCE)

المبدأ

ارجاع البيروفات الى لاكتات والذي يترافق بأكسدة ال NADH إلى NAD ويقاس متوسط تغير الامتصاص الناتج عن أكسدة ال NADH في الدقيقة الواحدة ويضرب بعامل ١٠٠٨٠

$$Pyruvate + NADH + H^+ \rightarrow LDH \rightarrow Lactate + NAD^+$$

المقايسة

- طول الموجة:٣٤٠ نانومتر.
- المسار الضوئي: ١سم
- درجة الحرارة: ٢٥، ٣٠ درجة مئوية.
- القياس: ضد الهواء (ينقص الامتصاص)

سخن الكواشف والأنابيب لدرجة الحرارة المرغوبة، والتي يجب الحفاظ عليها مستمرة (± ٠.٥) طوال مدة الاختبار.

الإجراء

اسكب في الأنابيب	٢٥، ٣٠ درجة مئوية	
العينة الدارئة	٢٠ مكرولتر ١٠٠٠ مكرولتر	
امزج، احضن مدة ١-٥ دقيقة، بدرجة ٢٥,٣٠ درجة مئوية		
الركيزة	٢٥٠ مكرولتر	
امزج، اقرأ الامتصاص بعد دقيقة واحدة وبنفس الوقت شغل ساعة الإيقاف. اقرأ الامتصاص مجدداً بدقة بعد ١، ٢ و٣ دقيقة.		

الحساب

باستعمال قراءات الامتصاص احسب تغير الامتصاص الوسطي بالدقيقة (ΔA/min)

احسب فعالية LDH في العينة بضرب ΔA/min باستعمال العوامل التالية :

	٣٤٠ نانومتر
وحدة/لتر (U/L)(٢٥,٣٠ درجة مئوية) = ΔA/min ×	١٠٠٨٠

ميزات الإجراء

خطياً

عندما يزيد تغير الامتصاص بالدقيقة عن ٠.١٥٠ عند طول موجة ٣٣٤، ٣٤٠ نانومتر أو ٠.٠٧٠ عند ٣٦٥ نانومتر، مدد ٠.١ مل من العينة مع ٠.٩ مل محلول ملحي ٠.٩% وكرر القياس باستعمال هذا التمديد.

اضرب النتيجة ب ١٠.

القيم المرجعية [٢،٣]

درجة الحرارة	٢٥ – ٣٠	
البالغين (وحدة/لتر)	١٦٠ – ٣٨٠	
الرجال (وحدة/لتر)		
النساء (وحدة/لتر)		
الأطفال (وحدة/لتر) (حتى ١٢ شهر)	حتى ٥٠٠	

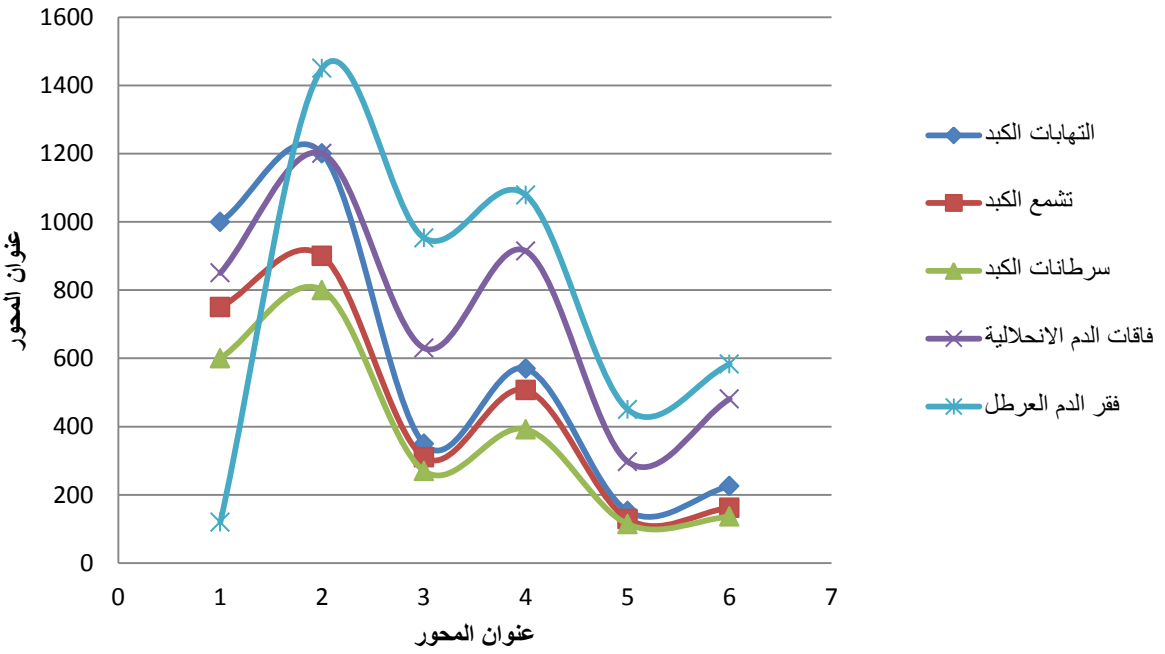
IV. النتائج

الجدول (٨). مقارنة لقيم LDH قبل وبعد التثبيط بالحرارة في المجموعات المرضية

المرض	قيمة LDH قبل التثبيط	قيمة LDH بعد التثبيط بدرجة حرارة ٥٦	نسبة التثبيط	قيمة LDH بعد التثبيط بدرجة حرارة ٦٠	نسبة التثبيط
التهابات الكبد	١٠٠٠-١٢٠٠	٥٧٠-٣٤٩	-٤٨%-٦٧%	٢٢٦-١٥٢	-٨٠%-٨٦%
تشمع الكبد	٩٠٠-٧٥٠	٥٠٧-٣١٠	-٤٥%-٦٥%	١٦٢-١٢٩	-٨٠%-٨٥%
سرطانات الكبد	٨٠٠-٦٠٠	٣٩٢-٢٧٠	-٥١%-٦٢%	١٣٦-١١٤	-٨١%-٨٤%
فاقات الدم الانحلالية	٨٥٠-١٢٠٠	٩١٤-٦٣٠	-١٨%-٢٨%	٤٨١-٢٩٧	-٥٥%-٦٨%
فقر الدم العرطل	١٢٠-١٤٥٠	٩٥٣-١٠٧٨	-١٩%-٢٨%	٥٨٣-٤٥٠	-٥٥%-٦٥%

