

Αργυρή Γιαθεράκη-Γιακουμάκη    Ιωάννης Ιωαννίδης    Θεμιστοκλής Κοτσιφάκης

# ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ II



Γ' ΕΠΑ.Λ.  
Ειδικότητα: Βοηθών Ιατρικών -  
Βιολογικών Εργαστηρίων



# **ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΙΙ**

## **(Θεωρία - Εργαστήριο)**

## ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΡΧΙΚΗΣ ΕΚΔΟΣΗΣ

### ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ

- **Γιαλεράκη-Γιακουμάκη Αργυρή**, Χημικός, Δρ. Βιοχημικός, Π.Γ.Ν.Α. «Λαϊκό».
- **Ιωαννίδης Ιωάννης**, Βιοπαθολόγος, Βιοχημικός, Καθηγητής ΤΕΙ Θεσσαλονίκης.
- **Κοτσιφάκης Θεμιστοκλής**, Εκπαιδευτικός Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης, ΠΕ18 Ιατρικών Εργαστηρίων.

### ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΚΡΙΣΗΣ

- **Δεσύπρης Αθανάσιος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του Βιολογικού τμήματος Πανεπιστημίου Αθηνών.
- **Θεοχάρη Ειρήνη**, Εκπαιδευτικός Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης, ΠΕ18 Ιατρικών Εργαστηρίων.
- **Χηνιάδης Δημήτριος**, Εκπαιδευτικός Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης, Χημικός.

### ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ

**Κοτσιφάκης Θεμιστοκλής**, Εκπαιδευτικός Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης, ΠΕ18 Ιατρικών Εργαστηρίων.

### ΓΛΩΣΣΙΚΗ ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ

**Μάντζου Ευγενία**, Φιλολόγος

### ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

**Τουτουδάκη Δήμητρα**

### ΣΚΙΤΣΑ

**Παπανικολάου Φίλιππος**, Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων, φοιτητής Βιολογικού Τμήματος Πανεπιστημίου Αθηνών.

### ΠΑΙΔΑΓΩΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ

#### Σταμάτης Αλαχιώτης

Καθηγητής Γενετικής Πανεπιστημίου Πατρών  
Πρόεδρος του Παιδαγωγικού Ινστιτούτου

- Επιστημονικός Υπεύθυνος του Έργου

#### Γεώργιος Βούτσινος

Σύμβουλος του Παιδαγωγικού Ινστιτούτου

- Υπεύθυνη του Τομέα Υγείας και Πρόνοιας

#### Ματίνα Στάππα Οδοντίατρος

Πάρεδρος Ε.Θ. του Παιδαγωγικού Ινστιτούτου

## ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΑΝΕΚΔΟΣΗΣ

Η επανέκδοση του παρόντος βιβλίου πραγματοποιήθηκε από το Ινστιτούτο Τεχνολογίας Υπολογιστών & Εκδόσεων «Διόφαντος» μέσω ψηφιακής μακέτας.

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗΣ ΠΟΛΙΤΙΚΗΣ

Γιαλεράκη-Γιακουμάκη Αργυρή Ιωαννίδης Ιωάννης Κοτσιφάκης Θεμιστοκλής

Η συγγραφή και η επιστημονική επιμέλεια του βιβλίου πραγματοποιήθηκε  
υπό την αιγίδα του Παιδαγωγικού Ινστιτούτου

## **ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ II (Θεωρία - Εργαστήριο)**

**Γ΄ ΕΠΑ.Λ.**

**Ειδικότητα: Βοηθών Ιατρικών και Βιολογικών Εργαστηρίων**



**ΤΟΜΕΑΣ ΥΓΕΙΑΣ - ΠΡΟΝΟΙΑΣ - ΕΥΕΞΙΑΣ**

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΕΩΝ  
«ΔΙΟΦΑΝΤΟΣ»









# Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	13
----------	----

## Κεφάλαιο 1ο:

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ	15
------------------------	----

1.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ	17
--------------------------------	----

1.1.1 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	18
------------------	----

1.1.2 ΠΑΡΑΠΕΜΠΤΙΚΑ	21
--------------------	----

1.1.3 ΑΡΧΕΙΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ	22
--------------------------	----

1.1.4 ΕΝΤΥΠΑ ΑΠΑΝΤΗΣΕΩΝ	23
-------------------------	----

1.2 ΕΙΔΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	23
--------------------	----

1.3 ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	26
--------------------	----

1.3.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΛΗΨΗΣ	26
------------------------	----

1.3.2 ΑΝΤΙΠΗΚΤΙΚΑ	29
-------------------	----

1.3.3 ΑΙΜΟΛΥΣΗ - ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΦΥΓΗ ΤΗΣ	29
--	----

1.3.4 ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	30
---------------------------	----

1.4 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	31
------------------------	----

1.4.1 ΣΗΜΑΝΣΗ	31
---------------	----

1.4.2 ΚΑΤΑΧΩΡΗΣΗ	32
------------------	----

1.5 ΠΗΓΕΣ ΛΑΘΟΥΣ ΚΑΙ ΑΠΟΦΥΓΗ ΤΟΥΣ	32
-----------------------------------	----

1.6 ΕΤΟΙΜΑ ΣΕΤ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	33
-------------------------------	----

ΚΑΝΟΝΕΣ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ	35
---	----

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	36
----------	----

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ	36
-----------	----

## Κεφάλαιο 2ο:

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	37
--------------------------------------	----

2.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ	38
-------------------------------------	----

2.1.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ	38
----------------------------	----

2.1.2 ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ - ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ - ΤΑ ΜΕΡΗ ΤΗΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΟΥ ΚΑΝΟΝΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΟΥ - ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗΣ	38
--	----

2.1.3 ΑΠΟΛΕΥΚΩΜΑΤΩΣΗ	40
----------------------	----

2.1.4 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	40
---------------------	----

2.1.5 ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ	40
---------------------------------	----

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ	41
---------------------------	----

2.2.1 ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ - ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΩΝ	41
---	----

2.2.2 ΑΛΛΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑΣ	43
-----------------------------------	----

2.2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ - ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ - ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ	44
---	----

2.2.4 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ - ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ - ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	45
---	----

2.2.5 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ - ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΙΑΣ - ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ	46
---	----

2.2.6 ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΟΙ - ΡΑΔΙΟΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ	47
--	----

2.2.7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΥΤΟΜΑΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ - ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ ΑΥΤΟΜΑΤΩΝ ΑΝΑΛΥΤΩΝ	47
--	----

2.3 ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	50
----------------------------	----

2.3.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	50
-----------------------------	----

2.3.2 ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑ ΜΕΘΟΔΩΝ	51
--------------------------	----

2.4 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	52
-----------------------	----

# Περίεχόμενα

<b>2.5</b>	<b>ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ</b> .....	<b>53</b>
<b>2.6</b>	<b>ΕΚΦΡΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ</b> .....	<b>54</b>
	<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>56</b>
	<b>ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ</b> .....	<b>57</b>

<b>Κεφάλαιο 3ο:</b>		
<b>ΒΑΣΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΣΤΟ ΑΙΜΑ</b> .....		<b>58</b>

<b>3.1</b>	<b>ΓΛΥΚΟΖΗ</b> .....	<b>59</b>
	ΓΕΝΙΚΑ - ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ - ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ - Υπογλυκαιμία-Υπεργλυκαιμία- Διαβήτης - ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΟΧΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ	
3.1.1	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ - ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΟΥ ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ - ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ .....	61
3.1.2	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΑΙΜΑΤΟΣ (Ενζυμική μέθοδος) .....	63
<b>3.2</b>	<b>ΛΕΥΚΩΜΑΤΑ</b> .....	<b>66</b>
	ΓΕΝΙΚΑ - ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΠΟΣΤΟΛΗ - ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ - ΕΙΔΗ ΛΕΥΚΩΜΑΤΩΝ .....	66
3.2.1	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΛΕΥΚΩΜΑΤΩΝ .....	69
	ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ-ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ .....	69
3.2.2	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΛΕΥΚΩΜΑΤΩΝ ΣΤΟΝ ΟΡΟ (Χρωματομετρική μέθοδος) .....	69
3.2.3	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΕΥΚΩΜΑΤΙΝΗΣ (ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ) ΣΤΟΝ ΟΡΟ (Χρωματομετρική μέθοδος) .....	71
3.2.4	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΛΕΥΚΩΜΑΤΩΝ ΟΡΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ .....	72
	Α) ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ - Β) ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ - Γ) ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ Δ) ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ - Ε) ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΕΚΛΟΥΣΗ ΣΤ) ΔΙΑΦΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΝΤΕΝΣΙΤΟΜΕΤΡΟ (ΠΥΚΝΟΜΕΤΡΙΑ) Ζ) ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)	
<b>3.3</b>	<b>ΛΙΠΙΔΙΑ-ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ</b> .....	<b>77</b>
3.3.1	ΓΕΝΙΚΑ .....	77
	ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ .....	78
3.3.2	ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ - ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ .....	78
3.3.3	ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ - ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ .....	80
3.3.4	ΑΡΤΗΡΙΟΣΚΛΗΡΩΣΗ .....	81
3.3.5	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΛΙΠΙΔΙΩΝ .....	82
3.3.6	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ (ΧΟΛΗΣΤΕΡΙΝΗΣ) ΣΤΟΝ ΟΡΟ (Ενζυμική μέθοδος) .....	82
3.3.7	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ ΣΤΟΝ ΟΡΟ (Ενζυμική μέθοδος) .....	84
3.3.8	ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ .....	87
	<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>89</b>
	<b>ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ</b> .....	<b>90</b>

<b>Κεφάλαιο 4ο:</b>		
<b>ΕΛΕΓΧΟΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ</b> .....		<b>91</b>

<b>4.1</b>	<b>ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ</b> .....	<b>92</b>
4.1.1	ΔΙΑΦΟΡΑ ΣΤΙΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ .....	93
<b>4.2</b>	<b>ΟΥΡΙΑ - ΓΕΝΙΚΑ, ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ, ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ</b> .....	<b>94</b>
4.2.1	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΥΡΙΑΣ - ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ-ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ .....	94
4.2.2	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΥΡΙΑΣ (Μέθοδος ουρεάσης) .....	95

# Περίεχόμενα

<b>4.3 ΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ - ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ</b> . . . . .	98
4.3.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΥΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ . . . . .	99
ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ-ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ	
4.3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΥΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (Ενζυμική μέθοδος) . . . . .	100
<b>4.4 ΚΡΕΑΤΙΝΙΝΗ - ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ -ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ</b> . . . . .	102
4.4.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΡΕΑΤΙΝΙΝΗΣ . . . . .	
ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ-ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ . . . . .	103
4.4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΡΕΑΤΙΝΙΝΗΣ (Χρωματομετρική μέθοδος) . . . . .	104
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> . . . . .	107
<b>ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ</b> . . . . .	108

## Κεφάλαιο 5ο: ΕΛΕΓΧΟΣ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ . . . . . 109

<b>5.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΗΠΑΤΟΣ</b> . . . . .	110
<b>5.2 ΕΙΔΗ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ</b> . . . . .	110
<b>5.3 ΧΟΛΕΡΥΘΡΙΝΗ (BILIRUBIN) ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ - Ίκτερος</b> . . . . .	112
5.3.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΟΛΕΡΥΘΡΙΝΗΣ ΑΙΜΑΤΟΣ . . . . .	
ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ-ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ . . . . .	114
5.3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΧΟΛΕΡΥΘΡΙΝΗΣ (Χρωματομετρική μέθοδος) . . . . .	116
5.3.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΕΣΗΣ ΧΟΛΕΡΥΘΡΙΝΗΣ (Χρωματομετρική μέθοδος) . . . . .	118
5.3.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΟΛΕΡΥΘΡΙΝΗΣ ΝΕΟΓΝΩΝ (Χρωματομετρική μέθοδος) . . . . .	120
<b>5.4 ΤΡΑΝΣΑΜΙΝΑΣΕΣ ΕΙΔΗ - ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ</b> . . . . .	121
5.4.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΑΝΣΑΜΙΝΑΣΩΝ . . . . .	124
5.4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ GOT ΣΤΟ ΑΙΜΑ (Κινητική μέθοδος) . . . . .	124
5.4.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ GPT ΣΤΟ ΑΙΜΑ (Κινητική μέθοδος) . . . . .	128
<b>5.5 γ-ΓΛΟΥΤΑΜΥΛΙΚΗ ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ (γ-GT) ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ</b> . . . . .	131
5.5.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ γ-GT ΣΤΟ ΑΙΜΑ (Κινητική μέθοδος) . . . . .	132
<b>5.6 5'-ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΑΣΗ (5'-NU) ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ – ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ</b> . . . . .	135
5.6.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ 5'-ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΑΣΗΣ (5'-NU) . . . . .	135
<b>5.7 ΑΜΜΩΝΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ-ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ</b> . . . . .	136
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> . . . . .	137
<b>ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ</b> . . . . .	138

## Κεφάλαιο 6ο: ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΟ ΑΙΜΑ . . . . . 139

<b>6.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΟΛΗ</b> . . . . .	140
ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ - ΣΥΣΤΑΣΗ - ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ	
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ - ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ - Η ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ	
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ - ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΤΟ ΑΙΜΑ - ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ - ΜΟΝΑΔΕΣ	
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΝΖΥΜΩΝ - ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ -	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ	
<b>6.2 ΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ ή ΔΕΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ</b> . . . . .	143
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΚΑΙ ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ	
6.2.1 ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ G- 6-PD ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ . . . . .	145
6.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ LDH ΑΙΜΑΤΟΣ (Κινητική μέθοδος) . . . . .	146

# Περιεχόμενα

6.2.3	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ LDH	149
<b>6.3</b>	<b>ΦΩΣΦΑΤΑΣΕΣ</b>	<b>150</b>
6.3.1	ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ - ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ	150
6.3.2	ΟΞΙΝΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ - ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ	151
6.3.3	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΚΑΛΙΚΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ (Κινητική μέθοδος)	151
6.3.4	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΞΙΝΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ (Κινητική μέθοδος)	154
<b>6.4</b>	<b>ΚΙΝΑΣΗ ΤΗΣ ΚΡΕΑΤΙΝΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ</b>	<b>157</b>
6.4.1	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΚ ΑΙΜΑΤΟΣ (Κινητική μέθοδος)	158
<b>6.5</b>	<b>ΑΜΥΛΑΣΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ - Η ΑΜΥΛΑΣΗ ΣΤΑ ΟΥΡΑ</b>	<b>161</b>
6.5.1	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΥΛΑΣΗΣ (Ενζυμική μέθοδος)	162
<b>6.6</b>	<b>ΨΕΥΔΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ</b>	<b>164</b>
	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΨΕΥΔΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ	
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	166
	ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ	167

## Κεφάλαιο 7ο:

	<b>ΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΕΣ ΚΑΙ ΑΕΡΙΑ ΑΙΜΑΤΟΣ</b>	<b>168</b>
7.1	ΓΕΝΙΚΑ ΜΟΝΑΔΕΣ	169
7.2	ΝΑΤΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ	169
7.3	ΚΑΛΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ-ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ	170
7.4	<b>ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΑΤΡΙΟΥ-ΚΑΛΙΟΥ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ</b>	<b>170</b>
	ΑΡΧΗ ΦΛΟΓΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	
	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΙΟΝΤΟΕΠΙΛΕΚΤΙΚΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ -ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ	
7.5	ΧΛΩΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ	172
7.5.1	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΛΩΡΙΟΥ (Χρωματομετρική μέθοδος)	172
7.6	<b>ΟΞΕΟΒΑΣΙΚΗ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ - ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ</b>	<b>174</b>
7.7	<b>ΑΕΡΙΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ</b>	<b>176</b>
7.7.1	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΑΕΡΙΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ - ΕΙΔΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ - ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	176
	ΑΝΑΛΥΤΕΣ ΑΕΡΙΩΝ	
7.8	<b>ΑΣΒΕΣΤΙΟ - ΦΩΣΦΟΡΟΣ - ΜΑΓΝΗΣΙΟ</b>	<b>178</b>
7.9	ΑΣΒΕΣΤΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ	178
7.9.1	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ (Χρωματομετρική Μέθοδος)	179
7.10	<b>ΦΩΣΦΟΡΟΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ</b>	<b>180</b>
7.10.1	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΩΣΦΟΡΟΥ (Χρωματομετρική Μέθοδος)	181
7.11	<b>ΜΑΓΝΗΣΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ - ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ</b>	<b>183</b>
7.11.1	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΑΓΝΗΣΙΟΥ (Χρωματομετρική Μέθοδος)	183
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	185
	ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ	186

