دراسة تأثير حفظ مصل الدم في درجات حرارة وفترات زمنية مختلفة على بعض المتغيرات الكيموحيوية

م.م. عمر قيدار حسن الحسن

جامعة الموصل / كلية التربية الأساسية / قسم العلوم العامة

(قدم للنشر في ٢٠١٨/١٠/٩ ، قبل للنشر في ٢٠١٨/١٢/٤)

ملخص البحث:

صممت الدارسة لمعرفة تأثيرات حفظ مصل الدم بطريقة التجميد والتبريد وعلى فترات زمنية مختلفة لبعض المتغيرات الكيموحيوية (مستوى الكولسترول الكلي ،تركيز الكلوكوز، البروتين الكلي وكذلك درجة حموضة مصل الدم) . جمعت ٣٥عينة دم عشوائية من اشخاص اصحاء اعمارهم (٢١-٥٥سنة) .قسمت الى مجموعتين ،الاولى ضمت ٢٠ عينة وحفظت في جهاز التجميد بدرجة – ٨٠مئوية وصنفت الى المجموعة (A) قبل التخزين والمجموعة (B)بعد التخزين .المجموعة الثانية شملت ١٥عينة وحفظت في الثلاجة بدرجة ٥ مئوية وصنفت الى المجموعة (C) حفظت لمدة ٢٤ساعة ، والمجموعة (D) حفظت لمدة ٤ ايام . اظهرت النتائج تأثير معنوي في مستوى الكولسترول الكلي وتأثير معنوي في تركيز الكلوكوز والبروتين الكلي وتأثير غير معنوية في حموضة مصل الدم في المجموعة الاولى عند المقارنة قبل التخزين وبعد التخزين عند مستوى احتمال ($P\leq0.05$) . بالإضافة الى تأثير معنوي في مستوى الكولسترول والكلوكوز وانخفاض في تركيز البروتين الكلي في المجموعة الثانية عند المقارنة بين حفظ مصل الدم لمدة ٢٤ساعة وبين الحفظ ٤ ايام .

الكلمات المفتاحية : الكولسترول الكلي ، الكلوكوز ، البروتين الكلي ، الاس الهيدروجيني .

Abstract:

The study was designed to study the effects of conserving the serum in a freezing and cooling manner at different time intervals for some biochemical variables (total cholesterol, glucose concentration, total protein, and serum pH). Thirty-five random blood samples were collected from healthy people aged(21-55) years. They were divided into two groups. The first consisted of 20 samples and was stored in the freezing apparatus at 80 ° C and classified into group A before storage and group B after storage. The refrigerator was kept at 5 ° C and was classified into the second group (C) was stored for 24 hours, and the second group (D) was kept for 4 days. The results of the study showed a significant increase in the level of total cholesterol, a significant decrease in the concentration of glucose and total protein and a slight increase in serum acidity in the first group when comparing before storage and after storage at the level of probability($P\leq0.05$). In addition to a significant increase in the level of cholesterol and glucose and decrease in the concentration of total protein in the second group when comparing the preservation of serum for 24 hours and conservation of 4 days.

المقدمة :

