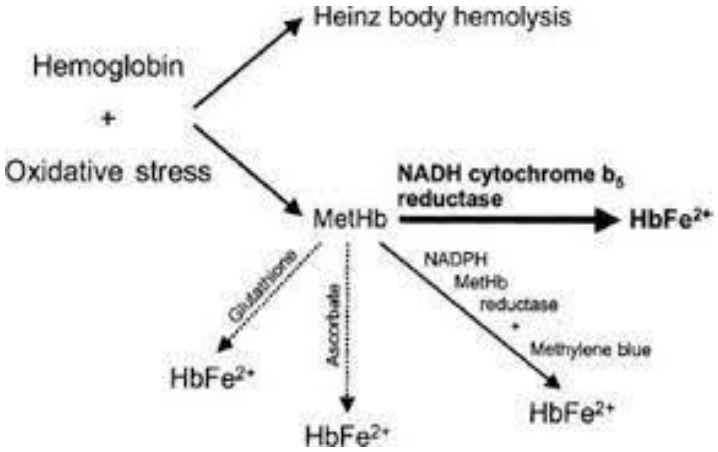
الجلسة العملية التاسعة

معايرة الميتهيموغلوبين في الدم

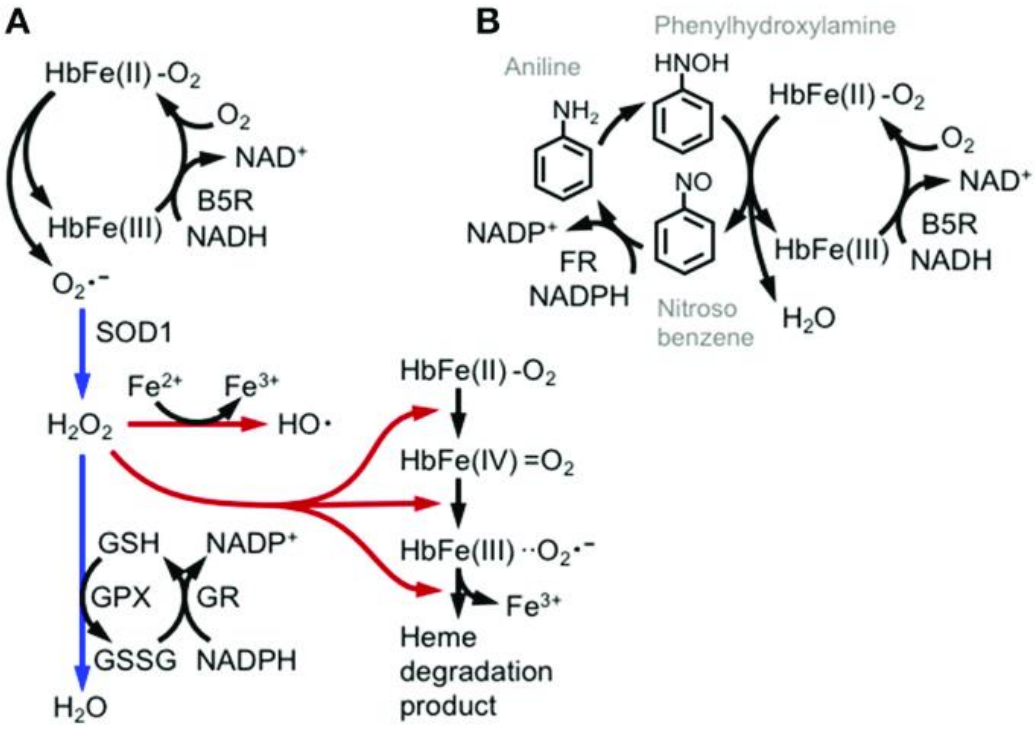
الميتهيموغلوبين هو هيموغلوبين تحول فيه الحديد الثنائي الى حديد ثلاثي و أصبح غير قادر على نقل الاوكسيجين من الرئتين الى باقي انحاء الجسم .

يتراوح المقدار الطبيعي للميتهيموغلوبين بين 1-2% من الهيموغلوبين الكلي . و تقوم الانزيمات المرجعة للميهيموغلوبين بالمحافظة على هذا المستوى الطبيعي .