## Κεφάλαιο 8ο:

	<b>ΕΙΔΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ</b>	<b>187</b>
8.1	<b>ΣΙΔΗΡΟΣ</b>	<b>188</b>
8.1.1	ΠΟΣΟ ΣΙΔΗΡΟΥ – ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ	188
8.1.2	ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ	188
8.1.3	ΤΡΟΦΕΣ ΚΑΙ ΣΙΔΗΡΟΣ	190

# Περιεχόμενα

8.1.4	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ . . . . .	190
8.1.5	ΣΙΔΗΡΟΣΥΝΔΕΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΟΡΟΥ (Τ.Ι.Β.Σ.) . . . . .	191
8.1.6	ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ . . . . .	191
8.1.7	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ (Χρωματομετρική Μέθοδος) . . . . .	192
8.1.8	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΙΔΗΡΟΣΥΝΔΕΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΟΡΟΥ (ΤΙΒΣ) . . . . .	194
8.1.9	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΕΡΡΙΤΙΝΗΣ ΟΡΟΥ . . . . .	197
<b>8.2</b>	<b>ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ</b> . . . . .	<b>197</b>
8.2.1	ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΕΣ ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ . . . . .	199
<b>8.3</b>	<b>ΟΡΜΟΝΕΣ</b> . . . . .	<b>200</b>
8.3.1	ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΟΡΜΟΝΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ . . . . .	203
8.3.2	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ . . . . .	203
	ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ RIA	
	ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ELISA - ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ ELISA - SANDWICH ELISA	
<b>8.4</b>	<b>ΕΓΚΕΦΑΛΟΝΩΤΙΑΙΟ ΥΓΡΟ (Ε.Ν.Υ.)</b> . . . . .	<b>206</b>
8.4.1	ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΟ Ε.Ν.Υ. . . . .	206
8.4.2	ΛΗΨΗ ΤΟΥ Ε.Ν.Υ. . . . .	206
8.4.3	ΦΥΣΙΚΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΕΣ . . . . .	206
8.4.4	ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ . . . . .	207
8.4.5	ΧΗΜΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ . . . . .	207
8.4.6	ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ . . . . .	208
<b>8.5</b>	<b>ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑ</b> . . . . .	<b>208</b>
8.5.1	ΕΙΔΗ ΚΑΙ ΣΚΟΠΙΜΟΤΗΤΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ - ΓΕΝΙΚΑ - ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ . . . . .	208
8.5.2	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΟΥΣΙΩΝ Α) ΑΝΘΡΑΚΥΛΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ - Β) ΒΑΡΒΙΤΟΥΡΙΚΑ Γ) ΑΛΚΟΟΛΗ (ΟΙΝΟΠΝΕΥΜΑ) - Δ) ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΑ . . . . .	210
8.5.3	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΩΝ ΣΤΑ ΑΙΜΑ (Χρωματομετρική μέθοδος) . . . . .	212
<b>8.6</b>	<b>ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ</b> . . . . .	<b>214</b>
8.6.1	ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ - ΕΙΔΗ ΔΕΙΚΤΩΝ . . . . .	214
8.6.2	ΕΙΔΗ ΚΑΙ ΣΚΟΠΙΜΟΤΗΤΑ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ . . . . .	214
	Α) AFP: ΑΛΦΑ ΦΕΤΟΠΡΩΤΕΪΝΗ	
	Β) CEA: ΚΑΡΚΙΝΟΕΜΒΡΥΪΚΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ	
	Γ) β-HCG: β-ΧΟΡΙΑΚΗ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΗ	
	Δ) PSA: ΕΙΔΙΚΟ ΠΡΟΣΤΑΤΙΚΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ	
	Ε) C.A.: ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΙΚΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ	
	ΣΤ) ΑΛΛΟΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	
8.6.3	ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ . . . . .	216
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ . . . . .	217
	ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ . . . . .	218
	ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ . . . . .	219
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ . . . . .	226
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: ΣΗΜΑΤΑ . . . . .	231





## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Με την αλματώδη ανάπτυξη της βιοϊατρικής τεχνολογίας η κλινική βιοχημεία και το εργαστήριο που βασίζεται σ' αυτή, «εγκατέλειψαν» δια παντός τις παλαιότερες μεθόδους προσδιορισμού των διαφόρων ουσιών (οργανικών και ανόργανων) οι οποίες βρίσκονται στα ανθρώπινα βιολογικά υγρά.

Η κλινική βιοχημεία, ασχολείται όχι μόνο με τον προσδιορισμό των διαφόρων αυτών ουσιών, αλλά και τη φυσιολογία και την παθολογία που παρουσιάζει η καθεμία απ' αυτές. Δηλαδή μας ενδιαφέρει να γνωρίζουμε ποια είναι η προγνωστική και διαγνωστική αξία του κάθε προσδιορισμού. Τι σημαίνει το γεγονός ότι μια ουσία π.χ. στο αίμα ανιχνεύεται αυξημένη ή ελαττωμένη. Σήμερα το μεγαλύτερο μέρος της σύγχρονης ιατρικής πράξης βασίζεται σε εργαστηριακούς προσδιορισμούς. Άρα και ο ρόλος του εργαστηρίου της κλινικής βιοχημείας είναι οπωσδήποτε πολύ σημαντικός.

Η προσπάθειά μας επικεντρώθηκε στο να γράψουμε ένα βιβλίο το οποίο θα παρουσιάζει τις σημερινές επιστημονικές και τεχνολογικές εξελίξεις στην κλινική βιοχημεία.

Οι συγγραφείς, άνθρωποι με διαφορετικές εμπειρίες, από το νοσοκομειακό χώρο, αλλά και από την τριτοβάθμια και τη δευτεροβάθμια εκπαίδευση, σε συνεργασία με την ομάδα κρίσης του βιβλίου αυτού, προσπαθήσαμε να δημιουργήσουμε ένα βιβλίο, που να είναι ορθό επιστημονικά, σύντομο και εύληπτο, κοντά στο επίπεδο γνώσεων των μαθητών και πάνω από όλα πρακτικό για το μαθητή και τον εκπαιδευτικό στη σχολική τάξη.

Αν πετύχαμε τους στόχους μας, αυτό θα κριθεί στην καθημερινότητα του σχολείου, στην αίθουσα διδασκαλίας και στο σχολικό εργαστήριο από τους μαθητές και τους διδάσκοντες.

Το βιβλίο ακολουθεί τη διάρθρωση του αναλυτικού προγράμματος που επεξεργάστηκε το Παιδαγωγικό Ινστιτούτο. Η ύλη του είναι χωρισμένη σε 8 κεφάλαια. Σε κάθε κεφάλαιο μετά το θεωρητικό μέρος για κάθε ουσία ή κατηγορία ουσιών, ακολουθεί το εργαστηριακό. Η επιλογή αυτή έγινε για λόγους πρακτικούς. Θεωρήσαμε ότι αυτό θα βοηθήσει τη διδακτική πράξη. Σε ορισμένες δε περιπτώσεις είναι λίγο ασαφής, λόγω της φύσης του περιεχομένου, ο απόλυτος διαχωρισμός θεωρητικής και εργαστηριακής ύλης. Ο εκπαιδευτικός έχει τη δυνατότητα να κρίνει πώς θα διδάξει τις ενότητες αυτές.

Στην παρουσίαση των εργαστηριακών τεχνικών έγινε προσπάθεια να καλυφθούν διάφορα είδη μεθόδων (χρωματομετρικές με απορροφητικότητα ή χωρίς, ενζυμικές, κινητικές κ.ά.), ούτως ώστε οι μαθητές να ασκηθούν στο εργαστήριο σε μια ποικιλία από τεχνικές. Ο τρόπος που παρουσιάζουμε τις τεχνικές, προσπαθήσαμε να είναι όσο το δυνατόν «εργαστηριακός» και εύκολος στην κατανόηση της μεθόδου. Σε κάθε μέθοδο γίνεται παρουσίαση όλων των απαιτούμενων οργάνων, σκευών, υλικών, αντιδραστηρίων, συνθηκών κ.λπ. για να είναι ένα εύχρηστο «εργαλείο» στα χέρια του μαθητή που θα ασκείται στο σχολικό εργαστήριο.

Η εικονογράφηση με σκίτσα δείχνει τη διάθεσή μας να προσεγγίσουμε με χιούμορ και πρωτοτυπία ένα μάθημα με πολλούς όρους και τεχνικές, ώστε να γίνει αυτό περισσότερο οικείο στο μαθητή.

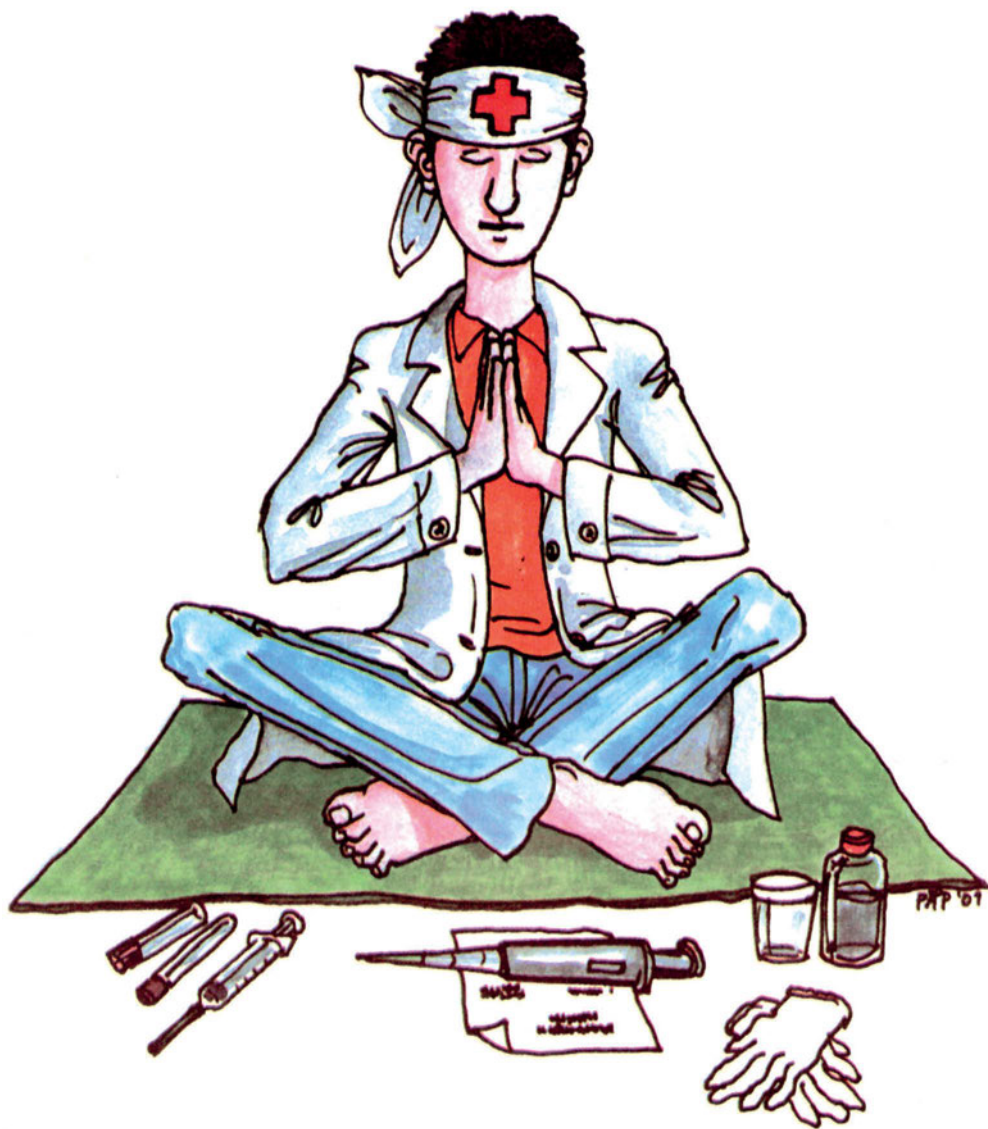
Ελπίζουμε το βιβλίο αυτό να συμβάλλει στην καλύτερη διδασκαλία και εκπαίδευση των μαθητών των ΤΕΕ.

Αθήνα, Ιούλιος 2001

Οι συγγραφείς



# Προετοιμασία Εξετάσεων **κεφ.1**



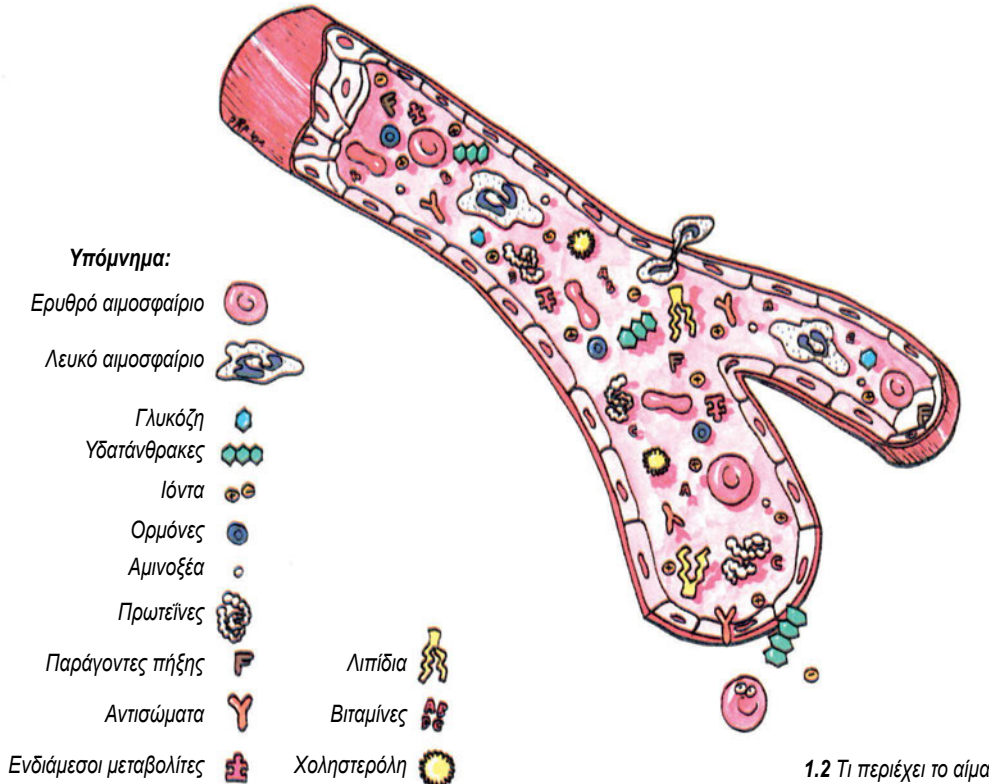


1.1 Εργαστηριακός χώρος

Σκοπός του εργαστηρίου **Κλινικής Βιοχημείας** είναι ο εργαστηριακός προσδιορισμός ουσιών που βρίσκονται στο αίμα (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, ορμόνες, ιχνοστοιχεία, αέρια) και ξένων προς τον οργανισμό ουσιών, όπως φάρμακα, που κυκλοφορούν σ' αυτό.

Επιπλέον στο αντικείμενο της Κλινικής Βιοχημείας περιλαμβάνεται ο προσδιορισμός ουσιών σε άλλα βιολογικά υγρά, όπως το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, το πλευριτικό υγρό, τα ούρα, το σπέρμα κ.α.