يعد الدم سائلا لزجا بسبب البروتينات الموجودة فيه كذلك وجود كريات الدم الحمراء .تبلغ درجة حرارة الدم حوالي ٣٨مئوية وتتراوح النسبة الطبيعية لتركيز الاس الهيدروجيني(٧.٣٥-٧.٤٥) . يتكون الدم من جزئيين ، الجزء الخلوي (كريات الدم الحمراء وخلايا الدم البيضاء ،واشباه الخلايا الصفيحات الدموية) والجزء السائل (بلازما الدم) بالإضافة الى مصل الدم الذي يشبه البلازما بدون عوامل التخثر [١] . يحمل الدم العديد من المكونات المواد والمركبات الكيميائية منها الكولسترول والكلوكوز و البروتين الكلي و الاملاح والفيتامينات، وللدم وظائف كثيرة ومهمة يقوم بها داخل جسم الانسان جعلته جزءا مهما واذا ما تغير حجمه الطبيعي داخل الجسم نتيجة للإصابة بالأمراض او التعرض لحادث مفاجئ او تغيرت نسب احد مكوناته فأن هذا يعود بالسلب على صحة الانسان [٤]، وهذا ما جعل العلماء يفكرون بطرق يمكن من خلالها الاحتفاظ بالدم خارج الجسم وتعويض المصابين بالدم عند الحاجة اليه فبدأت طريقة حفظ الدم في التبريد منذ عام ١٩٥٠ لغرض الاحتفاظ بكريات الدم الحمراء خارج الجسم ليستخدم اولا في وحدات الطبابة العسكرية اثناء الحروب آنذاك ،كذلك مكن الباحثين في مجال امراض الدم من التعرف ودراسة الدم خارج الجسم لفترات طويلة فضلا عن امكانية نقل الدم من مكان الى اخر [٢] . بعدها تطورت طرق الحفظ وتحولت من الحفظ بالتبريد الى الخزن بالتجميد وذلك بوضع الدم في درجات حرارة منخفضة تصل الى (-٨٠)ولفترات زمنية طويلة [٣]. على الرغم من ان طريقة حفظ الدم بالتبريد والتجميد ساعدت العلماء والباحثين في تطوير مجالات كثيرة في اكتشاف الامراض وطرق الوقاية منها لكن طريقة حفظ الدم او سائل البلازما او المصل لا تخلو من السلبيات [٨،١٠]. اذ ان درجات الخزن بالتبريد والتجميد تؤثر سلبا على مكونات الدم من الكريات الدم الحمراء وخلايا الدم البيضاء وخضاب الدم وعلى المدى الطويل فضلا عن تأثير حفظ الدم على نسب المواد والمركبات الكيميائية والعضوية، التي يحملها الدم المخزن [١٥، ١٧]. اذ اشارات الدراسات الى التأثير السلبي للحفظ والخزن الطويل للدم في مستويات ايون الكالسيوم التي يحملها مصل الدم المخزن [٧]. كما بينت الدراسة عن مدى حدوث خلل في نسب ايون البوتاسيوم في مصل الدم المحفوظ لفترات طويلة [١٤] . بين[١٦] ان تأثر البروتينات المناعية في مصل الدم المخزن لفترات طويلة ينذر بأمكانية اعطاء نتائج غير حقيقية عند اجراء الفحوصات المرتبطة بالأضداد المناعية مثل الفحوصات الفيروسية وكذلك فحوصات امراض اخرى مثل التيفوئيد والكشف عن داء القطط اذا ما

استخدم دم مخزن لفترات طويلة. ولكل ما هدفت الدراسة الى معرفة تأثير حفظ مصل الدم بدرجات حرارة ولفترات مختلفة على بعض المتغيرات الكيموحيوية (تركيز الكولسترول الكلي ومستوى الكلوكوز والبروتين الكلي كذلك درجة حموضة الدم) ومحاولة تنبيه العاملين في مجال المختبرات الصحية والفحوصات الطبية بالأخذ بنظر الاعتبار عند اجراء الفحوصات لمصل دم مخزن بطريقة التجميد والتبريد بانها قد تعطي نتائج مغايرة عن الطبيعية .

الصورة (١) تبين الدم وهو في كيس حفظ الدم [٣]

المواد وطرق العمل:

العينات المستخدمة :

استخدمت في هذه الدراسة ٣٥عينة دم عشوائية مأخوذة من اشخاص اصحاء وهم (صائمين) لمدة ١٢ساعة [٩].جمعت العينات في مختبرات البحوث / كلية التربية الاساسية ، ووضعت في انابيب جافة ونظيفة خالية من مانع التخثر ثم سمح للدم بالتجلط وفصل عن طريق جهاز الطرد المركزي (٤٠٠٠دورة/دقيقة) ولمدة ١٠ دقائق [٢٢] .قسمت العينات الى مجموعتين :

المجموعة الاولى شملت ٢٠ عينة ووضعت في جهاز Deep (freeze) [٢٤]عند درجة حرارة – ٨٠مئوية لمدة ٤ اشهر. صنفت الى مجموعتين

المجموعة (A) قبل التخزين واجريت عليها الاختبارات الكيمو حيوية مباشرة بعد الحصول على مصل الدم .

المجموعة الاولى (B) بعد التخزين وضعت في جهاز(Deep freeze) لمدة اربعة اشهر بعدها اجريت عليها الفحوصات الكيموحيوية للتعرف على مدى تأثير فترة التجميد كما اشار اليه[٦] .

المجموعة الثانية وتضمنت ١٥ عينة ، وضعت في الثلاجة عند درجة ٥ مئوية وصنفت الى مجموعتين

المجموعة الثانية (C) حفظت في الثلاجة بدرجة ٥مئوية لمدة ٢٤ساعة ثم اجريت الاختبارات الكيموحيوية كما في [٢] .