الجدول (٩). مقارنة لقيم LDH قبل وبعد التثبيط بالحرارة في مجموعة الشاهد

العينة	قيمة LDH قبل التثبيط	قيمة LDH بعد التثبيط نصف ساعة بدرجة حرارة ٥٦	نسبة التثبيط	قيمة LDH بعد التثبيط نصف ساعة بدرجة حرارة ٦٠	نسبة التثبيط
الشاهد	١٦٥-٣٧٥	١٤٤-٣١١	-١٠%٢٢	٥١-١٠٩	-٦٨%٧٨



الشكل (٥). مخطط مقارنة قيم نازع هيدرجين اللاكتات قبل وبعد التثبيط بالحرارة في مجموعتي الدراسة

V. المناقشة

١. تختلف القيم المرجعية لأنزيم نازع هيدرجين اللاكتات ونظائرة الأنزيمية من مرجع لآخر لكن يبقى التوزع النسيجي واحد في خلايا جسم الإنسان
٢. القيمة الكلية لأنزيم نازع هيدرجين اللاكتات تتراوح وفق المراجع المختلفة من ١٥٠ – ٤٠٠ وحدة/لتر
٣. وفق دراسات الرحلان الكهربائي يشكل النظير الأنزيمي الأول نسبة وسطية ٢٢% من قيمة **LDH** الكلي بينما يشكل النظير الأنزيمي الخامس نسبة وسطية ١٠% من القيمة الكلية (تختلف هذه القيم قليلاً حسب المرجع)
٤. أثبتت الدراسات أن النظائر الأنزيمية لنازع هيدرجين اللاكتات منها الأول بشكل رئيسي والثاني بدرجة أقل تعتبر ثابتة بالحرارة، والنظير الخامس وبدرجة أقل الرابع تعتبر حساسة للحرارة، أي عند التعريض لدرجة حرارة ٥٦ درجة مئوية يتثبط النظير الأنزيمي الخامس بشكل أساسي ومع ارتفاع درجة الحرارة بين ٥٦ – ٦٠ (وحتى ٦٣ درجة مئوية) تبدأ النظائر الرابع والثالث وقليلاً الثاني تفقد الفعالية وبدرجة الحرارة من ٦٥ – ٧٠ درجة مئوية يحتفظ النظير الأنزيمي الأول بالجزأ الأكبر من فعاليته وبدرجات الحرارة الأعلى من ٧٠ درجة مئوية تتثبط كل النظائر.
   I. وجد **Plagemann وزملاؤه (١٩٦١)** أن النظير الأنزيمي**LDH5** تثبط بشكل تام بدرجة الحرارة ٥٣ درجة مئوية مدة ٦ دقائق بينما احتفظ النظير **LDH1** بكامل فعاليته حتى بعد ٤٠ دقيقة بنفس درجة الحرارة (بعد تأكيده بالرحلان الكهربائي). (١٢)
   II. أظهر **Kreutzer and Eggels** (١٩٨٨)أن لدرجة حرارة الحضن تأثير كبير على نسب النظائر الأنزيمية المختلفة المحددة بواسطة الرحلان الكهربائي. (١٤)

عندما ترتفع درجة الحرارة من ٣٠ إلى ٦٠ درجة مئوية نلاحظ ارتفاع تدريجي في النسب المئوية للنظير الأنزيمي**LDH1** و**LDH2** بينما تتثبط بقية النظائر الأنزيمية تدريجياً بارتفاع درجة الحرارة بدءاً من ٥٠ درجة مئوية.

الجدول (١٠). النسبة المئوية لفعالية الأنزيم

النظير الأنزيمي	درجة حرارة الحضن				
	٣٠	٤٠	**٥٠**	**٦٠**	**٧٠**
LDH1	٢٧	٢٣	**٢٧**	**٣٧**	**١٠٠**
LDH2	٢٩	٣٢	٣٧	٣٧	٠
LDH3	١٩	٢١	٢٣	٦	٠
LDH4	١١	١٢	١٠	٠	٠
LDH5	١٤	١٢	**٣**	٠	٠

نلاحظ من الجدول أن **LDH5** تثبط بشكل كامل بالتعرض لدرجة حرارة ٥٥ درجة مئوية وأصبحت نسبته المئوية ٠% من القيمة الكلية للLDHبينما حافظ النظير **LDH1**فعاليته حتى درجة الحرارة ٧٠ درجة مئوية وأصبح يشكل ١٠٠% من القيمة الكلية لأنزيم نازع هيدرجين اللاكتات وهذا يتوافق مع دراستنا. (١٣)

٥. أجريت الدراسة على مجموعة الشواهد وعددها ٢٥ شخص، تمت معايرة أنزيم **LDH** لديهم حيث تراوحت هذه القيم بين ١٦٥ – ٣٧٥ **(وسطياً ٢٤٧ وحدة/لتر)**

٦. تمت معايرة قيم الأنزيم بعد الحضن بدرجة **حرارة ٥٦ درجة مئوية** مدة نصف ساعة حيث لوحظ انخفاض بسيط في القيمة الكلية لأنزيم **LDH** مع **نسبة تثبيط وسطية ١٦%** وهذا يوافق النسب المرجعية للجزء الحساس للحرارة أي **LDH5** وبدرجة أقل **LDH4** ، حيث نلاحظ أن أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات احتفظ بالجزء الأكبر من فعاليته والتي تمثلها بقية النظائر.