Η μελέτη των έμμορφων στοιχείων του αίματος, όπως τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια, αποτελεί αντικείμενο του Αιματολογικού Εργαστηρίου.



1.2 Τι περιέχει το αίμα

## 1.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

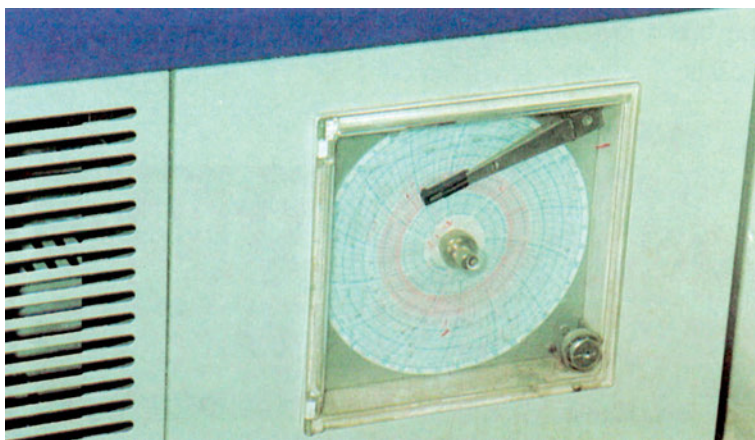
Η εύρυθμη λειτουργία του εργαστηρίου έχει ύψιστη σημασία για την πορεία της υγείας των εξεταζομένων και την ορθή λειτουργία της Νοσηλευτικής, Ερευνητικής, Πανεπιστημιακής, Διαγνωστικής Μονάδας στην οποία αυτό ανήκει. Λανθασμένες ή καθυστερημένες απαντήσεις και σφάλματα από τη μη ορθή εφαρμογή των κανόνων λειτουργίας, μπορεί να οδηγήσουν σε μοιραία αποτελέσματα.

Η ορθή λειτουργία του εργαστηρίου εξαρτάται από πολλές παραμέτρους που πρέπει να έχει πάντα υπόψη του ο εργαζόμενος. Μη τήρηση των κανόνων ασφαλείας και καλής λειτουργίας έχει σαν αποτέλεσμα:

- 1) Κακής ποιότητας αποτελέσματα που μπορεί να αποβούν ακόμα και μοιραία για τον εξεταζόμενο ή τον ασθενή που νοσηλεύεται.
- 2) Κίνδυνο για την ασφάλεια των εργαζομένων.

Στο εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας πρέπει **σε καθημερινή βάση να ελέγχονται:**

- Η καθαριότητα των πάγκων εργασίας (καθαρισμός με αντισηπτικό σαπούνι και οινόπνευμα).
- Η θερμοκρασία των ψυγείων και καταψυκτών με κατάλληλα όργανα και συναγερούς, ώστε να εξασφαλίζεται η σωστή συντήρηση των αντιδραστηρίων και δειγμάτων.
- Η θερμοκρασία των υδατόλουτρων και των επωαστικών κλιβάνων.
- Η επάρκεια των υλικών ώστε να γίνονται έγκαιρα παραγγελίες και να μην καθυστερεί η ροή αποτελεσμάτων.
- Η ποιότητα των υλικών (γυαλικά, αναλώσιμα).
- Η ποιότητα των διαλυμάτων και αντιδραστηρίων (έλεγχος θολερότητας, αλλαγή χρώματος).



1.3 Όργανο καταγραφής των μεταβολών της θερμοκρασίας σε καταψύκτη.

- Η συντήρηση των αντιδραστηρίων στη σωστή θερμοκρασία.
- Η ημερομηνία λήξης των αντιδραστηρίων.
- Η σωστή συντήρηση των μηχανημάτων.

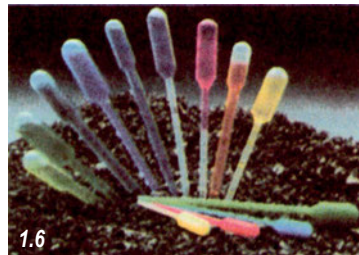
## 1.1.1 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Ο εξοπλισμός του κάθε εργαστηρίου ποικίλλει ανάλογα με το αν ανήκει σε μεγάλο Περιφερειακό Νομαρχιακό Νοσοκομείο - Διαγνωστικό Κέντρο, το οποίο δέχεται μεγάλο αριθμό δειγμάτων όλο το 24ωρο και πρέπει να δίνει έγκαιρα πολλές απαντήσεις σε διαφορετικές κλινικές ή αν ανήκει σε μικρό Κρατικό Νοσοκομείο, Κέντρο Υγείας, ή Ιδιωτικό Διαγνωστικό Εργαστήριο.

Στο βασικό εξοπλισμό που απαιτείται σε κάθε Εργαστήριο ανεξάρτητα από το μέγεθός του περιλαμβάνονται:



- ✓ Φυγόκεντρος
- ✓ Ψυγείο
- ✓ Απλό μικροσκόπιο
- ✓ pH-μετρο
- ✓ Θερμοστατούμενος Θάλαμος (υδατόλουτρο)
- ✓ Αναλώσιμα υλικά (σωληνάρια, ρύγχη πιπιετών, στατώ, γάντια μιας χρήσης)
- ✓ Πιπέττες αυτόματες, σταθερού όγκου, μεταβλητού όγκου, επαναληπτικές, πολυκάναλες
- ✓ Πιπέττες πλαστικές μιας χρήσης
- ✓ Διανεμητές όγκου
- ✓ Γυάλινα σκεύη (ογκομετρικές φιάλες, κύλινδροι, ποτήρια ζέσεως), και πλαστικός υδροβολέας



1.4 Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος, 1.5 Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες  
1.6 Πιπέττες Pasteur μιας χρήσης, 1.7 Διανεμητής σταθερού όγκου



# Προετοιμασία Εξετάσεων **κεφ.1**

- ✓ Ζυγός ακριβείας
- ✓ Δοχεία απόρριψης αιχμηρών αντικειμένων και μολυσμένων δειγμάτων
- ✓ Απιονισμένο νερό (στήλης απιονισμού) ή ειδικές φιάλες έτοιμου απεσταγμένου νερού
- ✓ Καταιονιστήρας (ντουςιέρα) και πυροσβεστήρας για άμεση παροχή βοήθειας στους εργαζόμενους σε περίπτωση ατυχήματος.



1.8 Πλαστικοί υδροβολείς, 1.9 Στήλη απιονισμένου νερού  
1.10 Συσσκευή για παροχή νερού υπό πίεση σε περίπτωση ατυχήματος

Ο εξειδικευμένος εξοπλισμός που χρησιμοποιείται στα μεγάλα Κέντρα με σκοπό:

- να εκτελείται μεγάλος αριθμός εξετάσεων (από 500 μέχρι ακόμα και 2000 εξετάσεις την ώρα) και ειδικές εξετάσεις που δεν γίνονται σε ευρεία κλίμακα,
- να γίνεται οικονομία αντιδραστηρίων και απαιτούμενου δείγματος,
- να προσφέρεται μεγάλη ασφάλεια στους εργαζόμενους, συνήθως περιλαμβάνει πέρα από τον βασικό εξοπλισμό και τα ακόλουθα:

- Συσσκευές ηλεκτροφόρησης (οριζόντιες, κατακόρυφες)
- Ημιαυτόματους / αυτόματους βιοχημικούς αναλυτές
- Ημιαυτόματους / αυτόματους αναλυτές για ανοσοενζυμικούς προσδιορισμούς
- Ημιαυτόματους / αυτόματους αναλυτές για ραδιοανοσολογικούς προσδιορισμούς
- Νεφελόμετρο
- Αναλυτή αερίων αίματος και pH
- Ηλεκτρονικό υπολογιστή για αρχειοθέτηση και αυτόματη αποστολή αποτελεσμάτων στις κλινικές
- Κλίβανους υβριδισμού
- Ανακινήτρες δύο ή τριών διαστάσεων
- Μαγνητικούς αναδευτήρες
- Χρωματογράφους (ιονανταλλαγής / υγρής χρωματογραφίας)
- Σκοτεινό θάλαμο για εμφάνιση εικόνων

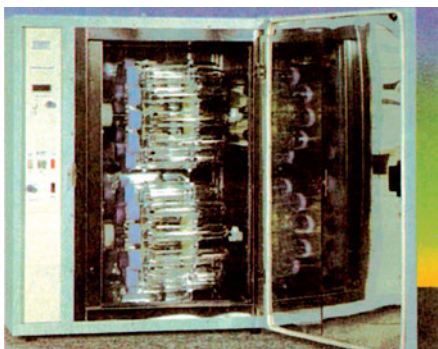


## κεφ.1

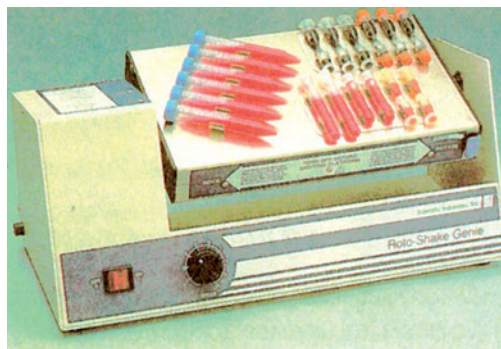
## Προετοιμασία Εξετάσεων

- Απαγωγό εστία για χρήση τοξικών και πτητικών ουσιών, όπως η φαινόλη ή ο αιθέρας
- Ειδικά προστατευτικά καλύμματα για τη ραδιενέργεια

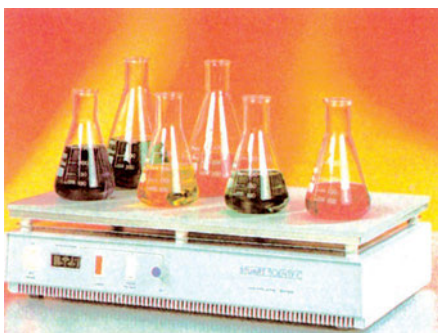
Η επιλογή του κατάλληλου οργάνου ή αναλυτή εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Έτσι λοιπόν, αν μέσα σε ένα Νοσοκομείο υπάρχει π.χ. Μονάδα Μεταμόσχευσης Νεφρού ή εξειδικευμένο Διαβητολογικό Ιατρείο, τότε ο φόρτος εργασίας του Εργαστηρίου Κλινικής Βιοχημείας αυξάνει κατακόρυφα σε ότι αφορά τις εξετάσεις των ασθενών οι οποίοι παρακολουθούνται σε αυτά τα τμήματα (ουρία, κρεατινίνη, γλυκόζη).



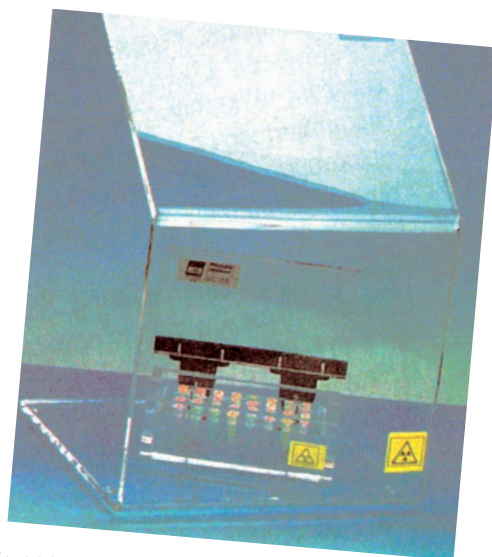
1.11 Κλίβανος υβριδισμού.



1.12 Ανακινητήρας δύο διαστάσεων



1.13 Μαγνητικός θερμαινόμενος αναδευτήρας.



1.14 Προστατευτικό κάλυμμα για χρήση ραδιενέργειας.

Για να αντιμετωπισθεί έγκαιρα και αποτελεσματικά ο φόρτος εργασίας, πρέπει να επιλεγεί ένας αναλυτής με μεγάλη ταχύτητα εξαγωγής αποτελεσμάτων και ο οποίος έχει τη δυνατότητα να δέχεται επείγοντα δείγματα ακόμα και διακόπτοντας την προγραμματισμένη ροή επεξεργασίας δειγμάτων.

Ακόμα, ένας κατάλληλος αναλυτής θα πρέπει να έχει τη δυνατότητα να κάνει αυτόματες αραιώσεις στα δείγματα, αφού πολλά από τα δείγματα που παραπέμπονται από τις κλινικές θα έχουν πολύ υψηλές παθολογικές τιμές που δεν μπορούν να προσδιοριστούν με άμεσο τρόπο.

Ένα εργαστήριο εξειδικευμένο για τον προσδιορισμό ορμονών πρέπει να έχει ειδικούς αναλυτές για ραδιοανοσολογικές τεχνικές, (Radio Immuno Assays, RIA) και ανοσοενζυμικές τεχνικές, (Enzyme Linked Immunosorbent Assays, ELISA). Καλό είναι το εργαστήριο να απαιτεί τις κατάλληλες προδιαγραφές για τους αναλυτές ώστε να έχει τη δυνατότητα να δίνει πάντα αξιόπιστα και συγκρίσιμα αποτελέσματα και να διατηρεί ομαλή ροή στην καθ' ημέρα πράξη ανεξάρτητα από το μηχάνημα που χρησιμοποιεί.

Συμπερασματικά η επιλογή του **κατάλληλου εξοπλισμού** είναι καθοριστικής σημασίας για την αποτελεσματική διεκπεραίωση των αναλύσεων. Το όργανο που θα επιλεγεί πρέπει να είναι αξιόπιστο, ανθεκτικό, σταθερό από αναλυτική σκοπιά, να καλύπτει μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων των προς προσδιορισμό ουσιών, να είναι εύκολη η προμήθεια ανταλλακτικών σε περίπτωση βλαβών, να είναι εύχρηστο, να χρειάζεται απλή συντήρηση και να έχει μέγεθος που να χωράει στους ήδη υπάρχοντες εργαστηριακούς χώρους. Επίσης, να χρησιμοποιεί λογισμικό (όταν αυτό απαιτείται), το οποίο να είναι φιλικό προς το χρήστη. Το κόστος του μηχανήματος πρέπει να έχει τη δυνατότητα να αποσβεσθεί σε μικρό χρονικό διάστημα, αφού η ζωή των μηχανημάτων αυτών είναι σχετικά μικρή λόγω της ραγδαίας εξέλιξης της βιοϊατρικής τεχνολογίας και της συνεχούς παροχής προς τους χρήστες απλούστερων και ταχύτερων αναλυτών.

## 1.1.2 ΠΑΡΑΠΕΜΠΤΙΚΑ

Η παραγγελία για οποιαδήποτε εργαστηριακή εξέταση δίνεται από το θεράποντα γιατρό. Το έντυπο, το οποίο συνοδεύει το δείγμα στο εργαστήριο ονομάζεται **παραπεμπτικό**. Σ' αυτό το έντυπο υποχρεωτικά αναγράφονται το ονοματεπώνυμο του εξεταζόμενου (πολλές φορές και το πατρώνυμο για να αποφύγουμε λάθος από συνωνυμίες), η Κλινική στην οποία νοσηλεύεται και ο αριθμός κλίνης ή τα Εξωτερικά Ιατρεία, το είδος της εξέτασης, η ημερομηνία, η ηλικία και το φύλο.

Σε ειδικές περιπτώσεις αναγράφονται ακόμα και στοιχεία σχετικά με τη λήψη φαρμάκων ή ακόμα και η κλινική διάγνωση του ασθενούς.



ΒΕΡΝΕΡΩΝΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΛΑΙΚΟ  
ΕΝΤΟΛΗ

Προς το ΒΙΟΧΗΜΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ  
Ονοματεπώνυμο ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΙΩΑΝΝΟΥ  
Κλειδί ΔΕΙΚ Οδός 10<sup>η</sup> Μήτρ. 15678  
Κλειδί Διεύθυνση Χ.Ν.ΕΦΚ.Ι.Α. - Αιχελάρκεια

Α/Α	ΕΙΔΟΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ
1	Γλυκόζη
2	ουρία
3	ουρικό οξύ
4	κρεατινίνη
5	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup>
6	ηλεκτροφόρηση λευκοκυττάρων

Αθήνα 20.07.01  
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΣΥΓΧΡΟΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

1.15 Παραπεμπτικό

Ακόμα σε άλλες περιπτώσεις, όπως ο έλεγχος του ιού HIV που προκαλεί AIDS (σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας), το παραπεμπτικό συνοδεύεται και από έντυπο στο οποίο ο ασθενής δηλώνει ότι συγκατατίθεται στη διεξαγωγή της εξέτασης.