المجموعة الثانية (D) حفظت في الثلاجة عند درجة حرارة ٥ مئوية لمدة ٤ ايام ثم اجريت الفحوصات الكيمو حيوية اشار اليه [٣] .

الفحوصات الكيموحيوية:

١- تقدير الكولسترول الكلي في مصل الدم

قدرت كمية الكولسترول الكلي في مصل الدم بالاعتماد على الطريقة الانزيمية باستخدام عدة التحليل الجاهزة من شركة (Biolabo) الفرنسية وعن طريق جهاز المطياف الضوئي UV 1800 بطول موجي ٥٠٠nm [٢١] .

٢- قياس تركيز الكلوكوز في مصل الدم

قدرت نسبة الكلوكوز في مصل الدم بالاعتماد على الطريقة الانزيمية باستخدام عدة التحليل الجاهزة من شركة (Biolabo) الفرنسية وعن طريق جهاز المطياف الضوئي UV 1800 بطول موجي 393nm [٢١] .

٣- تقدير البروتين الكلي في عينات مصل الدم

قدرت كمية البروتين الكلي في مصل الدم بالاعتماد على الطريقة الانزيمية باستخدام عدة التحليل الجاهزة من شركة (Biolabo) الفرنسية وعن طريق جهاز المطياف الضوئي UV 1800 بطول موجي ٥٥٠nm[٢١] .

٤- تقدير الاس الهيدروجيني PH في عينات مصل الدم

قيست درجة حموضة عينات مصل الدم عن طريق جهاز PH meter من شركة (HANA) الالمانية [٢٣].

التحليل الاحصائي:

حللت النتائج احصائيا لكل المجاميع باستخدام Paired T-test واختبرت النتائج معنويا عند مستوى احتمالية ($P\leq0.05$)[١٩].

النتائج والمناقشة:

يبين **الجدول (١)** تأثير التخزين بالتجميد عند درجة -٨٠ مئوية في تراكيز كل من الكولسترول الكلي والكلوكوز والبروتين الكلي و درجة الحموضة، في المجموعة الاولى عند اجراء مقارنة بين مجموعة (A) قبل التخزين ومجموعة (B) بعد التخزين .اظهرت النتائج عند الاختبارات الكيموحيوية ان تركيز الكولسترول الكلي لمجموعة بعد التخزين كان (١٨٥.٣٥± ٥٣.٧٢) وهو تركيز مرتفع بالمقارنة مع قبل التخزين الذي بلغ (١٥٤.٩٥ ± ٢٧.٣٦) عند مستوى احتمالية ($P\leq0.05$) ويفسير ذلك علميا بانه عند اذابة عينات مصل الدم بعد تجميدها يحدث سلسلة من ردود الافعال الانزيمية وبالتالي يحدث الارتفاع في تراكيز الكولسترول الكلي وهدا يتطابق مابينه [١٠،٢٠] . اما تركيز الكلوكوز في مصل الدم عند التخزين الطويل وبدرجة -٨٠ م قفد بلغت (٨١.٠٥ ±١٦.٣٥) وهي نسبة منخفضة بالمقارنة مع مجموعة قبل التخزين والتي سجلت بتركيز (٨٨.٠٥ ± ٦.٧٢) ، وذلك بسبب حساسية الكلوكوز في الدرجات الحرارية المنخفضة يتفق مع [٥،١٢] .