٧. تمت معايرة قيم الأنزيم بعد الحضن بدرجة حرارة ٦٠ درجة مئوية مدة نصف ساعة حيث لوحظ انخفاض في القيمة الكلية لأنزيم **LDH** مع نسبة تثبيط **وسطية تقريباً ٧١%** وهذا يتوافق مع القيم المرجعية للنظائر الأنزيمية حيث تتثبط فعالية النظائر **LDH5،LDH4، LDH3** ويحتفظ النظير الأنزيمي الأول وجزئياً الثاني بفعاليته في عدد من العينات وفي عدد آخر تقريباً ٧٥% من هذه الفعالية.

٨. بالنسبة **لمجموعة المرضى** :

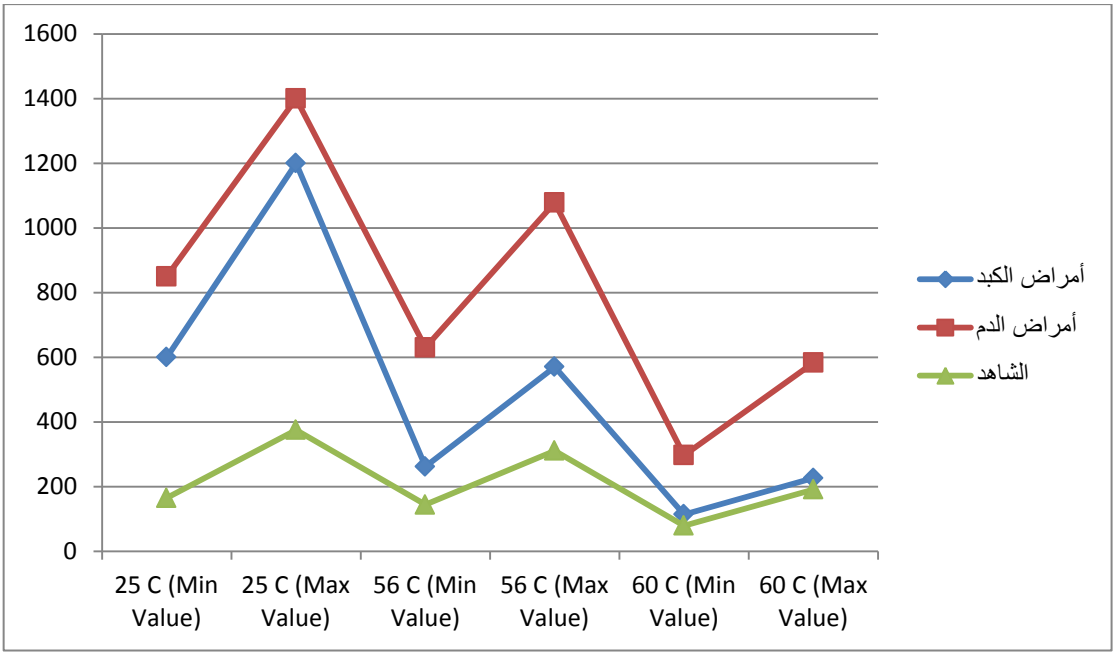
- نلاحظ من الجدول أن المرضى المصابين بآفات كبدية معزولة كانت لديهم قيم **LDH** تتراوح بين ٦٠٠ – ١٢٠٠ وحدة/لتر **(وسطياً ٩٩٠ وحدة/لتر)**
- بالمقارنة مع الشاهد نلاحظ ارتفاع قيمة **LDH** تقريباً ٣- ٤ أضعاف الطبيعي.
- تمت معايرة الأنزيم بعد حضن العينات بدرجة حرارة ٥٦ درجة مئوية مدة نصف ساعة ولاحظنا انخفاض في قيمة الأنزيم الكلية (وسطياً ٤١٤ وحدة/لتر) أي انخفاض القيمة حتى النصف وأكثر قليلاً في بعض المرضى مع نسبة تثبيط وسطية **٥٨%**.
- نلاحظ هنا بالمقارنة مع الشواهد أن نسبة التثبيط ارتفعت ٣-٤ أضعاف وهذا يوافق الحقيقة المتمثلة بارتفاع النظير الأنزيمي الخامس (الكبدي) وبدرجة أقل الرابع في الآفات الكبدية وتثبطها بدرجة الحرارة ٥٦ درجة مئوية مع احتفاظ بقية النظائر بفعاليتها الطبيعية .
- تمت معايرة الأنزيم بعد حضن العينات بدرجة حرارة ٦٠ درجة مئوية مدة نصف ساعة ولاحظنا انخفاض في قيمة الأنزيم الكلية (وسطياً ١٧٠ وحدة/لتر) أي انخفاض القيمة الى اقل من الربع مع نسبة تثبيط وسطية **٨٣%**.
- نلاحظ بالمقارنة مع الشاهد أن الجزء المتبقي من فعالية الأنزيم الكلية يتوافق مقارنة بالقيم المرجعية مع نسبة الجزء الثابت بالحرارة وهو النظير الأنزيمي الأول،أي حدث تثبيط لجميع النظائر الأنزيمية عدا النظير الأول .
- نلاحظ من الجدول أن المرضى المصابين بآفات دموية معزولة كانت لديهم قيم **LDH** تتراوح بين ٨٥٠ – ١٤٥٠ وحدة/لتر **(وسطياً ١١٢٠ وحدة/لتر)**
- بالمقارنة مع الشاهد نلاحظ ارتفاع قيمة **LDH** تقريباً ٥ أضعاف الطبيعي.
- تمت معايرة الأنزيم بعد حضن العينات بدرجة حرارة ٥٦ درجة مئوية مدة نصف ساعة ولاحظنا انخفاض في قيمة الأنزيم الكلية

(وسطياً ٨٥٨ وحدة/لتر) أي انخفاض القيمة بمقدار ٢٠-٢٥% تقريباً مع نسبة تثبيط وسطية **٢٣%**، يفسر ذلك بثتبط النظير الحساس للحرارة الرابع والخامس وبقاء بقية النظائر محتفظة بفعاليتها، النظير الأول بشكل خاص الذي يرتفع بشكل كبير في الفاقات الدموية .