Ο χαρακτηρισμός ΕΠΕΙΓΟΝ στο παραπεμπτικό σημαίνει ότι οι ζητούμενες εξετάσεις πρέπει να γίνουν κατά προτεραιότητα και ότι έχουν ζωτική σημασία για τον ασθενή.

Κατά την παραλαβή των δειγμάτων και των αντίστοιχων παραπεμπτικών είναι απαραίτητη η αντιπαραβολή των στοιχείων του εντύπου και του δείγματος. Σε περίπτωση διαφορετικού ονόματος το δείγμα δεν γίνεται δεκτό από το εργαστήριο και επιστρέφεται.

### 1.1.3 ΑΡΧΕΙΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Η καταγραφή των δειγμάτων στο εργαστήριο γίνεται αμέσως μετά την παραλαβή τους. Κάθε εργαστήριο οφείλει να **τηρεί βιβλία** όπου να αναγράφονται τα δείγματα που παραλαμβάνονται κάθε μέρα, η προέλευσή τους και οι ζητούμενες εξετάσεις. Μετά το πέρας του εργαστηριακού ελέγχου, στα βιβλία αυτά αντιγράφονται τα αποτελέσματα. Τα βιβλία φυλάσσονται με τρόπο ώστε οι εφημερεύοντες ιατροί να έχουν πρόσβαση όλο το 24ωρο, ακόμα και όταν κάποια εργαστήρια δεν λειτουργούν.

Τα τελευταία χρόνια η χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών (Η/Υ) έχει διευκολύνει σημαντικά την επικοινωνία μεταξύ των διαφόρων τμημάτων των νοσοκομείων, ειδικά μεταξύ των κλινικών και των εργαστηρίων. Έτσι υπάρχει η δυνατότητα το παραπεμπτικό να συμπληρωθεί στον Η/Υ και να ενημερωθεί αυτόματα το εργαστήριο το οποίο και θα αρχειοθετήσει την εντολή.

Τα αρχεία των εργαστηρίων πρέπει να φυλάσσονται τουλάχιστο για μία 5ετία πριν καταστραφούν. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η δυνατότητα να επιβεβαιωθούν αποτελέσματα ή να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα για την πορεία της νόσου των ασθενών και να γίνουν αναδρομικές στατιστικές μελέτες.



1.16 Η/Υ για αρχείο εργαστηρίου

# Προετοιμασία Εξετάσεων **κεφ.1**

## 1.1.4 ΕΝΤΥΠΑ ΑΠΑΝΤΗΣΕΩΝ

Τα αποτελέσματα των εξετάσεων καταγράφονται όχι μόνο στο αρχείο του εργαστηρίου αλλά και σε ειδικά έντυπα τα οποία περιλαμβάνουν τα στοιχεία του εξεταζόμενου (ονοματεπώνυμο, κλινική που παρακολουθείται, ημερομηνία αποστολής δείγματος) και τα αποτελέσματα των εξετάσεων οι οποίες έχουν ζητηθεί. Τα αποτελέσματα μετά την καταγραφή τους στο έντυπο, επαληθεύονται από έναν άλλο (δεύτερο) εργαζόμενο για να αποφεύγονται λάθη αντιγραφής που μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένη διάγνωση ή θεραπεία ή ακόμα και να έχουν επίπτωση στην ίδια τη ζωή του ασθενούς.

Όταν στο έντυπο αυτό περιλαμβάνονται πολλές απαντήσεις συνήθως τα παθολογικά αποτελέσματα σημειώνονται με έντονα γράμματα (bold), ώστε ο κλινικός γιατρός να εστιάζει την προσοχή του πρώτα σε αυτά.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ <b>ΛΑΤΚΟ</b> ΒΙΟΧΗΜΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ		
		Αθήνα .....
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ		
ΕΠΙΘΕΤΟ .....	ΚΛΙΝΙΚΗ .....	
ΟΝΟΜΑ .....	ΔΙΑΓΝΩΣΗ .....	
ΦΥΛΟ .....	ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ .....	
ΗΛΙΚΙΑ .....		
ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΟΡΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ Φ.Τ.		
1. Σάκχαρο	70 - 115 mgr%	
2. Ουρία	17 - 55 mgr%	
3. Κρεατινίνη	0,90 - 1,60 mgr%	
4. Λευκώματα Ολικά	6,4 - 8,4 gr%	
5. Αμύλη ορού	έως 220 U/L	
6. SGOT	5 - 40 U/L	
7. SGPT	5 - 40 U/L	
8. C.P.K	20 - 180 U/L	
9. L.D.H	200 - 480 U/L	
10. Χολερυθρίνη ολική	0,30 - 1,20 mgr%	
11. Χολερυθρίνη άμεση	< 0,25	
12. Χολερυθρίνη έμμεση	< 0,75	
13. Αλκαλική Φωσφατάση	64 - 306 U/L	
14. Όξινη Φωσφατάση	0 - 10 U/L	
15. Προστατική Φωσφατάση	0 - 4 U/L	
16. γ - GT	A 11 - 49 U/L Γ 7 - 32 U/L	
17. Φωσφόρος Ορού (P)	2,4 - 4,4 mgr%	
18. Ουρικό Οξύ	2 - 7 mgr%	
19. Τριγλυκερίδια	50 - 150 mgr%	
20. Χοληστερίνη	140 - 200 mgr%	
21. HDL Χοληστερίνη	A > 35 Γ > 45	
22. C.P.K. MB	10 - 12% της CPK ολικού	
23. Αμμωνία (Ολικού Αίματος)	< 75 µgr / ml / dIN - NH <sub>3</sub>	
24. Τροπονίνη		
25. Αλβουμίνη	3,5 - 5,5 mgr%	
26. Νάτριο Ορού (Na)	135 - 147 M Mol / lit	
27. Κάλιο Ορού (K)	3,5 - 5,1 M Mol / lit	
28. Ασβέστιο Ορού (Ca)	4,2 - 5,5 M EO / lit	
29. Χλωριούχα Ορού (CL)	105 - 115 M Mol / lit	
30. Μαγνήσιο Ορού (Mg)	1,8 - 2,9 mgr%	
31. Αγγιστενίνη / S	8 - 52 IU / L	
32. Ηλ. Λευκωμάτων		

Ο ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ

1.17 Ειδικό έντυπο απαντήσεων

## 1.2 ΕΙΔΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

### Α) ΑΙΜΑ:

Ο εργαστηριακός έλεγχος του αίματος περιλαμβάνει πληθώρα εξετάσεων. Για τη διεξαγωγή των διαφόρων αναλύσεων μεγάλη σημασία έχουν ο τρόπος λήψης του αίματος, η χρησιμοποίηση ή όχι αντιπηκτικών ουσιών, η κατεργασία και τέλος η φύλαξη - συντήρηση του δείγματος.

**Φλεβικό αίμα:** Λαμβάνεται μετά από φλεβοκέντηση της εσωτερικής συνήθως επιφάνειας του αγκώνα (μεσοβασιλική φλέβα). Αν η φλέβα του ασθενούς χρησιμοποιείται ήδη



για έγχυση ορών - φαρμάκων, τότε η λήψη γίνεται από το άλλο χέρι. Η περιδέση και ο καθαρισμός της περιοχής περιγράφονται στο κεφάλαιο 1.3. Το φλεβικό αίμα χρησιμοποιείται για την πλειονότητα των βιοχημικών και ανοσολογικών εξετάσεων που εφαρμόζονται στα εργαστήρια σήμερα.

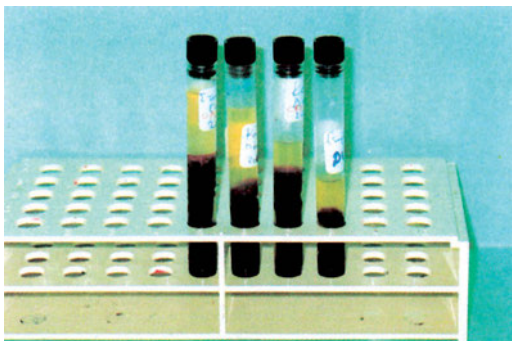
**Αρτηριακό αίμα:** Λαμβάνεται από εν τω βάθει αρτηρία, ξεχωρίζει από το φλεβικό λόγω του εντονότερου χρώματός του και χρησιμοποιείται άμεσα για προσδιορισμό αερίων αίματος.



1.18 Σωληνάρια με δείγματα αίματος σε στατώ

**Τριχοειδικό αίμα:** Λαμβάνεται με σκαριφιστήρα από το δάκτυλο ή την φτέρνα των νεογνών όταν η φλεβοκέντηση είναι αδύνατη, η απαιτούμενη ποσότητα αίματος είναι ελάχιστη (π.χ. στους προσδιορισμούς του pH αίματος, αιμοσφαιρίνης) ή όταν απαιτούνται επανειλημμένα δείγματα από το ίδιο άτομο σε μικρά χρονικά διαστήματα.

**Ορός αίματος:** Είναι το υποκίτρινο υγρό το οποίο δημιουργείται μετά την καταβύθιση - καθίζηση των έμμορφων συστατικών του πλήρους αίματος (ερυθρά - λευκά - αιμοπετάλια), το οποίο λαμβάνεται σε σωληνάριο χωρίς αντιπηκτικό. Η καθίζηση αυτή μπορεί να επιτευχθεί είτε μετά από παραμονή, περίπου 30', του αίματος σε θερμοκρασία δωματίου είτε μετά παραμονή του περίπου 15' σε υδατόλουτρο (37 °C), να πήξει πρώτα το αίμα και στη συνέχεια με φυγοκέντρηση να αποχωριστεί το υπερκείμενο υγρό (ορός). Στον ορό περιέχονται



1.19 Δείγματα αίματος στα οποία ο ορός έχει ήδη αποχωριστεί από τα ερυθρά αιμοσφαίρια

νερό και όλα τα μη κυτταρικά συστατικά, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες, ηλεκτρολύτες, ιχνοστοιχεία και φάρμακα που παίρνει ο εξεταζόμενος.

Ο ορός αποχωρίζεται από τα έμμορφα συστατικά με πιπέττα μιας χρήσης με προσοχή ώστε να μην αναμειχθεί με ερυθρά, τα οποία πιθανόν να προκαλέσουν μεταβολές στα αποτελέσματα του εργαστηριακού ελέγχου.

# Προετοιμασία Εξετάσεων **κεφ.1**

**Πλάσμα αίματος:** Λαμβάνεται μετά από φυγοκέντρηση πλήρους αίματος το οποίο έχει ληφθεί σε φιαλίδιο με αντιπηκτικό. Η παρουσία του αντιπηκτικού εμποδίζει την πήξη του αίματος και τη μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες που οδηγεί στη δημιουργία θρόμβου. Με αυτό τον τρόπο, μετά από φυγοκέντρηση σε κατάλληλες συνθήκες, μπορεί σε δείγμα πλάσματος να γίνει προσδιορισμός ινωδογόνου, παραγόντων πήξης, ορισμένων ενζύμων της πήξης και να διαγνωσθεί θρομβωτική ή αιμορραγική προδιάθεση και ηπατική δυσλειτουργία.

	ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ - ΟΡΟΣ	
	ΟΡΟΣ	ΠΛΑΣΜΑ
ΣΤΗ ΛΗΨΗ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	ΧΩΡΙΣ ΑΝΤΙΠΗΚΤΙΚΟ	ΜΕ ΑΝΤΙΠΗΚΤΙΚΟ
ΣΤΗ ΣΥΣΤΑΣΗ	ΔΕΝ ΥΠΑΡΧΟΥΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΗΞΗΣ	ΥΠΑΡΧΟΥΝ ΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΗΞΗΣ

**Εμβρυϊκό αίμα:** Λαμβάνεται κατά την 20η εβδομάδα της κύησης από τον ομφάλιο λώρο. Η αιμοληψία γίνεται από εξειδικευμένο γυναικολόγο και με υπερηχογραφική καθοδήγηση, ώστε να προσδιοριστεί ακριβώς η θέση του λώρου και να μην τραυματισθεί το έμβρυο. Το εμβρυϊκό αίμα μετά την αρχική επεξεργασία χρησιμοποιείται για τον προγεννητικό έλεγχο διαφόρων νοσημάτων (π.χ. μεσογειακή αναιμία, αιμορροφιλία).

## **Β) ΟΥΡΑ:**

Το κατάλληλο δείγμα ούρων για εργαστηριακό έλεγχο λαμβάνεται με συλλογή της πρώτης πρωινής μέσης ούρησης σε ειδικό φιαλίδιο (πλαστικό ποτήρι με καπάκι μιας χρήσης). Η πρώτη ούρηση είναι η πιο ενδεδειγμένη, γιατί σ' αυτή περιέχονται στη σωστή συγκέντρωση οι προς προσδιορισμό ουσίες. Το δείγμα πρέπει να ελεγχθεί σε μικρό χρονικό διάστημα από τη λήψη του γιατί σε αντίθετη περίπτωση αναπτύσσονται μικροοργανισμοί, οι οποίοι τροποποιούν τα χαρακτηριστικά των ούρων (π.χ. το pH).

Σε περίπτωση που το δείγμα δεν μπορεί να ελεγχθεί άμεσα, πρέπει να συντηρηθεί σε κατάλληλη θερμοκρασία (4 °C) ή να προστεθούν συντηρητικά που αποτρέπουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών (τολουόλιο, αζίδιο του νατρίου, κρύσταλλοι θυμόλης). Οι κυριότερες εξετάσεις που γίνονται στα ούρα αναφέρονται στα κάτωθι:

- ✓ Γενικοί χαρακτήρες (όψη, χροιά, οσμή, ειδικό βάρος, pH)
- ✓ Συστατικά (λεύκωμα, χολικά άλατα, σάκχαρο κ.λπ)
- ✓ Μικροσκοπική εξέταση (ερυθρά αιμοσφαίρια, επιθηλιακά κύτταρα, πυοσφαίρια, κρύσταλλοι ουρικού οξέος, οξαλικού ασβεστίου κ.λπ.)

Στο δείγμα ούρων μετά τον αρχικό ποιοτικό προσδιορισμό της παρουσίας ουσιών, μπορούν να γίνουν και ποσοτικοί προσδιορισμοί ουσιών, όπως το σάκχαρο, το ουροχολινογόνο ή το λεύκωμα. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών όπως ορμόνες, ιχνοστοιχεία, ή κετονοσώματα απαιτείται η συλλογή ούρων 24ώρου σε ειδικά ευρύστομα δοχεία που διατίθενται στα φαρμακεία. Ο προσδιορισμός των ουσιών και η έκφραση του αποτελέσματος

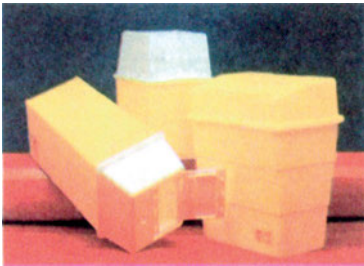
αναφέρονται ως ποσό αποβαλλόμενο ανά 24ωρο.

Γ) Άλλα είδη βιολογικών υγρών στα οποία μπορούν να γίνουν εργαστηριακές εξετάσεις είναι τα πτύελα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, το αμνιακό υγρό, ο ιδρώτας, τα δάκρυα, το σπέρμα, το πλευριτικό υγρό και το αρθρικό υγρό.