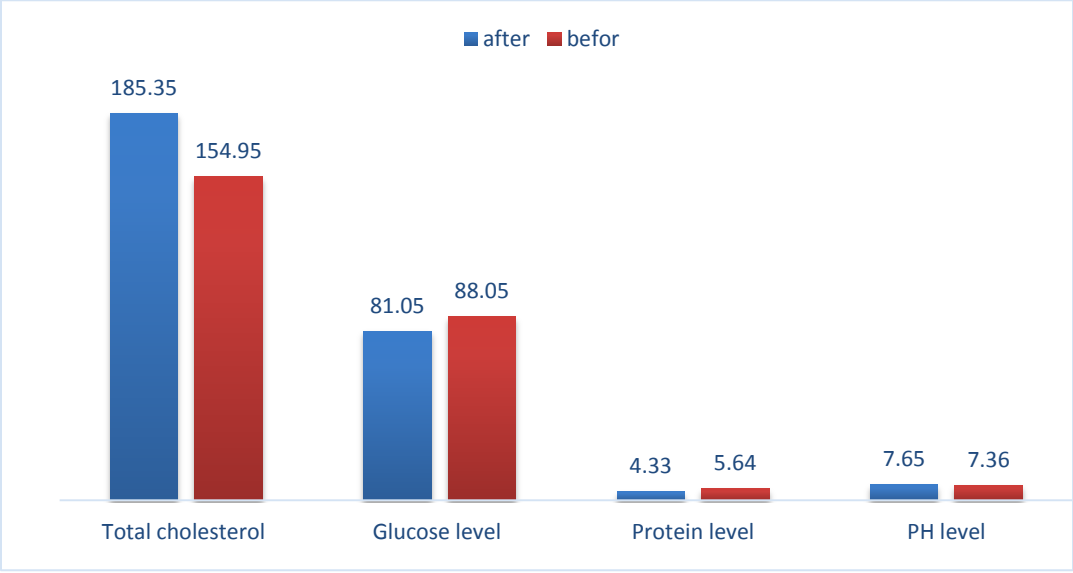
كان تركيز البروتين الكلي عند المجموع (A)(٥.٦٤ ± ١.٥٢)جاءت مرتفعة وبفرق معنوي عند احتمالية ($P\leq0.05$) مقارنة مع المجموعة (B)وكان تركيز البروتين (٤.٣٣ ± ٠.٧٣)،حيث عند خزن مصل الدم في درجات منخفضة ولفترات طويلة يؤدي الى مسخ البروتين وهذا يتفق مع اشار اليه [٢] . اظهرت درجة حموضة مصل الدم عند مجموعة بعد التخزين زيادة طفيفة غير معنوية بالمقارنة مع مجموعة قبل التخزين [١١] .

الجدول (١) تأثير تخزين الدم عند درجة حرارة –٨٠ مئوية على تراكيز الكولسترول الكلي والكلوكوز والبروتين الكلي والاس الهيدروجيني

المجاميع	الكولسترول الكلي mg/dl	تركيز الكلوكوز mg/dl	تركيز البروتين الكلي mg/dl	درجة pH
مجموعة (A) قبل التخزين	١٥٤.٩٥ ± ٢٧.٣٦	٨٨.٠٥* ± ٦.٧٢	٥.٦٤ *± ١.٥٢	٧.٣٦ ± ٠.٠٤
مجموعة (B) بعد التخزين	١٨٥.٣٥*± ٥٣.٧٢	٨١.٠٥ ±١٦.٣٥	٤.٣٣ ± ٠.٧٣	٧.٦٥ ±٠.٢٠

عدد العينات = ٢٠

*تشير وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$)



الشكل (١) يوضح الاختلاف في تراكيز ومستويات الكولسترول الكلي والكلوكوز والبروتين الكلي ودرجة الحموضة بين مجموعة الاولى (A) قبل التخزين (B) بعد التخزين في جهاز التجميد –٨٠ م لمدة ٤ اشهر

الجدول(٢) تأثير حفظ مصل الدم عند درجة حرارة ٥ مئوية على مستويات الكولسترول الكلي والكلوكوز والبروتين الكلي ودرجة الحموضة لعينات مصل الدم