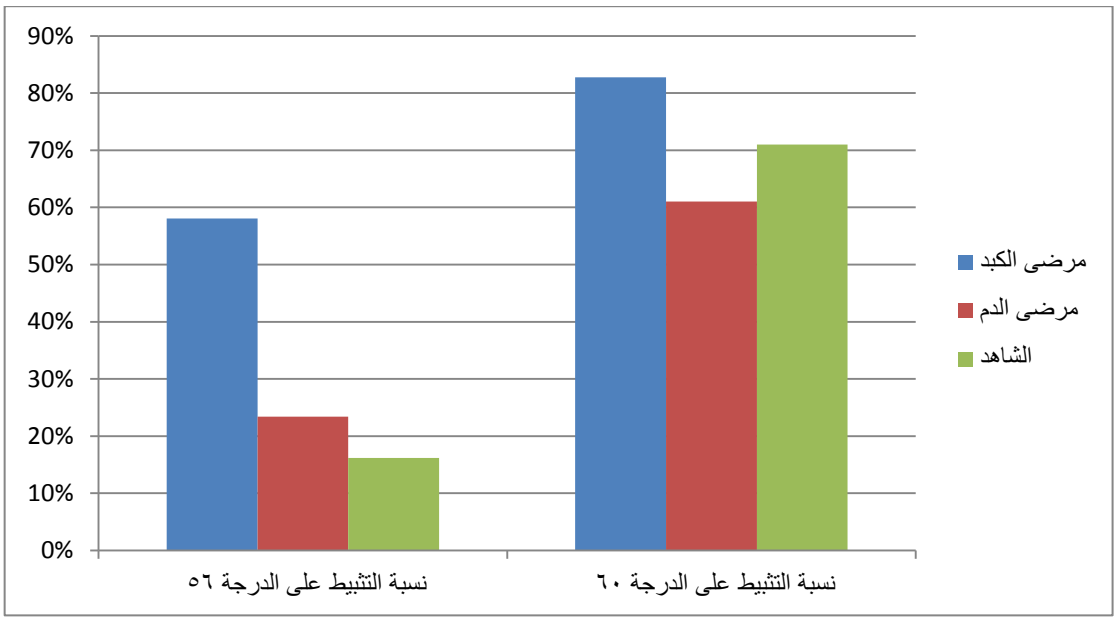
- تمت معايرة الأنزيم بعد حضن العينات بدرجة حرارة ٦٠ درجة مئوية مدة نصف ساعة ولاحظنا انخفاض في قيمة الأنزيم الكلية (وسطياً ٤٣٤ وحدة/لتر) أي انخفاض القيمة حتى النصف مع **نسبة تثبيط وسطية ٦١%**.
- نلاحظ بالمقارنة مع الشاهد أن الجزء المتبقي من فعالية الأنزيم الكلية يتوافق مقارنة بالقيم المرجعية مع نسبة الجزء الثابت بالحرارة وهو النظير الأنزيمي الأول،أي حدث تثبيط لجميع النظائر الأنزيمية عدا النظير الأول المرتفع أساساً في المرض الدموي، أي الفعالية المتبقية هي للنظير **LDH1** .

الجدول (١١). مقارنة بين الشاهد والمجموعات المرضية قبل وبعد التثبيط

	القيمة الوسطية لل**LDH**	نسبة التثبيط بعد الحضن بدرجة ٥٦ درجة مئوية مدة نصف ساعة	قيمة **LDH**	نسبة التثبيط بعد الحضن بدرجة ٦٠ درجة مئوية مدة نصف ساعة	قيمة **LDH**
الشاهد	٢٤٧ **± ٥٦**	١٦%	**٢٠٧ ± ٤٥**	٧١%	**١٢٥ ± ٣٣**
مرضى الكبد	٩٩٠ **± 180**	٥٨%	**٤١٤ ± ٨٤**	٨٣%	**١٧٠ ± ٣٤**
مرضى الدم	**١١٢٠ ± ٨٤**	٢٣%	**٨٥٨ ± ١٢٧**	٦١%	**٤٣٤ ± ٨٥**



الشكل (٦). مخطط لمقارنة القيم الصغرى والكبرى قبل وبعد التثبيط بين الشاهد والمجموعات المرضية



الشكل(٧). نسبة التثبيط الوسطية لنازع هيدرجين اللاكتات

أجريت Two-way ANOVA لدراسة اختلاف القيم الوسطية لل LDH ضمن مجموعة مرضى الكبد وضمن مجموعة مرضى الدم قبل وبعد التثبيط بالحرارة (على الدرجة ٥٦ و ٦٠)، واختلاف القيم الوسطية بين المجموعتين، ويبين الجدول التالي نتائج الدراسة:

قيمة P هي <٠.٠٠١ في كلتا الحالتين (ضمن مجموعة المرضى الواحدة وبين المجموعتين)، أي ان الاختلاف بين القيم الوسطية لل LDH ضمن مجموعة مرضى الكبد وضمن مجموعة مرضى الدم قبل وبعد التثبيط بالحرارة، واختلاف القيم الوسطية بين المجموعتين ذو قيمة احصائية بموثوقية تتجاوز ٩٩%.