## 1.3 ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

### 1.3.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΛΗΨΗΣ ΑΙΜΑΤΟΣ

Ο υπεύθυνος για τη λήψη των δειγμάτων είναι ο πρώτος κρίκος στην αλυσίδα που πρέπει να μείνει ανέπαφη ώστε να διασφαλιστούν η αξιοπιστία, η ποιότητα και η ταχύτητα εξαγωγής του αποτελέσματος.



1.20 Δοχεία απόρριψης αιχμηρών και μολυσμένων αντικειμένων

Ο αιμολήπτης πρέπει να φροντίζει αρχικά για την **επάρκεια** των αναλώσιμων υλικών που θα έχει μαζί του κατά τη διάρκεια της αιμοληψίας (βαμβάκι, οινόπνευμα, περιχειρίδα, σύριγγες ή και πεταλούδες μιας χρήσης, σωληνάρια με ή χωρίς αντιπηκτικό, ετικέτες, κάδο απορριμμάτων, υλικό για την προστασία της περιοχής αιμοληψίας μετά το πέρας της διαδικασίας).

Ακόμα ο αιμολήπτης πρέπει να φροντίζει όχι μόνο τη δική του **ασφάλεια** αλλά και του εξεταζόμενου. Οφείλει να χρησιμοποιεί **γάντια** μιας χρήσης τα οποία να απορρίπτει μετά από κάθε αιμοληψία σε ειδικό κάδο που έχει μαζί του. Επίσης, οφείλει να απορρίπτει τα αιχμηρά αντικείμενα (βελόνες, πεταλούδες) στον ειδικό κάδο, ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος τρυπήματος και μόλυνσης του προσωπικού καθαριότητας.

Τέλος, πρέπει πάντοτε να φορά **ειδική μπλούζα εργασίας**, ώστε να αποφεύγεται ο κίνδυνος μόλυνσης των δικών του ρούχων. Σε ειδικές περιπτώσεις, όπως η λήψη αίματος από ανοσοκατασταλαμένους (μεταμοσχευμένους, ασθενείς με AIDS), ο αιμολήπτης πρέπει να φορά μάσκα, ειδική στολή και ποδονάρια, τα οποία απορρίπτει μόλις βγει από το δωμάτιο.

Με αυτόν τον τρόπο, προφυλάσσεται τόσο ο ασθενής από το νοσοκομειακό περιβάλλον όπου υπάρχουν πολλοί μικροοργανισμοί, όσο και ο αιμολήπτης από ένα πιθανό ατύχημα. Ο αιμολή-



1.21 Προστατευτικές μάσκες για ειδικές χρήσεις



1.22 Ποδονάρια μιας χρήσης

πτης οφείλει ακόμα μετά το πέρας κάθε αιμοληψίας και μετά την απόρριψη των γαντιών, να πλένει τα χέρια του με υγρό σαπούνι και αντισηπτικό.

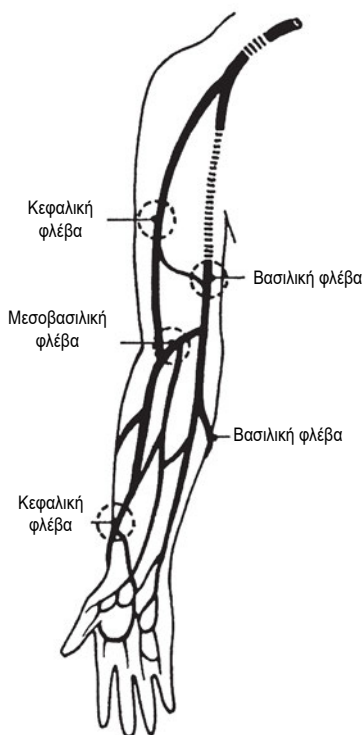
Η σωστή σήμανση των δειγμάτων αποτελεί θεμέλιο λίθο στην ορθή διεξαγωγή του εργαστηριακού ελέγχου. Είναι λάθος να γράφονται συνολικά οι ετικέτες με τα ονόματα των εξεταζομένων και να επικολλώνται στα σωληνάρια πριν από την αιμοληψία.

**Ο αιμολήπτης οφείλει να ολοκληρώνει την αιμοληψία ανά ασθενή.** Αυτό σημαίνει ότι:

- 1) Τοποθετούνται σε κατάλληλο στατώ τα σωληνάρια ανά ασθενή.
- 2) Τα σωληνάρια σημαίνονται με ετικέτες που αναγράφουν το ονοματεπώνυμο, την ημερομηνία, την κλινική και τον απαιτούμενο έλεγχο.
- 3) Καθαρίζεται η περιοχή της αιμοληψίας με βαμβάκι εμποτισμένο με οινόπνευμα και τοποθετείται περιχειρίδα για να διευκολυνθεί η ροή του αίματος. Λαμβάνεται ποσότητα μεγαλύτερη (διπλάσια) από την απαιτούμενη για τον έλεγχο, ώστε να υπάρχει επάρκεια δείγματος σε περίπτωση κατά την οποία οι εξετάσεις πρέπει να επαναληφθούν. Χαλαρώνει η περιχειρίδα και αφού απομακρυνθεί η βελόνα από τη φλέβα, τοποθετείται στεγνό βαμβάκι και ασκείται πίεση, ώστε να σταματήσει η αιμορραγία. Στη συνέχεια, τοποθετείται στην περιοχή ειδικό προστατευτικό μιας χρήσης (π.χ. Hansaplast) ή γάζα.

- 4) Τα σωληνάρια γεμίζουν με αίμα. Τα σωληνάρια χωρίς αντιπηκτικό πωματίζονται και επανατοποθετούνται στο στατώ. Τα σωληνάρια με αντιπηκτικό, πωματίζονται, ανακινούνται ήπια, ώστε να αναμιχθεί το αντιπηκτικό με το αίμα και επανατοποθετούνται στο στατώ. Πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην ποσότητα αίματος που προστίθεται στα σωληνάρια με αντιπηκτικό. Αυτή πρέπει να είναι συγκεκριμένη και συνήθως είτε αναφέρεται στο σωληνάριο η συνολική ποσότητα που απαιτείται, είτε υπάρχει χαραγή η οποία δείχνει μέχρι ποιο σημείο πρέπει να γεμίσει το σωληνάριο.

Ο αιμολήπτης πρέπει τέλος να προσέξει να μη



1.23 Επιτολής φλέβες άνω άκρου, οι οποίες χρησιμοποιούνται συνήθως για αιμοληψία.





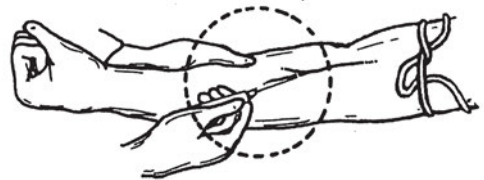
1.24 Τρόπος εφαρμογής ελαστικού σωλήνα.

λερωθεί ο χώρος με αίματα και σε περίπτωση ατυχήματος να ειδοποιήσει το προσωπικό καθαριότητας, αφού ο ίδιος πρώτα τακτοποιήσει πρόχειρα το χώρο.

Στην περίπτωση που ο ασθενής μεταγγίζεται με αίμα ή παράγωγα αίματος ή του χορηγείται ορός, με ή χωρίς φάρμακα, ο αιμολήπτης πρέπει να χρησιμοποιεί άλλη φλέβα από αυτήν που είναι ήδη τρυπημένη. Επιπλέον, εάν ο ασθενής φέρει μόνιμο φλεβοκαθετήρα, πρέπει να απορριφθούν τα πρώτα 5-10 mL αίματος και να χρησιμοποιηθεί ως δείγμα το αίμα που θα συλλεγεί στη συνέχεια.

### Εναλλακτικός τρόπος λήψης αίματος με ειδικά σωληνάρια

Τα τελευταία χρόνια για τη λήψη αίματος χρησιμοποιούνται ειδικά σωληνάρια με **κενό αέρος**, με ή χωρίς αντιπηκτικό, που είναι κλεισμένα με ειδικό πλαστικό πώμα. Τα σωληνάρια αυτά ονομάζονται **Vacutainer tubes** (Vacuum = κενό).



1.25 Τεχνική τοποθέτησης της βελόνας στη φλεβοκέντηση



1.26 Αιμοληψία με τα ειδικά σωληνάρια (Vacutainer tubes)

Χρησιμοποιούμε ειδική υποδοχή για το σωληνάριο, στην οποία προσαρμόζεται η βελόνη. Από τη μια μεριά η βελόνη εισέρχεται στην κατάλληλη φλέβα και από την άλλη τρυπά το πλαστικό πώμα του σωληναρίου. Επειδή ακριβώς υπάρχει κενό αέρος μέσα στο σωληνάριο, η αναρρόφηση του αίματος σ' αυτό γίνεται αυτόματα. Μόλις γεμίσει το σωληνάριο μπορούμε, αν είναι απαραίτητο, να γεμίσουμε και άλλα.

Με αυτή τη μέθοδο:

- α) αποφεύγουμε την άμεση επαφή με το προς εξέταση δείγμα αίματος,
- β) αποφεύγεται η αιμόλυση, γιατί δεν ταλαιπωρείται το δείγμα,
- γ) αποφεύγουμε περισσότερα του ενός τρυπήματα της φλέβας, όταν απαιτείται μεγάλη

ποσότητα αίματος και

**δ)** αναρροφάται στο σωληνάριο η ακριβής ποσότητα αίματος η οποία ν' αντιστοιχεί στην ποσότητα του αντιπηκτικού, όταν αυτό είναι αναγκαίο να υπάρχει.

## 1.3.2 ΑΝΤΙΠΗΚΤΙΚΑ

Τα αντιπηκτικά είναι **χημικές ουσίες** που χρησιμοποιούνται για να εμποδίσουν τις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα αμέσως μετά το πέρασ της αιμοληψίας και οι οποίες προκαλούν πήξη του αίματος. Με αυτό τον τρόπο υπάρχει η δυνατότητα να προσδιοριστούν εργαστηριακά ουσίες που μεταβολίζονται (ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται) πολύ γρήγορα και τις οποίες δεν μπορούμε να μετρήσουμε στον ορό. Επίσης με τη χρήση αντιπηκτικών αναστέλλεται η πήξη του αίματος και έτσι υπάρχει η δυνατότητα εργαστηριακού προσδιορισμού των έμμορφων συστατικών (ερυθρά, λευκά, αιμοπετάλια).

Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα αντιπηκτικά είναι τα ακόλουθα:

**Ηπαρίνη και άλατά της:** Αναστέλλουν την πήξη του αίματος και δεν επηρεάζουν τον προσδιορισμό των περισσότερων συστατικών του αίματος (εκτός του λιθίου και της αμμωνίας). Χρησιμοποιούνται σε συγκέντρωση 0,5 mg/mL αίματος.

**Οξαλικά άλατα:** Χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό παραγόντων πήξεως και ορισμένων μεταβολιτών. Δεσμεύουν ιόντα ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ) και συνεπώς είναι ακατάλληλα για τον προσδιορισμό ασβεστίου. Επίσης, είναι ακατάλληλα για προσδιορισμό άλλων ηλεκτρολυτών και του pH. Χρησιμοποιούνται σε συγκέντρωση 3 mg/mL αίματος.

**Κιτρικά άλατα:** Χρησιμοποιούνται ευρύτατα για τον προσδιορισμό ουσιών στο πλάσμα. Αντενδείκνυνται στις ίδιες περιπτώσεις με αυτές των οξαλικών αλάτων αλλά και στον προσδιορισμό ενζύμων. Εξάιρεση αποτελεί η όξινη φωσφατάση. Η ενδεδειγμένη συγκέντρωση είναι 2-3 mg/mL αίματος.

**Φθοριούχο νάτριο:** Δεν θεωρείται καλό αντιπηκτικό και το μοναδικό του πλεονέκτημα είναι ότι σταματά τη γλυκόλυση παρεμποδίζοντας το σχηματισμό γαλακτικού οξέος. Χρησιμοποιείται μόνο για τον προσδιορισμό μεταβολιτών της γλυκόζης. Η ενδεδειγμένη συγκέντρωση είναι 0,5-1 mg/mL αίματος.

**Άλατα του αιθυλένο-διαμινο-τετραοξικού οξέος (EDTA):** Είναι συνθετικά μόρια ηπαρίνης και δεξτράνια που χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια σαν εναλλακτικά αντιπηκτικά για ειδικούς προσδιορισμούς.

## 1.3.3 ΑΙΜΟΛΥΣΗ - ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΦΥΓΗ ΤΗΣ

**Αιμολυμένο** είναι ένα δείγμα αίματος όταν μετά τη λύση (καταστροφή της μεμβράνης) των ερυθρών αιμοσφαιρίων, αιμοσφαιρίνη και άλλα στοιχεία των ερυθρών αναμιχθούν με το πλάσμα ή τον ορό.

Η αιμόλυση συμβαίνει σε ορισμένες αιματολογικές διαταραχές (αιμολυτική αναιμία) και η διάγνωσή της έχει μεγάλη αξία για την εξέλιξη της πορείας του ασθενούς.

Αιμόλυση όμως μπορεί να συμβεί και λόγω κακής λήψης, επεξεργασίας και συντήρησης των δειγμάτων αίματος στο εργαστήριο. Η αιμόλυση αυτή, αν και δεν έχει καμία επίπτωση στον ασθενή, μπορεί να προκαλέσει σημαντικές μεταβολές στα αποτελέσματα του εργαστηριακού ελέγχου. Σε περιπτώσεις, όπως ο προσδιορισμός ιόντων καλίου ( $K^+$ ), το κάλιο που περιέχεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια με την αιμόλυση, το σπάσιμο δηλαδή των ερυθρών αιμοσφαιρίων, απελευθερώνεται στον ορό και αλλοιώνει το αποτέλεσμα.

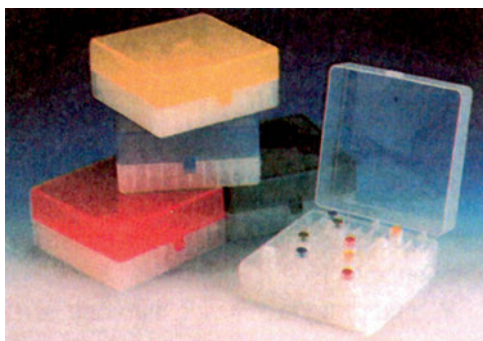
Η διαπίστωση της αιμόλυσης γίνεται μακροσκοπικά, όταν παρατηρήσουμε ότι μετά την καταβύθιση των έμμορφων συστατικών, το υπερκείμενο διάλυμα (ορός ή πλάσμα) είναι αιματηρό, δηλαδή το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα του έχει γίνει κοκκινωπό. Η αιμόλυση αποφεύγεται με την ακόλουθη διαδικασία:

- 1) Αμέσως μετά την αιμοληψία, **μεταφέρουμε** το αίμα από τη σύριγγα στο κατάλληλο σωληνάριο (με ή χωρίς αντιπηκτικό) βγάζοντας τη βελόνα. Πιέζουμε το έμβολο της σύριγγας σιγά-σιγά στα τοιχώματα του σωληναρίου. Όπως ήδη αναφέραμε, αν χρησιμοποιούμε τα ειδικά σωληνάρια με κενό αέρος, δεν απαιτείται αυτή η ενέργεια.
- 2) Αν υπάρχει αντιπηκτικό, **αναδεύουμε** το σωληνάριο με ήπιες κυκλικές κινήσεις, αφού προηγουμένως το πωματίσουμε.
- 3) Αν το δείγμα δεν έχει αντιπηκτικό, **παραμένει** περίπου 30' σε στατά σε θερμοκρασία δωματίου ή 15' σε υδατόλουτρο (37 °C), ώστε να πήξει πρώτα το αίμα και έπειτα, με στυλέο μιας χρήσης αποκολλάται ο θρόμβος που έχει αρχίσει να σχηματίζεται.
- 4) Το δείγμα αμέσως μετά **φυγοκεντρείται** σε κατάλληλη θερμοκρασία, ταχύτητα και χρόνο ανάλογα με την εργαστηριακή εξέταση που θα ακολουθηθεί.
- 5) Το υπερκείμενο υγρό (ορός ή πλάσμα) **απομακρύνεται άμεσα** με πιπέτα μιας χρήσης και τοποθετείται σε καθαρό κατάλληλο σημασμένο σωληνάριο. Ο εργαζόμενος προσέχει ώστε κατά τον αποχωρισμό του ορού ή του πλάσματος να μην αναρροφήσει καθόλου ερυθρά αιμοσφαίρια. Το δείγμα αυτό φυλάσσεται για τον εργαστηριακό έλεγχο.