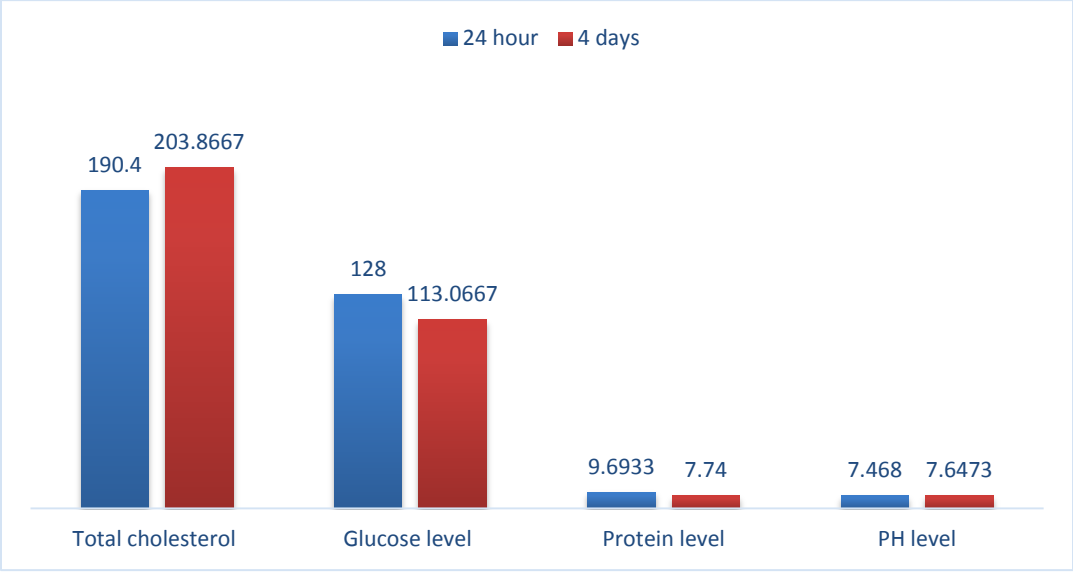
المجاميع	الكولسترول الكلي mg/dl	تركيز الكلوكوز mg/dl	تركيز البروتين الكلي mg/dl	درجة pH
مجموعة (C)خزن المصل لمدة (٢٤)ساعة	٤٠.٤٣ ±١٩٠.٤٠	٣٥.٧٤ ±*١٢٨.٠٠	٢.٥٧ ± *٩.٦٩	٠.١٣ ± ٧.٤٦
مجموعة (D)خزن المصل لمدة ٤ ايام	٥٧.٨٦ ±*٢٠٣.٨٦	٢٥.٤٥ ± ١١٣.٠٦	٢.٤١ ± ٧.٧٤	٠.٢١ ± ٧.٦٤

عدد العينات = ١٥

***تشير وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية ($P\leq0.05$)**

اوضحت المقارنة في **الجدول(٢)** بين المجموعة (C)الثانية لمصل الدم المحفوظ في الثلاجة عند درجة ٥ مئوية ولمدة ٢٤ ساعة مع المجموعة الثانية (D) التي حفظ فيها الدم في الثلاجة بدرجة ٥ مئوية ولمدة اربعة ايام ،عن وجود فروق معنوية في مستويات الكولسترول الكلي وتركيز الكلوكوز وكمية البروتين الكلي ودرجة حموضة مصل الدم .بينت النتائج ان مستوى الكولسترول الكلي (٢٠٣.٨٦*± ٥٧.٨٦)في المجموعة (D) وهو مرتفع بالمقارنة مع تركيز الكلولسترول الكلي للمجموعة (C) الذي كان (١٩٠.٤٠± ٤٠.٤٣)عند مستوى احتمالية ($P\leq0.05$) وهذا يتفق مع [٢،٩] . تركيز الكلوكوز بلغ(١١٣.٠٦± ٢٥.٤٥) في المجموعة (D)وهو منخفض بالمقارنة مع مجموعة (C) الذي بلغ (١٢٨. *± ٣٥.٧٤) وهذا يتوافق مع ماذكره [٦،٨،١٢،٩] .بسبب الانخفاض في المجموعة الثانية (D) مشابه كما في المجموعة الاولى حيث ان التخزين في درجات حرارة منخفضة ولفترة اطول يسبب حساسية الكلوكوز بفعل درجات الحرارة المنخفضة [٤] .وجد انخفاض معنوي في تركيز البروتين الكلي في المجموعة الثانية المحفوظة لمدة ٤ايام الذي

سجل بتركيز (٧.٧٤ ± ٢.٤١)في حين كان تركيز البروتين المجموعة الثانية المحفوظة لمدة ٢٤ ساعة (٩.٦٩* ± ٢.٥٧)يتفق مع [١٨]. اشار التحليل الاحصائي عند عمل المقارنة بين المجموعة الثانية (C) والمجموعة الثانية (D) الى عدم وجود فرق معنوي في درجة حموضة مصل الدم [١١].



الشكل (٢) يوضح الاختلاف في تراكيز ومستويات الكولسترول الكلي والكلوكوز والبروتين الكلي ودرجة الحموضة بين مجموعة الثانية (C) التي حفظ فيها مصل الدم لمدة ٢٤ ساعة ومجموعة (D) التي حفظ فيها الدم لمدة ٤ ايام

تبين نتائج الدراسة ان خزن وحفظ مصل الدم ولفترات طويلة يؤدي الى حدوث تغيرات في التراكيز الكيموحيوية لمصل الدم بسبب ان التبريد او التجميد السريع ثم الذوبان البطيء للعينات يعمل على تغيرات في خصائص المركبات الكيموحيوية التي تم دراستها خلال البحث والتي اكدها الباحث [10,2,3,6] .