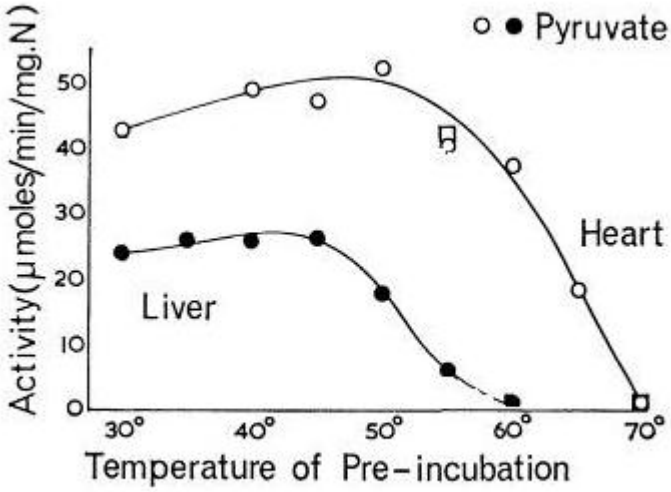
VI. الدراسات المقارنة

❖ **Plummer and Wilkinson (١٩٦٣) :** درس هذان العالمان تأثير الحضن المسبق لأنزيم نازع هيدرجين اللاكتات بدرجات حرارة مختلفة مدة ٣٠ دقيقة على معدلات إرجاع البيروفات مستخدما عينات من مرضى قلبيين وكبديين.

الحضن المسبق للأنزيم بدرجة حرارة أقل من ٥٠ درجة مئوية ذو تأثير بسيط على الأنزيم وإرجاعه للبيروفات.

بدرجات الحرارة الأعلى من ٥٠ والأقل من ٦٠ درجة مئوية تبين أن المستخلص الكبدي والمتمثل بشكل رئيسي بالنظير الأنزيمي**LDH5**وبدرجة أقل**LDH4 أقل ثباتية من المستخلص القلبي المتمثل بالنظير الأنزيمي**.**LDH1**

بدرجة الحرارة ٦٠ درجة مئوية يتثبط النظير الأنزيمي الكبدي بشكل كامل بينما يحتفظ النظير الأنزيمي القلبي ب ٧٥% من فعاليته. (١١)



الشكل (٨). مقارنة نسبة تثبيط ldh1 و ldh5 مع ارتفاع درجة الحرارة

نلاحظ من المخطط أنه بدرجة الحرارة أكبر من ٥٠ وأقل من ٦٠ بدأ تثبيط **LDH5**حيث بلغت نسبة التثبيط أكثر من ٧٥% بدرجة ٥٥ وتثبط بشكل كامل بدرجة ٦٠ درجة مئوية .
بينما حافظ النظير الأنزيمي**LDH1** على فعاليته حتى ٦٠ درجة مئوية ، وهذه النتائج تتوافق مع نتائج دراستنا.

❖ دراسة أجريت في مشافي جامعة مينيسوتا في الولايات المتحدة عام ١٩٦٧ عنوان الرسالة :(٢٨)

Serum Lactate Dehydrogenase Evaluation in Ambulatory Cardiac Patients Evidence for Chronic Hemolysis

ملخص:

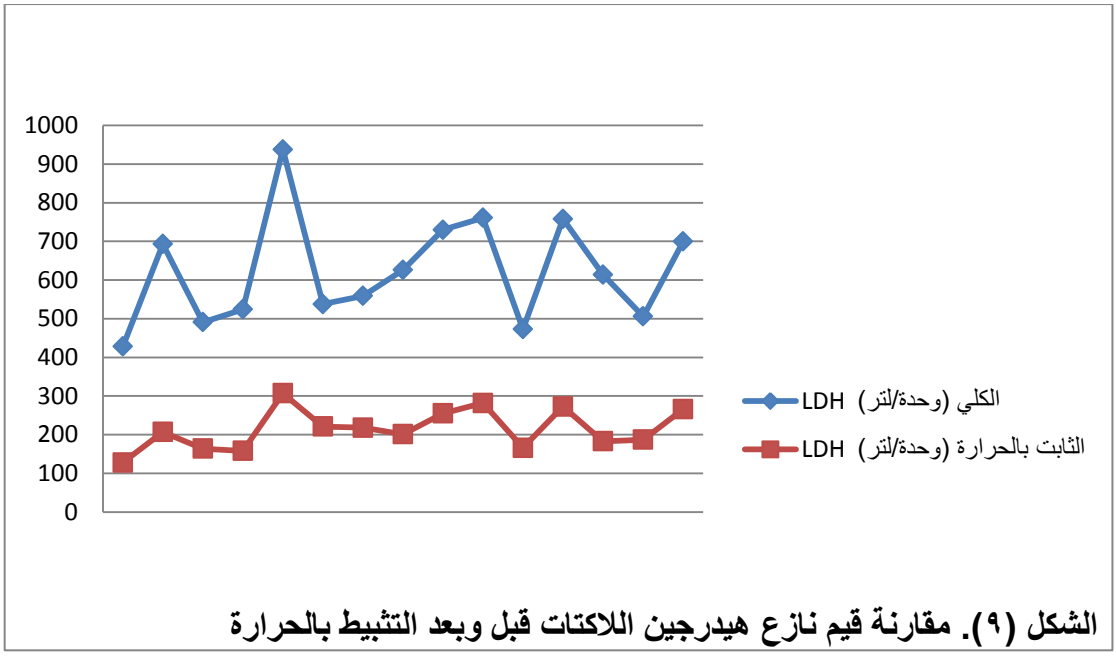
أجريت هذه الدراسة على ٦٢ مريض مجرى لهم تبديل صمام قلبي صنعي (بغض النظر عن نوع الصمام) وتمت متابعة المرضى من الناحية القلبية، منهم ١٥ مريض (العدد المقارن مع دراستنا) كانت لديهم الوظيفة القلبية جيدة جداً إلى ممتازة من الناحية السريرية والمخبرية والشعاعية خلال فترة متابعة وسطياً سنة باستثناء ارتفاع في قيم انزيم نازع هيدرجين اللاكتات الكلي، فسروا هذا الارتفاع بانحلال دموي مزمن لدى هؤلاء المرضى ناجم

عن وجود الصمام الصنعي على حساب الجزء الثابت او المقاوم للحرارة، وقد أثبتوا ذلك بالرحلان.