### 1.3.4 ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Ο εργαστηριακός έλεγχος πρέπει να γίνεται όσο το δυνατόν ταχύτερα. Αυτό όμως δεν είναι πάντοτε εφικτό, άλλοτε για λόγους έλλειψης προσωπικού και άλλοτε λόγω εξοικονόμησης χρόνου. Έτσι λοιπόν, τα δείγματα μετά την αρχική επεξεργασία (αποχωρισμός ορού ή πλάσματος) συντηρούνται σε κατάλληλες θερμοκρασίες, ώστε να μην αλλοιωθούν τα συστατικά τους. Οι θερμοκρασίες στις οποίες μπορούν να διατηρηθούν τα δείγματα ποικίλλουν από 4 °C (κοινό ψυγείο), -20 °C (κατάψυξη), -60 °C (βαθιά κατάψυξη) έως και -180 °C (υγρό άζωτο).

Δείγματα τα οποία έχουν διατηρηθεί σε κατάψυξη και αποψύχονται για να γίνει εργαστηριακός έλεγχος **απαγορεύεται** να καταψυχθούν ξανά, γιατί με αυτό τον τρόπο αλλοιώνονται τα συστατικά τους (τριτοταγής δομή πρωτεϊνών, ενεργότητα ενζύμων). Αν η αρχική ποσότητα του δείγματος επαρκεί, είναι καλό να χωριστεί σε μικρές ποσότητες πριν τη φύλαξη και να διατηρηθεί σε διαφορετικά σωληνάρια στην κατάψυξη. Με αυτόν τον τρόπο, αν χρειαστεί επανάληψη κάποιου προσδιορισμού, αυτή γίνεται σε νέο δείγμα που δεν έχει αποψυχθεί, άρα δεν έχει αλλοιωθεί. Τέλος, τα σωληνάρια φύλαξης πρέπει να έχουν μέγεθος ανάλογο με την ποσότητα του δείγματος και να είναι καλά πωματισμένα.



1.27 Κουτιά φύλαξης σωληναρίων σε χαμηλή θερμοκρασία

## 1.4 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

### 1.4.1 ΣΗΜΑΝΣΗ

Ο χώρος στον οποίο παραλαμβάνονται τα δείγματα για τον εργαστηριακό έλεγχο πρέπει να πληρεί τις ακόλουθες **προδιαγραφές**:

- Βρίσκεται δίπλα στο κυρίως εργαστήριο και είναι ξεχωριστός, έτσι ώστε να μην παρεμποδίζεται η εργασία μέσα στο εργαστήριο από την συνεχή μεταφορά δειγμάτων.
- Είναι εφοδιασμένος με πάγκο εργασίας και στατώ, ώστε να τοποθετούνται τα δείγματα.
- Είναι στελεχωμένος με έναν εργαζόμενο ο οποίος αντιπαραβάλλει τα στοιχεία που είναι γραμμένα στην επικέτα του δείγματος με αυτά που είναι σημειωμένα στο παραπεμπτικό. Στη συνέχεια, ελέγχει την ποιότητα του δείγματος (παρουσία πηγμάτων, αιμόλυση, ικανοποιητική ποσότητα). Σε περίπτωση που το δείγμα είναι ανεπαρκές ή ακατάλληλο, ζητείται νέο δείγμα από τον εξεταζόμενο. Τέλος, ελέγχει αν τα δείγματα απευθύνονται στο συγκεκριμένο εργαστήριο. Αλλιώς τα διοχετεύει έγκαιρα στο σωστό εργαστήριο για την αποφυγή άσκοπων καθυστερήσεων.
- Τα δείγματα καταγράφονται και ταξινομούνται ανάλογα με τις εξετάσεις που ζητούνται σε διαφορετικά στατώ (π.χ. τα δείγματα για γενικό βιοχημικό έλεγχο, τα δείγματα για ηλεκτρολύτες, τα δείγματα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κ.λπ.).
- Τα επείγοντα δείγματα προωθούνται κατά προτεραιότητα με τον χαρακτηρισμό ΕΠΕΙΓΟΝ στο σωληνάριο.

## 1.4.2 ΚΑΤΑΧΩΡΗΣΗ

Η καταχώρηση των δειγμάτων στα βιβλία-αρχεία του εργαστηρίου έχει ήδη περιγραφεί στο κεφάλαιο 1.1.

Η σήμανση και καταχώρηση των στοιχείων με αντιγραφή ενέχει τον κίνδυνο σφάλματος από απροσεξία, λόγω δυσανάγνωστων γραμμάτων στις ετικέτες ή ακόμα και λόγω αδυναμίας του αιμολήπτη να αναγράψει σωστά το όνομα του ασθενούς, ειδικά αν αυτός είναι αλλοδαπός.

Η χρήση της τεχνολογίας **bar code** λύνει όλα τα παραπάνω προβλήματα. Το σύστημα γραμμικού κώδικα (bar code) είναι ένας κωδικός αριθμός, που μπορεί να διαβαστεί από Η/Υ με ειδικό σύστημα ανάγνωσης (bar code reader). Ο αριθμός αυτός συνοδεύει με ειδικές ετικέτες κάθε ασθενή από την εισαγωγή του στο νοσοκομείο, τις εργαστηριακές του εξετάσεις, τις ακτινογραφίες και ό,τι άλλο τον αφορά (φάρμακα που χρεώνονται, εξειδικευμένες εξετάσεις). Τα μηχανήματα που χρησιμοποιούνται για τον εργαστηριακό έλεγχο αναγνωρίζουν τη σήμανση με bar code και καταχωρούν αυτόματα τα αποτελέσματα των εξετάσεων στην καρτέλα του ασθενούς διευκολύνοντας αφάνταστα το έργο του εργαστηρίου και της κλινικής. Τέλος, με την τεχνολογία bar code αποφεύγεται η πιθανότητα λάθους αντιγραφής και ελαχιστοποιείται ο χρόνος μέχρι να είναι το αποτέλεσμα διαθέσιμο στον κλινικό ιατρό.



1.28 Bar code

## 1.5 ΠΗΓΕΣ ΛΑΘΟΥΣ ΚΑΙ ΑΠΟΦΥΓΗ ΤΟΥΣ

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, πηγές λάθους μπορεί να υπάρξουν σε όλα τα στάδια προετοιμασίας των εξετάσεων. Ο εργαζόμενος οφείλει να επαγρυπνεί, ώστε η πιθανότητα λάθους να ελαχιστοποιείται. Επειδή όμως το ανθρώπινο λάθος πάντοτε μπορεί να συμβεί, είναι καλό κάθε στάδιο της προετοιμασίας να ελέγχεται τουλάχιστον δύο φορές και αν είναι δυνατόν και από διαφορετικό άτομο.

Οι εφαρμογές των Η/Υ διευκολύνουν τη λειτουργία του εργαστηρίου, δεν είναι όμως πάντοτε απόλυτα ασφαλείς, γιατί μια απρόβλεπτη βλάβη στο σύστημα του υπολογιστή μπορεί να οδηγήσει σε κατάρρευση του συστήματος. Πρέπει λοιπόν να υπάρχουν ασφαλείς εναλλακτικές λύσεις που θα εξασφαλίσουν την ομαλή ροή της λειτουργίας του εργαστηρίου.

Συνοπτικά τα λάθη που μπορούν να συμβούν ανήκουν σε τρεις κατηγορίες: σφάλματα κατά την προετοιμασία των εξετάσεων, σφάλματα κατά την εργαστηριακή ανάλυση, σφάλματα κατά τη μεταφορά των αποτελεσμάτων στους ενδιαφερόμενους.

### ι) Σφάλματα κατά την προετοιμασία των εξετάσεων.

Οφείλονται σε άγνοια ή έλλειψη προσοχής και μειώνονται με αυξημένη προσοχή, γνώση

και εφαρμογή bar code. Τα πιο συνηθισμένα σφάλματα είναι:

- Κακή προετοιμασία ασθενούς (νηστεία, σωματική άσκηση)
- Λάθος σήμανση ονόματος κατά την αιμοληψία
- Συνωνυμία
- Παραπομπή σε λάθος εργαστήριο
- Λήψη σε λάθος αντιπηκτικό
- Κακή προετοιμασία / αποχωρισμός (αιμόλυση) του δείγματος
- Κακή συντήρηση δείγματος
- Λανθασμένη καταγραφή στο αρχείο εργαστηρίου
- Ο ασθενής παίρνει φάρμακα που δεν δηλώνονται στο παραπεμπτικό.

## ii) Σφάλματα κατά τον εργαστηριακό έλεγχο.

Οφείλονται σε πλημμελή έλεγχο του εργαστηριακού εξοπλισμού και λανθασμένη εφαρμογή του πρωτοκόλλου ανάλυσης. Αποφεύγονται με συστηματικό έλεγχο και πιστή εφαρμογή των πρωτοκόλλων. Ο εργαζόμενος πρέπει πάντα να προσέχει τα παρακάτω:

- Ρύθμιση πιπιετών
- Θερμοκρασία υδατόλουτρου
- Ληγμένο αντιδραστήριο
- Ανάμιξη διαφορετικών αντιδραστηρίων
- Ρύθμιση αναλυτή
- Καθαρισμός και συντήρηση αναλυτή
- Αραιώσεις δείγματος
- Πιστή εφαρμογή πρωτοκόλλου.

## iii) Σφάλματα κατά την αποστολή δειγμάτων.

Οφείλονται σε γραφειοκρατικούς λόγους και αποφεύγονται με επιστάμενο έλεγχο των αποτελεσμάτων και των εντύπων των απαντήσεων. Αυτά που παρατηρούνται πιο συχνά είναι:

- Αποστολή άλλου αποτελέσματος από αυτό που αντιστοιχεί στο δείγμα.
- Καθυστέρηση στην αποστολή του αποτελέσματος.

## 1.6 ΕΤΟΙΜΑ ΣΕΤ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Ο εργαστηριακός έλεγχος διευκολύνεται από τη χρήση έτοιμων σετ (kit) αντιδραστηρίων τα οποία έχουν:

### 1. Έντυπο με οδηγίες που αφορούν:

- Την αρχή της μεθόδου που εφαρμόζεται (φωτομετρική, ανοσοχημική, ηλεκτροχημική).



- Τα αντιδραστήρια που περιέχονται και τη σύστασή τους.
- Λεπτομέρειες για την αραίωση ή ανασύσταση των αντιδραστηρίων που δεν είναι έτοιμα προς χρήση.
- Την τεχνική βήμα προς βήμα που πρέπει να ακολουθήσει ο εργαζόμενος.
- Υλικά (αναλώσιμα συνήθως) και εξοπλισμό που δεν περιέχονται στο σετ αλλά είναι απαραίτητα για την εξέταση.
- Τρόπο υπολογισμού του αποτελέσματος με καμπύλη αναφοράς για τους ποσοτικούς προσδιορισμούς ή κατώφλι (cut-off) για τους ποιοτικούς προσδιορισμούς.
- Τιμές αναφοράς στον γενικό πληθυσμό και παθολογικές καταστάσεις στις οποίες αναμένονται τιμές εκτός των φυσιολογικών.
- Αρχική επεξεργασία του δείγματος πριν τον προσδιορισμό και περαιτέρω επεξεργασία, αν η αρχική τιμή είναι εκτός των ορίων ευαισθησίας του αντιδραστηρίου.
- Στοιχεία που αφορούν την ποιότητα του σετ (ευαισθησία, ειδικότητα, επαναληψιμότητα, αλληλεπίδραση με εξωγενείς ουσίες).
- Βιβλιογραφικές αναφορές που πιστοποιούν την αξιοπιστία της αρχής εφαρμοζόμενης μεθόδου και την ποιότητα του συγκεκριμένου σετ.

- 2. Αντιδραστήρια** έτοιμα προς χρήση ή λυοφιλοποιημένα αντιδραστήρια που χρειάζονται ανασύσταση ή συμπυκνωμένα αντιδραστήρια που χρειάζονται αραίωση.
- 3. Καταγραφικό χαρτί** (χιλιοστομετρικό, λογαριθμικό ή ημιλογαριθμικό) για τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς.

Οι οδηγίες που περιέχονται στα σετ πρέπει να τηρούνται σχολαστικά ώστε τα αποτελέσματα να είναι αξιόπιστα. Ο εργαζόμενος οφείλει να προσέχει τα ακόλουθα:

- Θερμοκρασία συντήρησης του σετ
- Θερμοκρασία των αντιδραστηρίων κατά τη διάρκεια της εξέτασης
- Ημερομηνία λήξης του σετ
- Αριθμό παρτίδας (Lot Number) που αναγράφεται στη συσκευασία.

ΑΠΑΓΟΡΕΥΕΤΑΙ η ανάμιξη αντιδραστηρίων από διαφορετικά Lot Number.



1.29 Σετ αντιδραστηρίων

## ΚΑΝΟΝΕΣ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

1. Δεν τρώμε και δεν πίνουμε στο εργαστήριο.
2. Δεν καπνίζουμε στο εργαστήριο.
3. Δεν χειριζόμαστε τα βιολογικά δείγματα χωρίς γάντια μιας χρήσης (όλα τα δείγματα θεωρούνται δυνητικά μολυσματικά).
4. Φοράμε πάντα την εργαστηριακή μπλούζα.
5. Δεν ανακατεύουμε αντιδραστήρια από συσκευασίες με διαφορετικό Lot Number.
6. Δεν απαντάμε σε τηλέφωνο, δεν ανοίγουμε πόρτες, δεν γράφουμε απαντήσεις με γάντια.
7. Δεν παρασκευάζουμε διαλύματα χημικών ουσιών ή αντιδραστηρίων πριν διαβάσουμε προσεκτικά τις οδηγίες προφύλαξης, παρασκευής και συντήρησης.
8. Δεν αναρροφούμε με το στόμα αντιδραστήρια και αποφεύγουμε την εισπνοή τους.
9. Δεν εφαρμόζουμε κανένα πρωτόκολλο εργασίας χωρίς γραπτές οδηγίες, τις οποίες τηρούμε σχολαστικά.
10. Ενημερώνουμε πάντα τον υπεύθυνο του εργαστηρίου για τυχόν προβλήματα ή ατυχήματα.
11. Δεν φεύγουμε από το εργαστήριο αν δεν ελέγξουμε την καθαριότητα των πάγκων εργασίας και δεν ολοκληρώσουμε την καθημερινή συντήρηση των μηχανημάτων.
12. Δεν φεύγουμε από το εργαστήριο αν δεν πλύνουμε καλά τα χέρια μας με νερό και αντισηπτικό σαπούνι (με ιδιαίτερη προσοχή ανάμεσα στα δάκτυλα).