و تزداد نسبة metHb في الحالات التالية :

- نقص الانزيمات المرجعة للميتهيموغلوبين
- وجود خلل في بنية الهيموغلوبين نفسه
- التسمم ببعض الأدوية و المواد السامة ذات الطبيعة المؤكسدة



جدول يبين بعض المركبات التي تسبب تشكل metHb :

acetanilide	nitrobenzene
P-aminosalicylic acid	nitroethane
amyl nitrate (15)	nitrofurane
aniline	nitroglycerine (21)
benzocaine (16)	nitroprusside
cetacaine (17)	paraquat
chloroquinone	phenacitin
clofazimine	phenazopyridine
dapsone (18)	prilocaine (22)
hydroxylamine	primaquine
isobutyl nitrite (19)	resorcinol
lidocaine	silver nitrate
mafenide acetate (13)	sodium nitrate
menadione	sodium nitrite (23)
metoclopramide	sodium valproate
naphthalene	sulphonamide antibiotics
naphthoquinone	trinitrotoluene
nitric oxide (20)	
Numbers in brackets - referenced case histories	

مبدأ المعايرة :

يعتمد على امتصاص metHb الذي يكون بطول موجة 630 نانومتر , بينما أوكسي هيموغلوبين و سيانوميتهيموغلوبين يمتص قليلا .

الكواشف :

- فري سيانيد البوتاسيوم (هيكساسيانوفيرات) 0.152 M يحفظ في زجاجة ملونة و عاتمة بعيدا عن الضوء
  5 غ من فيري سيانيد في 100 مل ماء مقطر
- سيانيد البوتاسيوم 0.077 M
  50 ملغ سيانيد في 10 مل ماء مقطر
- دارئة الفوسفات PH = 7

فوسفات ثنائية الصوديوم 12 H2O	7.91 g
فوسفات احادية الصوديوم 2H2O	4.35 g
ماء مقطر حتى	1000 ml

طريقة العمل :

- يجمع الدم في انبوب يحوي هيبارين او فلوريد الصوديوم
- يوضع في انبوب تثفيل 200 ميكروليتر من الدم الكلي و يضاف 5 مل ماء مقطر
- ينتظر 5 دقائق لانحلال الدم (اخراج Hb من الخلايا)
- يضاف 5 مل من محلول دارئة الفوسفات ثم يثفل و يوضع من السائل الطافي في محفدين :
  - المحفد A : 3 مل + قطرة من فري سيانيد البوتاسيوم (عامل مؤكسد)
  - المحفد B : 3 مل من السائل الطافي فقط
- يتحول كل الهيموغلوبين الموجود في المحفد A الى metHb
- يخض ثم يقرأ بطول موجة 628 نانومتر مقابل الماء المقطر(تسجل القراءات DO1 A و DO1 B)
- يضاف الى كل محفد قطرة من سيانيد البوتاسيوم , يخض و ينتظر لمدة 5 دقائق (يتحول الميتهيموغلوبين الى سيانوميتهيموغلوبين) (كل metHb يتحول الى metHb CN).
- يقرأ بطول موجة 628 نانومتر مقابل الماء المقطر (تسجل DO2 A و DO2 B)
- يتم حساب النتيجة كما يلي :

[DO1 A - DO2 A / DO1 B - DO2 B] × 100 = …..% metHb

[(A1 – A2) ÷ (B1- B2)] × 100 = النسبة المئوية للميتهيموغلوبين

- Label and place 5 mL of 0.0 17M phosphate buffer into one tube for each specimen and control to be tested and one additional tube to serve as a blank .
- Add 50 μL of whole blood to the appropriately labeled tube and mix well. Allow to sit at room temperature for 5 minutes .
- Read on the spectrophotometer at a wavelength of 630 nm, using the blank to set the optical density at 0. Record the absorbance of the solution (D_1)
- Add 20 μL of neutralized sodium cyanide reagent to each tube including the blank, and mix. Allow to sit for 2 minutes. Read as in step c above record the optical density (D_2).
- Calculation of results :

$$\textbf{Methemoglobin (g/dL)} = (D_1 - D_2) \times F$$

ملاحظة :

يعتبر معايرة metHb ضروريا في حالة استخدام دواء (Isosprbid dinitrate)

التقرير و الملاحظات

ملاحظات المشرف :

توقيع المشرف :