أجري تثبيط بدرجة الحرارة ٦٥ درجة مئوية مدة نصف ساعة على عينات من مصل هؤلاء المرضى، وحصلوا على النتائج الموضحة في الجدول. (٢٧)

الجدول (١٢). ملخص دراسة مشافي جامعة مينيسوتا

المريض	العمر	الجنس	LDH الكلي (وحدة/لتر)	LDH الثابت بالحرارة (وحدة/لتر)	نسبة التثبيط (%)
٤٨	٣٣	F	428	١٢٨ (٣٠%)	% ٧٠
٤٩	٥٢	F	693	207 (٢٩.٨%)	%٧٠.٢
٥٠	٤٨	F	491	164 (٣٣.٤%)	%٦٦.٦
٥١	٤٦	F	524	158 (٣٠%)	%٧٠
٥٢	٢٩	F	938	307 (٣٢.٧%)	%٦٧.٣
٥٣	٤٤	F	538	٢٢١ (٤١%)	%٥٩
٥٤	٤٩	F	559	٢١٨ (٣٩%)	%٦١
٥٥	٥٦	M	626	٢٠١ (٣٢%)	%٦٨
٥٦	٢٨	M	730	٢٥٥ (٣٤.٩%)	%٦٥.١
٥٧	٤٣	F	761	٢٨٢ (٣٧%)	% ٦٣
٥٨	٣٦	F	473	١٦٦ (٣٥%)	%٦٥
٥٩	٥٣	F	758	٢٧٣ (٣٦%)	%٦٤
٦٠	٤٨	F	614	١٨٣ (٢٩.٨%)	%٧٠.٢
٦١	٣٨	F	506	١٨٧ (٣٧%)	%٦٣
٦٢	٤٤	M	700	٢٦٦(٣٨%)	%٦٢



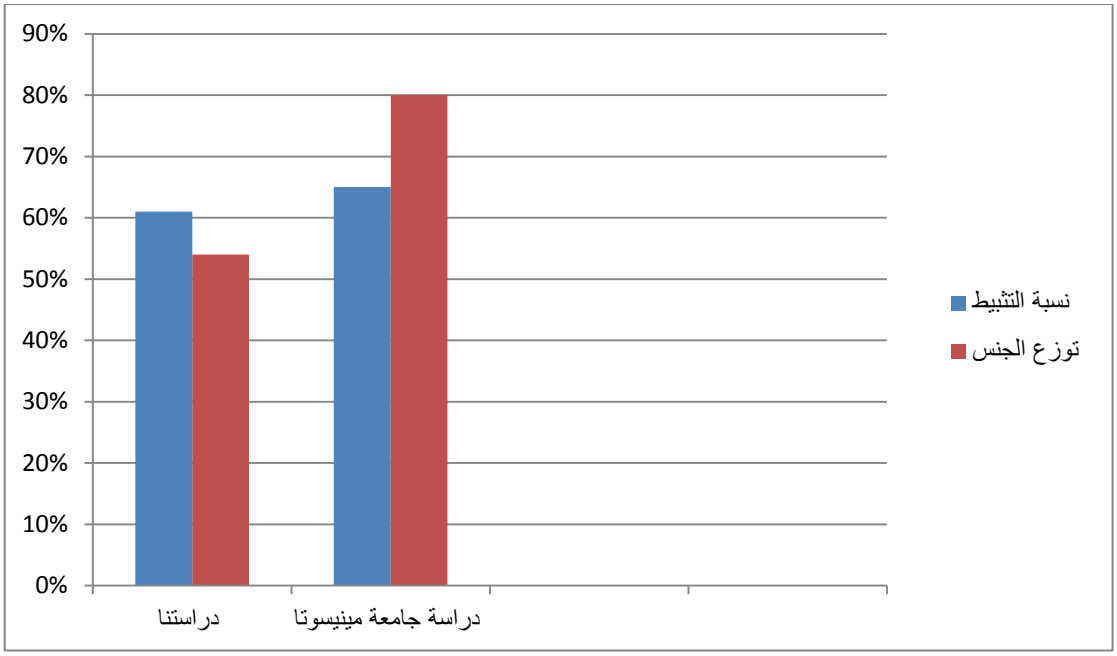
الشكل (٩). مقارنة قيم نازع هيدرجين اللاكتات قبل وبعد التثبيط بالحرارة