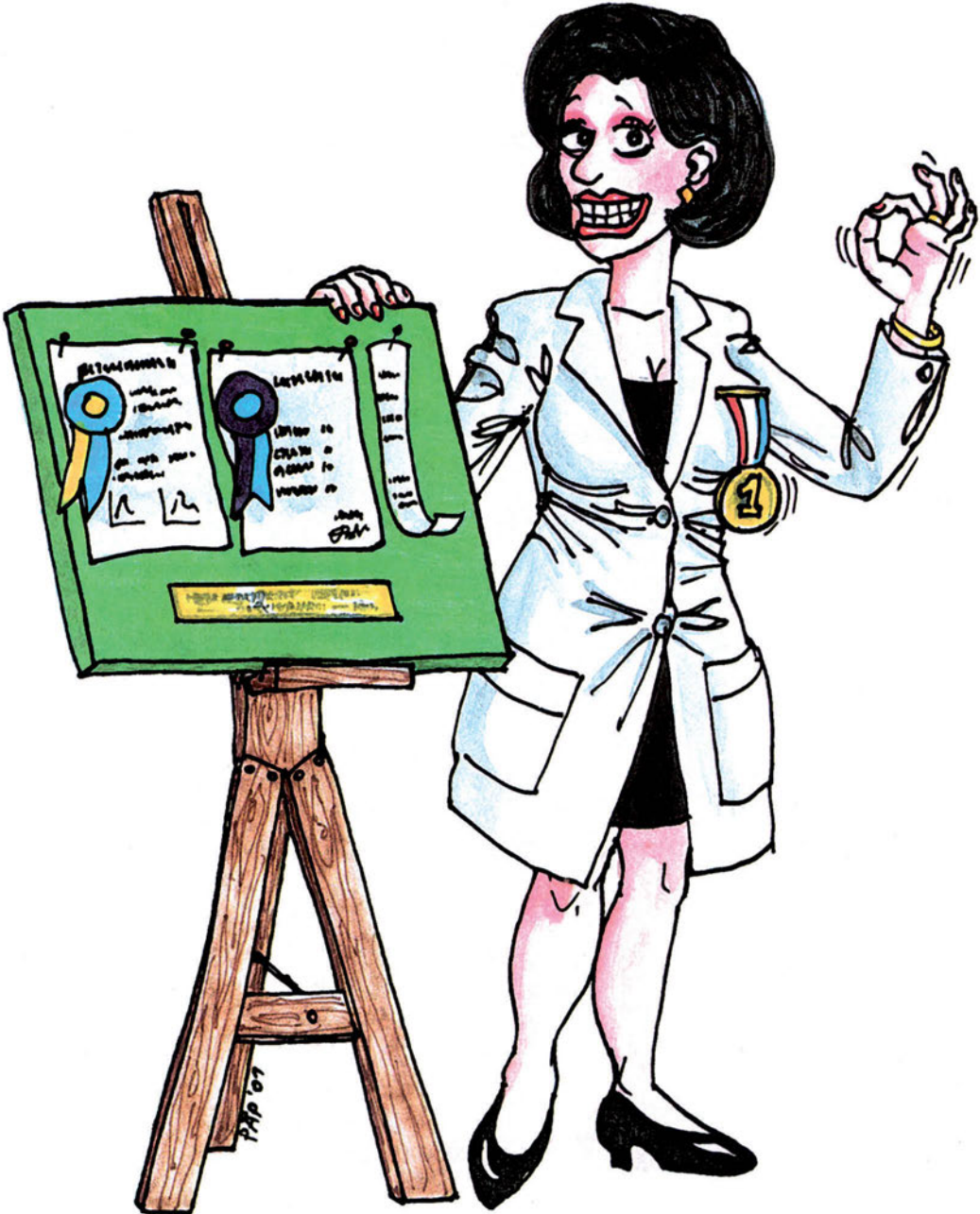
## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### ΝΑ ΜΗΝ ΞΕΧΝΩ

- Ελέγχω καθημερινά τη λειτουργία των μηχανημάτων και την καθαριότητα του εργαστηρίου.
- Προσέχω τη σωστή καταγραφή του ονόματος στα δείγματα, την ορθή καταχώρηση στο αρχείο και στο έντυπο απαντήσεων.
- Κατά την αιμοληψία λαμβάνω τη σωστή ποσότητα αίματος στο κατάλληλο σωληνάριο προσέχοντας την ασφάλεια τόσο του εξεταζόμενου όσο και τη δική μου.
- Τηρώ τα πρωτόκολλα του εργαστηρίου αναφορικά με την αποφυγή αιμόλυσης και με την ορθή συντήρηση των δειγμάτων.
- Η γνώση και η προσοχή είναι οι καλύτεροι οδηγοί για την αποφυγή λαθών.

## ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Ποιο είναι το αντικείμενο του εργαστηρίου Κλινικής Βιοχημείας;
2. Αναφέρετε τις διαφορές του ορού από το πλάσμα σχετικά με τη μέθοδο λήψης του δείγματος, τη σύσταση, την επεξεργασία και τα είδη προσδιορισμού.
3. Αναφέρετε τα πλεονεκτήματα της χρήσης Η/Υ στο Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας.
4. Περιγράψτε τα πιθανά σημεία σφάλματος στη σήμανση του δείγματος κατά τη διαδικασία: αιμοληψία - παραπομπή στο εργαστήριο - καταχώρηση - καταγραφή αποτελέσματος.
5. Ποια είναι τα πλεονεκτήματα της χρήσης έτοιμων αντιδραστηρίων (σετ) στο εργαστήριο;
6. Πώς εξασφαλίζεται η δυνατότητα εργαστηριακού επανελέγχου ενός δείγματος που δίνει ασαφή αποτελέσματα;
7. Ποια είναι τα βιολογικά υγρά που ελέγχονται στο εργαστήριο της Κλινικής Βιοχημείας;
8. Ποια είναι τα σημεία που πρέπει να ελέγχονται καθημερινά στο εργαστήριο;
9. Περιγράψτε τη διαδικασία διακίνησης ενός δείγματος με την ένδειξη «ΕΠΕΙΓΟΝ».
10. Ποια είναι τα υλικά που πρέπει να έχει μαζί του ο εργαζόμενος κατά την αιμοληψία;



## 2.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

### 2.1.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

Το κύριο αντικείμενο του Εργαστηρίου Κλινικής Βιοχημείας είναι, όπως έχει ήδη αναφερθεί στο Κεφ. 1, ο ποσοτικός αλλά και ποιοτικός προσδιορισμός ουσιών στον ανθρώπινο οργανισμό. Έχει υπολογισθεί ότι με τις σύγχρονες εργαστηριακές μεθόδους μπορούν να μετρηθούν πάνω από 600 ουσίες στον ανθρώπινο οργανισμό και είναι βέβαιο ότι με την πρόοδο της επιστήμης και της τεχνολογίας ο αριθμός αυτός θα αυξηθεί περισσότερο.

Η παρουσία κάποιων ουσιών στα βιολογικά υγρά πολλές φορές παρεμποδίζει τον εργαστηριακό προσδιορισμό κάποιων άλλων. Έτσι, πριν τον κυρίως προσδιορισμό μιας ουσίας, είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός και η απομάκρυνση άλλων ουσιών. Οι κυριότερες τεχνικές διαχωρισμού που εφαρμόζονται στην καθημερινή πράξη είναι η **φυγοκέντρηση**, η **απολευκωμάτωση** και η **χρωματογραφία**.

### 2.1.2 ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ

Η φυγοκέντρηση είναι η τεχνική που επιταχύνει το διαχωρισμό ουσιών που διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ως προς τη μάζα. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο νόμο της βαρύτητας.



2.1 Επιτραπέζια φυγόκεντρος συσκευή

#### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ:

Η φυγόκεντρος (συσκευή) είναι ένα μηχάνημα που δημιουργεί δυνάμεις με την περιστροφή. Οι δυνάμεις αυτές εξαναγκάζουν αιωρούμενα σωματίδια (κυτταρικά ή μη) σε ένα υγρό να κινηθούν με ταχύτητα προς τον πυθμένα του σωληναρίου στο οποίο βρίσκονται. Η φυγοκεντρική δύναμη που αναπτύσσεται είναι γνωστή σαν **φυγόκεντρος δύναμη** και σχετίζεται με την ταχύτητα περιστροφής (στροφές ανά λεπτό, rpm) και με την απόσταση του δείγματος από τον άξονα περιστροφής.

Απαραίτητη γνώση για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των ουσιών αποτελεί ο χρόνος, η θερμοκρασία και η ταχύτητα φυγοκέντρωσης.

## ΤΑ ΜΕΡΗ ΤΗΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΟΥ

Η **κεφαλή ή ρότορας** είναι προσαρμοσμένη στον άξονα περιστροφής και φέρει κατάλληλους υποδοχείς για σωληνάρια διαφόρων μεγεθών. Υπάρχουν δύο είδη κεφαλών:

- 1) **Οριζόντια:** Τα σωληνάρια τοποθετούνται κατακόρυφα και κατά τη διάρκεια της περιστροφής παίρνουν οριζόντια θέση.
- 2) **Γωνιώδης:** Τα σωληνάρια παραμένουν σε σταθερή γωνία προς τον άξονα περιστροφής καθ' όλη τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης.

Ο **άξονας περιστροφής** γύρω από τον οποίο περιστρέφεται η κεφαλή.

Ο **κινητήρας** που μεταφέρει το ηλεκτρικό ρεύμα στον άξονα περιστροφής μέσω του μετατροπέα των ψυκτών.

Το **χρονόμετρο** ρυθμίζει τον χρόνο της φυγοκέντρωσης ανάλογα με την ρύθμιση που κάνει ο εργαζόμενος.

Το **ταχύμετρο (στροφόμετρο)** ρυθμίζει την ταχύτητα περιστροφής που μπορεί να ποικίλλει από 3.000 έως 6.000 rpm για τις κοινές φυγοκέντρους μέχρι 25.000 rpm για τις υπερφυγοκέντρους.

Το **ψυκτικό σύστημα** (όταν υπάρχει) διατηρεί σταθερή τη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης με τη βοήθεια ενός θερμοστάτη.

2.2 Ψυχόμενη  
φυγόκεντρος συσκευή



## ΚΑΝΟΝΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΟΥ



2.3: Ισοζυγισμένη κεφαλή

1. **Ισοζυγισμένη κεφαλή:** Τα σωληνάρια τοποθετούνται σε υποδοχείς συμμετρικά ως προς το κέντρο περιστροφής και τα μεταξύ τους βάρη είναι ίσα. Αν ο αριθμός των σωληναρίων είναι περιττός, τότε χρησιμοποιείται σαν αντίβαρο ένα σωληνάριο με νερό ίσου όγκου με αυτό που βρίσκεται απέναντι του.
2. **Ποιότητα σωληναρίων:** Τα σωληνάρια πρέπει να είναι από κατάλληλο υλικό και το μέγεθός τους να εφαρμόζει απόλυτα στους υποδοχείς, ώστε να μη σπάζουν κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης. Επιπλέον, τα σωληνάρια πρέπει να είναι πωματισμένα, ώστε να προστατεύεται το περιβάλλον της φυγοκέντρου από εκτόξευση σωματιδίων.

3. **Συντήρηση:** Η φυγόκεντρος πρέπει να ελέγχεται περιοδικά για την καλή λειτουργία των εξαρτημάτων της και να καθαρίζεται συστηματικά στο τέλος κάθε ημέρας, ώστε να απομακρύνονται οι σταγόνες βιολογικών υγρών και να περιορίζεται η διασπορά λοιμογόνων παραγόντων.

**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗΣ**

1. Αποχωρισμός ορού ή πλάσματος από τα έμμορφα συστατικά (ερυθρά, λευκά, αιμοπετάλια).
2. Αποχωρισμός εγκεφαλονωτιαίου υγρού, ούρων, πλευριτικού υγρού από κυτταρικά στοιχεία που συνυπάρχουν και εμποδίζουν τον εργαστηριακό έλεγχο.
3. Μελέτη λιποπρωτεϊνών, κατά την οποία αποχωρίζονται με υπερφυγοκέντρωση οι προς προσδιορισμό ουσίες.
4. Διαχωρισμός υγρών φάσεων με διαφορετικές ιδιότητες (υδρόφοβες ουσίες - οργανικοί διαλύτες / υδρόφιλες ουσίες - υδατική φάση).

**2.1.3 ΑΠΟΛΕΥΚΩΜΑΤΩΣΗ**

Η απολευκωμάτωση είναι μια τεχνική που εφαρμοζόταν ευρύτατα προ ετών, όταν οι εργαστηριακοί προσδιορισμοί απαιτούσαν μεγάλη ποσότητα ορού.

Στο φυσιολογικό ορό ή πλάσμα του εξεταζόμενου το μεγαλύτερο ποσοστό των διαλυμένων ουσιών είναι πρωτεΐνες. Σε περίπτωση λοιπόν προσδιορισμού μη πρωτεϊνικών συστατικών (βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, σάκχαρο, λιπίδια) οι πρωτεΐνες μπορεί να παρεμποδίσουν την ανάλυση. Για να ελαχιστοποιηθεί αυτή η παρεμβολή οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με φυσικές και χημικές μεθόδους πριν την έναρξη της ανάλυσης.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την απολευκωμάτωση είναι το τριχλωροξικό οξύ (0,3 mol/L) και το υπερχλωρικό οξύ (1 mol/L). Όταν το δείγμα αντιδράσει μετά ανωτέρω οξέα, οι πρωτεΐνες κροκυδώνονται και στη συνέχεια απομακρύνονται από το διάλυμα με φυγοκέντρωση ή διήθηση.

**2.1.4 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ**

Η χρωματογραφία αποτελεί μέθοδο διαχωρισμού αλλά και αναλυτική μέθοδο προσδιορισμού ουσιών γι' αυτό περιγράφεται διεξοδικά στο Κεφ.2.2.

**2.1.5 ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ**

Η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων, η εξαλάτωση πρωτεϊνών, η διαπίδυση μέσω ημιπερατής μεμβράνης, η υπερδιήθηση μέσω ημιπερατής μεμβράνης με εφαρμογή πίεσης και η προσρόφηση σε ρητίνες αποτελούν πρόσθετες μεθόδους διαχωρισμού συστατικών πριν τον κυρίως εργαστηριακό προσδιορισμό. Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούνται από εξειδικευμένο προσωπικό και για ειδικές εφαρμογές περιορισμένης εμβέλειας.

## 2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

### 2.2.1 ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ

**Φωτομετρία** ονομάζεται η μέτρηση της έντασης του φωτός. Φως ονομάζουμε το τμήμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που βλέπει το ανθρώπινο μάτι και κυμαίνεται από 400-760 nm (ορατό) και τις γειτονικές περιοχές (υπεριώδες και εγγύς υπέρυθρο).

Η φωτομετρική ανάλυση στηρίζεται στην ικανότητα της ύλης:

- 1) να αλληλεπιδρά με το φως με αποτέλεσμα να το απορροφά ή να το σκεδάζει και
- 2) να εκπέμπει φως μετά από διέγερση (φθορισμός).

Με βάση αυτές τις ιδιότητες της ύλης έχουν αναπτυχθεί τεχνικές και όργανα που μετρούν την ένταση του φωτός μετά την αλληλεπίδρασή του με την ύλη.

Ο θεμελιώδης νόμος της φωτομετρίας είναι ο **νόμος των Lambert και Beer** σύμφωνα με τον οποίο η ένταση του φωτός που προσπίπτει σε ένα διάλυμα ( $I_0$ ) και η ένταση του φωτός που διέρχεται από το διάλυμα αυτό ( $I$ ) συνδέονται με την εξίσωση:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon cd} \quad \text{ή} \quad \log(I_0/I) = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Όπου  $\epsilon$ : μια σταθερά που εξαρτάται από το μήκος κύματος,  $c$ : η μοριακή συγκέντρωση της ένωσης που απορροφά το φως και  $d$ : το πάχος της διαδρομής του φωτός.

Ο λόγος ή  $\log(I_0/I)$  ονομάζεται **απορροφητικότητα ή απορρόφηση** και συμβολίζεται

**A**. Όταν  $d=1\text{cm}$ , τότε η απορροφητικότητα ονομάζεται **οπτική πυκνότητα**.

Οι κυριότερες φωτομετρικές μέθοδοι είναι η **φασματοφωτομετρία οπτικής απορρόφησης**, η **φθορισμομετρία**, η **νεφελομετρία**, η **θολοσιμετρία** και η **φλογοφωτομετρία**.