المصادر :

١- العبد الله ، شتوي.(٢٠١٢). علم وظائف الاعضاء .عمان – دار المسيرة للنشر. ص ٢٥٦-٢٥٧.

2- Hussein K. A.(2007). Study of the Effect of Storage on the Level of Bilirubin and Some Serum

Proteins. National Journal of Chemistry, Volume 28,704-713

3- Bohoněk M.(2012). *Biochemistry and Blood Transfusion, Central Military Hospital Prague, Praha*.

4- Abdoljalal. M.(2008). Effect of Storage Time and Temperature on Serum Analyses. American Journal of Applied Sciences 5 (8): 1047-1051

5-Florian K. (1994). Effect of Sample Storage on the measurement of lipoprotein (a), apolipoproteins (b) , A-IV, total and high density .Lipoprotein cholesterol and triglyceride. Volume 35:1318-1320

6-Morris J.D, Fernandes j. (2002). Effect of Sample handling , processing , storage, and hemolysis on measurement of key energy metabolites in ovine blood. Small Ruminant Research,(43):157-166

7-Sitaramamma T, Shivaji S.(1998). Effect of storage on protein concentration of tear samples. Curr Eye Re.;17(10):1027-35.

8-Ignatius C,Emeka E. (2009). The Effect of Sample Storage on Total Cholesterol and Hdl -cholesterol Assays. Current Research Journal of Biological Sciences 1(2): 1-5

9-Zivkovic A, Wiest M.(2009). Effects of sample handling and storage on quantitative lipid analysis in human serum. Metabolomics ,5:507–516

10-Bakary S, Rosemary L.(2008). Effects of Delayed Sample Processing and Freezing on Serum Concentrations of Selected Nutritional Indicators. Clinical Chemistry 54:11

11-Toffaietti J, Blosser N.(1984). Effects of Storage Temperature and Time before Centrifugation on Ionized Calcium in Blood Collected in Plain Vacutainer Tubes and CLIN.CHEM. 30/4,553-556.(

12-Kale, Patel S.(2012). Effect of Repeated Freezing and Thawing on18 Clinical Chemistry Analytes in Rat Serum. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: Vol 51(4) Pages 475–478

13-Donald T.(2013). Preanalytical sample handling of venous blood: how to ensure your glucose measurement is accurate and

reliable .Practical Diabetes; 30(3): 128–131

14-Bala D, O zcan M.(2016). The effects of freezing on long-term storage of canine erythrocytes. Polish Journal of Veterinary Sciences :19(2),401–406

15-Stahl M, Brandslund I.(2005). Controlled storage conditions prolong stability of biochemical components in whole blood. Clin Chem;43(2):210–215

16-Fraile M , Sampedro A.(2004). Suitability of Frozen Serum Stored in Gel Separator Primary Sampling Tubes for Serological Testing. CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, p. 219–221

17-Glenn G, Thomas M.(1976). Effects of Specimen Evaporation on Quality Control. American Journal of Clinical Pathology, 66(4), Pages 645–652

18-Cuhadar S, Koseoglu M.(2013). The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of serum samples. Biochemia Medical;23(1):70-7

19-Steel, G.; Torrir, J. (1980). "Principle and Procedure of Statistics". 2nd ed. New York Mc. Graw Hill Book. Co Inc 64P

20-Kachhawa K, Kachhawa P.(2017). Study of the stability of various biochemical analytes in samples stored at different predefined storage conditions at an accredited laboratory of India. Conflict of Interest:9(1), 11-15

21-Azzawy.L.H.(2011). The Impact of Cigarette Smoking on Levels of Sex Hormones and Zinc in Blood of Smokers: IBN AL-HAITHAM J. FOR PURE & APPL. SCI. VOL.24

22-Buneri I, Yousuf M.(2017). SaudiJournalofBiologicalSciences.2-4

23-Talwar B, Talwar I.(2017). Validation of a portable, waterproof blood pH analyser for elasmobranchs. Conservation Physiology :(5) 2-7

24-Phyllis I, Robyn R.(1997). Structure and Conformational Changes in NSF and Its Membrane Receptor Complexes Visualized by Quick-Freeze/Deep-Etch Electron Microscopy: (9),523-535.