- العمر الوسطي للمرضى في هذه الدراسة ٤٢ سنة بالمقارنة مع دراستنا ٤٦ سنة ولا يؤثر ذلك على النتائج، ذكر فقط للبيان الإحصائي.
- غالبية المرضى في هذه الدراسة من الإناث (٨٠%) بالمقارنة مع دراستنا ٥٤% من المرضى إناث ولذلك أهمية فقط من الناحية الإحصائية.
- نسبة التثبيط الوسطية في هذه الدراسة بعد الحضن بدرجة حرارة ٦٥ درجة مئوية مدة نصف ساعة ٦٥% أي أن جميع نظائر LDH تثبطت عدا النظير LDH1 والذي بلغت نسبته الوسطية بعد الحضن ٣٥% من القيمة الكلية (وذلك أكد في هذه الدراسة بواسطة الرحلان الكهربائي)
- بالمقارنة مع دراستنا بلغت نسبة التثبيط بعد الحضن نصف ساعة بدرجة حرارة ٦٠ درجة مئوية نصف ساعة ٦١% أي أن جميع نظائر LDH تثبطت عدا النظير LDH1 وبدرجة أقل LDH2
- تتوافق نتائج التثبيط في هذه الدراسة مع نتائج دراستنا .
- تفسير النتائج: وجد أن هؤلاء المرضى والذين لديهم وظيفة قلبية جيدة جداً إلى ممتازة مع صمامات صنعية لديهم اضطراب هيموديناميكي دموي وفسر هذا الارتفاع في قيمة LDH الكلية على حساب الجزء

الثابت بالحرارة وجود انحلال دموي مزمن معاوض والذي يرفع LDH1 وربما بدرجة أكبر LDH2 والذي تثبط بشكل كامل بعد التعريض لدرجة الحرارة ٦٥ درجة مئوية

الجدول (١٣). مقارنة دراسة جامعة مينيسوتا بدراستنا

	العمر	الجنس	نسبة التثبيط بعد الحضن ٦٠ درجة نصف ساعة	نسبة التثبيط بعد الحضن ٦٥ درجة نصف ساعة
دراستنا	٤٦	٥٤% إناث	٦١%	-
دراسة جامعة مينيسوتا	٤٢	٨٠% إناث		٦٥%



شكل رقم (١٠) مقارنة دراسة جامعة مينيسوتا بدراستنا

❖ دراسة أجريت في Tarrytown في نيويورك من قبل الجمعية الأمريكية للبحث الكيميائي (ACS) عام ١٩٧٥ من قبل Rush وزملاؤه

Method of Heat Fractionationg LDH into Isoenzymes Components

- طريقة تجزيء أنزيم نازع هيدرجين اللاكتات لتحديد فعالية النظائر الأنزيمية في الأمراض الكبدية والقلبية وذلك في درجات PH مختلفة، وذلك لأهداف تشخيصية. (٢٦)
- وجدوا أن النظير الأنزيميLDH5 يثبط بشكل كامل تقريباً في مصل الأشخاص الطبيعيين وسطياً بنسبة ١٠% من قيمة LDH الكلية عند حضن العينة بدرجة حرارة ٥٦ درجة مئوية مدة نصف ساعة .
- بالنسبة للمرضى الكبديين (إصابات كبدية حادة أومزمنة)، وجدوا أن النظير الأنزيميLDH5 يتثبط بنسبة تتراوح بين ٣٠% - ٧٠% من قيمة LDH الكلية عند حضن العينة بدرجة حرارة ٥٦ درجة مئوية مدة نصف ساعة .
- علماً أن الدراسة لم تحدد عدد الأشخاص الطبيعيين المجرى عليهم الاختبار، لكن أجريت على ٨ مرضى كبد
- تأكيد نتائج التثبيط بالحرارة بواسطة إجراء رحلان كهربائي على العينات.
- نتائج هذه الدراسة توافق نتائج دراستنا .

الجدول (١٤). مقارنة دراسة Rush وزملاؤه بدراستنا

نسبة التثبيط الوسطية بعد الحضن بدرجة حرارة ٥٦ درجة مئوية			
دراستنا		دراسة Rush وزملاؤه	
الشاهد	مرضى الكبد	الشاهد	مرضى الكبد
%١٦	%٥٨	%١٠	%٥٤

VII. الخلاصة

إن مصل المرضى المصابين بفقر الدم العرطل وفقر الدم الانحلالي والذين لديهم ارتفاع في قيم نظائر نازع هيدرجين اللاكتات ١ و٢ أقل حساسية للتثبيط بالحرارة من مصل المرضى المصابين بأمراض كبدية حيث يرتفع فيها النظير ٤ و٥ بصورة مسيطرة.

وفقاً لقيم الثبيط عند التعرض لدرجة حرارة ٥٦ درجة مئوية يمكن التوجه لتقييم مبدئي لطبيعة المرض المسبب ليرقان (أو ارتفاع قيم البيليروبين) إذا كان من مصدر كبدي أو دموي حيث أن انخفاض فعالية نازع هيدرجين اللاكتات بنسبة ٤٥ – ٦٧% دليل على ارتفاع النظير الأنزيمي الخامس (الحساس للحرارة) وبدرجة أقل الرابع وبالتالي التوجه نحو مشكلة كبدية، بينما انخفاض فعاليته بنسبة ١٨ – ٢٨% يوجه لمشكلة دموية انحلالية.
إن النظائر LDH 4, LDH5 تتثبط بشكل كامل تقريباً عند التعرض لدرجة حرارة ٦٠ درجة مئوية بينما يقاوم النظير LDH1 الحرارة ويحافظ على فعاليته كاملة عند هذه الدرجة.

☒ التوصيات:

١. رغم أن الرحلان الكهربائي هو حالياً الطريقة المرجعية لفصل النظائر الأنزيمية لكنه يحتاج وقتاً وتجهيزات (كلفة عالية) لذا تعتبر طريقة التثبيط بالحرارة طريقة سهلة وعملية وسريعة ويمكن إجراؤها في أبسط المخابر ودون الحاجة لتجهيزات نوعية لذا نوصي بتطبيقها في مخابرنا وخاصة الإسعافية منها
٢. يمكن الاستفادة من هذه الطريقة من الناحية التشخيصية حيث يرتفع كل نظير أنزيمي بشكل نوعي تقريباً في إصابات عضوية محددة حيث يرتفع النظير الأنزيمي الخامس بشكل خاص بالإصابات الكبدية الحادة والمزمنة بينما يرتفع النظير الأول في الفاقات الدموية .
٣. طريقة مخبرية تغني عن الرحلان الكهربائي لتحديد النظير الأنزيمي في مجموعة الدراسة.

References

1. *R.W.Richardson and C.P. Price, J.***Clin.Pathol**.*G.P.ELLS andG.B.WEST*. **Progress in Medicinal Chemistry Volume13**. North Holland Publishing Company – Amsterdam x ; 761,(1972).
2. *B. E. Statland and A. L. Louderback*, **Clin . Chem***G.P.ELLS andG.B.WEST*. **Progress in Medicinal Chemistry Volume13**. North Holland Publishing Company – Amsterdam:972,(1972)
3. J. King, J. Med . Lab . Technol. *G.P.ELLS andG.B.WEST*. **Progress in Medicinal Chemistry Volume13**. North Holland Publishing Company – Amsterdam;265,(1989).
4. David M . Goldberg, **Clinical Enzymology** ; *G.P.ELLS andG.B.WEST*. **Progress in Medicinal Chemistry Volume13**. North Holland Publishing Company – Amsterdam; 55 – 70:(1980).
5. Wroblewski, F and LaDue, J.S , **Lactic dehydrogenase activity in blood**. David Seligson . **Clinical Chemists (V4),**ACADEMIC PRESS INC, New York; 90-210.(1988)
6. Freeman, M.E, Clinical enzyme unitage. **Clin. Chem**. David Seligson. **Clinical Chemists (V4),**ACADEMIC PRESS INC, New York; 199,(1988).
7. Erickson, R.J and Morales. **Clinical use of Lactic Dehydrogenase**. David Seligson. **Clinical Chemists (V4),**ACADEMIC PRESS INC, New York (1986); 265, 478.
8. Hill, B. R. **Some properties of serum Lactic Dehedrogenase** . David Seligson. **Clinical Chemists (V4),**ACADEMIC PRESS INC, New York; 460 - 467(1980).
9. Hsieh,K. M. Suntzeff and Cowdry, **Compartive study of LDH activity in transplanted and induced tumors** .David Seligson.**Standard Methods of Clinical Chemistry**, ACADEMIC PRESS INC, New York 237 (1989).

10. Bobansky and Scholler . **Comparsion of PHI and LDH activities in plasma, liver and tumor tissue.** David Seligson.**Standard Methods of Clinical Chemistry**, ACADEMIC PRESS INC, New York 891 (1988)
11. Plummer,D,T .Elliott and Wilkinson, **Techniques for Separation of Isoenzymes**, J, Henry Wilkinson, **Isoenzymes**, Chapman and Hall , Lincoln ,416 (1963).
12. Plagemann , Gregory and Wroblewski, **Techniques for Separation of Isoenzymes**, J, Henry Wilkinson, **Isoenzymes**, Chapman and Hall , Lincoln, 235-2282 (1961).
13. Kreutzer, and Eggels **, Techniques for Separation of Isoenzymes**, J, Henry Wilkinson, **Isoenzymes**, Chapman and Hall , Lincoln, 80 (1988).
14. Kunkel and Fennis **, Clin . ChimActa.** , J, Henry Wilkinson, **Isoenzymes**, Chapman and Hall , Lincoln, 64 (1965).
15. ***Sowdhamini, R. and Balaram, P.Protein structure and stability. In Thermostability of Enzymes*** *(ed. N. M. Gupta)Berlin: Springer-Verlag.pp. 2-21(1993).*
16. ***Taneja, S. and Ahmad, F.*** *Increased thermal stability of proteins in the presence of amino acids. Biochem. J.303,147 -153.(1994).*
17. Ebyen, F.E., "A systematic review of lactate dehydrogenase isoenzyme 1 and germ cell tumors", Clinical Biochemistry, vol. 34, pp. 441-454. (2001)
18. Graham L. PatrickEnzymes: Structure and Function. An Introduction to Medicinal Chemistry. 4th edition. New York: Oxford University Press Inc. p30-41. . (2009).
19. Koolman, J. &Roehm, K. M., Color atlas of biochemistry, 2nd ed, Georg ThiemeVerlag. (2005)
20. Hummel, W., Schfitte, H. & Kula, M., "Large scale production of D-lactate dehydrogenase for the stereospecific reduction of pyruvate and phenyipyruvate", European Journal of Applied

Microbiology and Biotechnology, vol. 18, no. pp. 75-85. (1983)
21. Tabbara IA. Hemolytic anemias. Diagnosis and management. Med Clin North Am.;76: 649-668:(1992).
22. Neely CL, Wajima T, Kraus AP, Diggs LW, Barreras L. Lactic acid dehydrogenase activity and plasma hemoglobin elevations in sickle cell disease. Am J Clin Pathol;52: 167-169:(1969).
23. Kopperschlager G, Kirchberger J. Methods for the separation of lactate dehydrogenases and clinical significance of the enzyme. J Chromatogr B Biomed Appl;684: 25-49,(1996)
24. Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, et al; American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology*; 51:2193–2213:(2010).
25. Cassidy WM, Reynolds TB: **Serum lactic dehydrogenase in the differential diagnosis of acute hepatocellular injury.** *J ClinGastroenterol*, **19:**118-121(1994).
26. Rotenberg Z, Weinberger I, Davidson E, Fuchs J, Harell D, Agmon J: **Alterations in total lactate dehydrogenase and its isoenzyme-5 in hepatic disorders.** *Ann Clin Lab Sci*,**20:**268-273.(1990).
27. Fok,F. and Schubothe : Studies on various factor influencing mechanical haemolysis of human erythrocytes , Brit J Haemat 6 ; 355, (1986).
28. Pirofsky ,B: Hemolysis in valvular heart disease. Ann Intern Med 65: 373.(1990).