Μήκος Κύματος	Περιοχή	Χρώμα
<220	Υπεριώδης	Αόρατο
220-380	Εγγύς υπεριώδης	Αόρατο
380-440	Ορατή	Ιώδες
440-500	Ορατή	Μπλε
500-580	Ορατή	Πράσινο
580-600	Ορατή	Κίτρινο
600-620	Ορατή	Πορτοκαλί
620-750	Ορατή	Κόκκινο
750-2000	Εγγύς υπέρυθρη	Αόρατο

*Χαρακτηριστικά του υπεριώδους, ορατού και υπέρυθρου φάσματος*



## ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΩΝ

Τα κοινά φασματοφωτόμετρα αποτελούνται από μια πηγή φωτός, ένα μονοχρωμάτορα, την κυψελίδα, έναν ανιχνευτή φωτός και το σύστημα ανάγνωσης του αποτελέσματος.

**Η πηγή φωτός:** Είναι συνήθως μια πηγή συνεχούς φάσματος στην περιοχή του ορατού (λυχνία βολφραμίου). Για μήκη κύματος  $<340 \text{ nm}$  χρησιμοποιούνται λυχνίες υδραργύρου ή υδρογόνου ή τόξο αερίου ξένου. Το ρεύμα που τροφοδοτεί τη λυχνία πρέπει να έχει σταθερή τάση και ένταση.



2.4 Φασματοφωτόμετρο

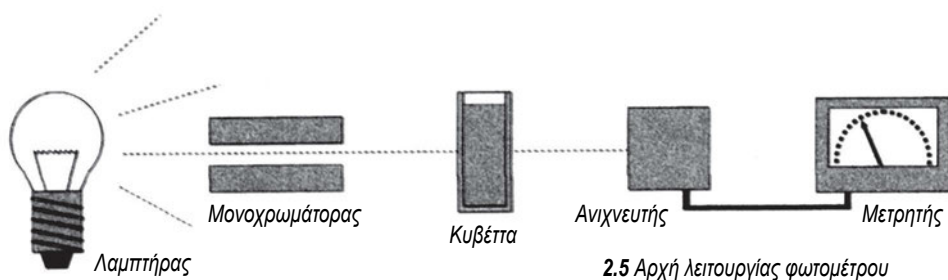
**Ο μονοχρωμάτορας:** Είναι το σύστημα που επιλέγει στενές περιοχές του φάσματος και απομονώνει τη διέλευση φωτός με άλλα μήκη κύματος. Τα κυριότερα είδη μονοχρωμάτορα είναι τα πρίσματα, τα φράγματα περίθλασης και τα φίλτρα.

**Η κυψελίδα (κυβέττα):** Είναι το ειδικό σωληνάριο στο οποίο τοποθετείται το διάλυμα προς φωτομέτρηση. Είναι κατασκευασμένη από

ειδικό γυαλί, χαλαζία ή πλαστικό και έχει σταθερή διατομή (1cm). Οι κυψελίδες πρέπει να καθαρίζονται σχολαστικά μετά από κάθε χρήση, διότι κατάλοιπα από ουσίες, δακτυλικά αποτυπώματα ή χαραγματιές μπορεί να αλλοιώσουν την απορρόφηση του φωτός λόγω διάθλασης μέρους της ακτινοβολίας και να μεταβάλλουν το αποτέλεσμα του εργαστηριακού ελέγχου.

**Ο ανιχνευτής του φωτός:** Είναι συνήθως ένα απλό φωτοκύτταρο που χρησιμοποιείται στα κοινά φωτόμετρα ή ένας φωτοπολλαπλασιαστής που είναι πιο ευαίσθητος γιατί έχει και ιδιότητες ενισχυτή του σήματος και χρησιμοποιείται στα σύγχρονα φωτόμετρα.

**Το σύστημα ανάγνωσης του αποτελέσματος:** Η μέτρηση του ρεύματος που δημιουργείται γίνεται άμεσα ή έμμεσα μετά από ενίσχυση του σήματος. Η ένταση του ρεύματος παρουσιάζεται είτε αναλογικά (απόκλιση βελόνας) είτε ψηφιακά (αριθμητική ένδειξη σε οθόνη). Στα σύγχρονα φωτόμετρα υπάρχουν ενσωματωμένοι μικροεπεξεργαστές οι οποίοι μετατρέπουν τις τιμές της απορρόφησης σε τιμές συγκέντρωσης.



2.5 Αρχή λειτουργίας φωτομέτρου

**ΤΕΧΝΙΚΗ ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗΣ**

Η χημική αντίδραση για τον προσδιορισμό μιας ουσίας γίνεται παράλληλα για το **άγνωστο** δείγμα (περιέχει το εξεταστέο και όλα τα αντιδραστήρια), το **τυφλό δείγμα** (περιέχει μόνο όλα τα αντιδραστήρια) και το **πρότυπο ή standard** (περιέχει δείγμα γνωστής συγκέντρωσης και όλα τα αντιδραστήρια).

	E	St	T
<b>Αντιδραστήριο</b>	✓	✓	✓
<b>Πρότυπο διάλυμα</b>	-	✓	-
<b>Ορός ή πλάσμα</b>	✓	-	-

όπου: E=εξεταστέο  
St=standard  
T=τυφλό

Μετά την ολοκλήρωση της χημικής αντίδρασης αρχίζει η φωτομέτρηση που συνίσταται στην ανάγνωση της απορρόφησης και περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- 1) Επιλογή μήκους κύματος και έλεγχος μηδενισμού της ένδειξης με άδεια κυψελίδα.
- 2) Φωτομέτρηση τυφλού και μηδενισμός εκ νέου της ένδειξης.
- 3) Φωτομέτρηση του πρότυπου διαλύματος και καταγραφή της ένδειξης απορρόφησης.
- 4) Φωτομέτρηση του εξεταστέου και καταγραφή της ένδειξης απορρόφησης.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της ουσίας στο δείγμα γίνεται με σύγκριση με το πρότυπο διάλυμα ή με ανάγνωση της τιμής σε καμπύλη που δημιουργείται με σειρά δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης.

Η συγκέντρωση στο άγνωστο δείγμα γίνεται με βάση τον τύπο:

$$C_{εξ} = C_{st} \times \frac{A_{εξ}}{A_{st}}$$

Όπου:  $C_{εξ}$  = η συγκέντρωση του αγνώστου (εξεταστέου)

$C_{st}$  = η συγκέντρωση του πρότυπου (standard)

$A_{εξ}$  = η απορρόφηση του εξεταστέου

$A_{st}$  = η απορρόφηση του προτύπου

Κάθε μέθοδος έχει ένα όριο συγκέντρωσης ουσίας πάνω από το οποίο η σχέση απορρόφησης και συγκέντρωσης δεν είναι γραμμική (τα ποσά δεν είναι ανάλογα). Το όριο αυτό ονομάζεται **γραμμικότητα** της μεθόδου. Αν η συγκέντρωση της άγνωστης ουσίας είναι μεγαλύτερη από αυτό το όριο, τότε το δείγμα αραιώνεται και επαναλαμβάνεται ο εργαστηριακός έλεγχος από την αρχή. Το τελικό προϊόν φωτομετρείται εκ νέου και το αποτέλεσμα πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή αραιώσης.

**2.2.2 ΑΛΛΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑΣ**

**Φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης:** Χρησιμοποιείται για την ανάλυση



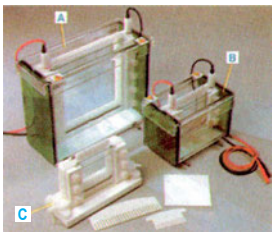
χημικών στοιχείων που βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στα βιολογικά υγρά και στηρίζεται στη μέτρηση του ποσού του φωτός που απορροφάται όταν περνά μέσα από τα άτομα του στοιχείου. Είναι μέθοδος με υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία.

**Φλογοφωτομετρία:** Η μέθοδος δεν χρησιμοποιείται πλέον ευρέως αλλά εφαρμοζόταν επί χρόνια για τον προσδιορισμό ιόντων  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Θολοσιμετρία:** Χρησιμοποιείται για τη μέτρηση σωματιδίων που βρίσκονται σε εναιώρημα και στηρίζεται στη μέτρηση του ποσοστού φωτός που αποκλείεται από το εναιώρημα καθώς το φως περνάει μέσα από την κυψελίδα.

**Νεφελομετρία:** Είναι αντίστοιχη με τη θολοσιμετρία και εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό μικρών σωματιδίων ή κολλοειδών διαλυμάτων σε εναιώρημα. Στηρίζεται στην ίδια αρχή με τη θολοσιμετρία με τη διαφορά ότι ο μετρητής της έντασης του φωτός είναι σε γωνία  $90^\circ$  με την πηγή και όχι σε ευθεία.

## 2.2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ



2.6 Συσκευή κατακόρυφης ηλεκτροφόρησης

Αποτελεί ευρύτατα εφαρμοζόμενη μέθοδο διαχωρισμού και ποσοτικού προσδιορισμού βιολογικών ουσιών που βασίζεται στη μετακίνηση μορίων, που έχουν θετικό ή αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο, κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.

### ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Οι χημικές ενώσεις που έχουν ηλεκτρικό φορτίο μετακινούνται προς έναν πόλο όταν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο.

Αρνητικά φορτισμένες ενώσεις  $\rightarrow$  ΑΝΟΔΟΣ (Θετικός Πόλος)

Θετικά φορτισμένες ενώσεις  $\rightarrow$  ΚΑΘΟΔΟΣ (Αρνητικός Πόλος)

Οι πρωτεΐνες έχουν αμφολυτικές ιδιότητες, δηλαδή παρουσιάζονται άλλοτε με θετικό και άλλοτε με αρνητικό φορτίο ανάλογα με το pH του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται. Η ταχύτητα της μετακίνησης των πρωτεϊνών εξαρτάται από το μέγεθος και το σχήμα (τριτοταγή δομή), το ηλεκτρικό τους φορτίο, τη θερμοκρασία και το ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο βρίσκονται.



### ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

Οι ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιούνται κυρίως για το διαχωρισμό πρωτεϊνών και λιποπρωτεϊνών αλλά και νουκλεϊκών οξέων με βάση τη διαφορετική τους κινητικότητα όταν αυτά τα μόρια βρεθούν κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.

Τα κυριότερα είδη ηλεκτροφόρησης είναι:

- Ηλεκτροφόρηση σε χαρτί (δεν χρησιμοποιείται πλέον)
- Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

- Ηλεκτροφόρηση σε οξική κυτταρίνη
- Ηλεκτροφόρηση υψηλής διακριτικής ικανότητας
- Ανοσοηλεκτροφόρηση
- Ανοσοκαθήλωση
- Ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδιο
- Ισοηλεκτρική εστίαση

### 2.2.4 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Η χρωματογραφία είναι μέθοδος διαχωρισμού και ταυτοποίησης ουσιών που βρίσκονται σε ένα διάλυμα μαζί με πολλές άλλες ουσίες με παρεμφερείς φυσικές και χημικές ιδιότητες.

#### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η χρωματογραφία στηρίζεται στο διαφορετικό ρυθμό μετακίνησης (μετανάστευσης) των συστατικών ενός μείγματος πάνω ή διαμέσου ενός πορώδους υλικού. Στη χρωματογραφία διακρίνουμε δύο φάσεις:

- 1) Σταθερή φάση:** Είναι ένα πορώδες υλικό μέσω του οποίου περνούν ή πάνω στο οποίο καθελώνονται τα συστατικά του μείγματος.
- 2) Κινητή φάση:** Είναι κάποιο υγρό ή αέριο με τη ροή του οποίου επιτυγχάνεται η μετανάστευση των συστατικών του μείγματος.

Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται μέσω διαφόρων φυσικοχημικών μηχανισμών όπως η προσρόφηση, η μοριακή διήθηση ή η ανταλλαγή ιόντων. Οι παράγοντες που καθορίζουν το ρυθμό μετακίνησης κάθε ουσίας τους δείγματος είναι:

- ▀ ρυθμός ροής της κινητής φάσης μέσω της σταθερής
- ▀ ο βαθμός διαλυτότητας των ουσιών στην κινητή φάση
- ▀ οι δυνάμεις που αναπτύσσονται (κατανομής, προσρόφησης, ανταλλαγής ιόντων, αποκλεισμού).

#### ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Οι χρωματογραφικές τεχνικές χρησιμοποιούνται για την ανάλυση επιμέρους αμινοξέων σε ένα μίγμα οργανικών οξέων σε ούρα ή αίμα για το διαχωρισμό υδρόφιλων από λιπόφιλες ενώσεις (στεροειδή), για την απομόνωση ευαίσθητων μακρομορίων (ένζυμα), για την ανάλυση ορμονών και παραγώγων τους, φαρμάκων, βιταμινών και τοξικών ουσιών.



2.7 Συσκευή χρωματογραφίας για καθαρισμό πρωτεϊνών

Τα κυριότερα είδη χρωματογραφίας είναι:

- Χρωματογραφία στήλης
- Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
- Χρωματογραφία σε χαρτί
- Αέρια χρωματογραφία
- Χρωματογραφία προσρόφησης
- Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων
- Χρωματογραφία μοριακής διήθησης
- Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)

## 2.2.5 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι της ποτενσιομετρίας και της ωσμομετρίας μελετούν τις χημικές αλληλεπιδράσεις της ηλεκτρικά φορτισμένης ύλης και έχουν συχνή εφαρμογή στα εργαστήρια Κλινικής Βιοχημείας για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης ιόντων ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ), της μερικής πίεσης των αερίων του αίματος και σπανιότερα χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό άλλων ουσιών ( $\text{NH}_3$ ).

### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΙΑΣ

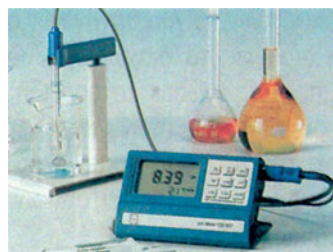
Η ποτενσιομετρία στηρίζεται στη μέτρηση της διαφοράς δυναμικού μεταξύ δύο ηλεκτροδίων, ενός ηλεκτροχημικού στοιχείου. Το ηλεκτρικό στοιχείο αποτελείται από δύο ηλεκτρόδια που είναι εμβαπτισμένα σε ένα διάλυμα ενός καλού αγωγού του ηλεκτρισμού (ηλεκτρολύτη).

Για να προσδιορίσουμε την διαφορά δυναμικού μεταξύ ενός διαλύματος που περιέχει την προς ανάλυση ουσία πρέπει να χρησιμοποιήσουμε τη διαφορά δυναμικού ανάμεσα σε ένα γνωστό ηλεκτρόδιο και γνωστό διάλυμα. Τα δύο ηλεκτρόδια του στοιχείου ονομάζονται ηλεκτρόδιο αναφοράς και ηλεκτρόδιο μέτρησης. Το είδος του ηλεκτροδίου αναφοράς εξαρτάται από τη φύση και τη συγκέντρωση του ιόντος που θέλουμε να μετρήσουμε. Υπάρχουν οξειδοαναγωγικά και ιοντοεπιλεκτικά ηλεκτρόδια, ηλεκτρόδια αερίων και ηλεκτρόδια ενζύμων.

### ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Η **ποτενσιομετρία** χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης  $\text{H}^+$  (pHμετρα), συγκέντρωσης ανιόντων ή κατιόντων, ιχνοστοιχείων και μερικής πίεσης αερίων αίματος.

Η **ωσμομετρία**, η οποία μετρά τη συγκέντρωση σωματιδίων που συνεισφέρουν στην ωσμωτική πίεση ενός διαλύματος, χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της νεφρικής



2.8 pH-μετρο

λειτουργίας, στη δηλητηρίαση από αιθανόλη, στην τοξική επίδραση φαρμάκων, στα εγκαύματα για την εκτίμηση της αφυδάτωσης και στο διαβητικό κώμα.

### 2.2.6 ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΟΙ – ΡΑΔΙΟΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ

Οι τεχνικές αυτές αποτελούν αντικείμενο άλλου μαθήματος. Θα ήταν όμως παράλειψη να μη συμπεριληφθούν στις μεθόδους προσδιορισμού. Αποτελούν ευρύτατα διαδεδομένες τεχνικές τα τελευταία χρόνια και χαρακτηρίζονται από πολύ μεγάλη **ευαισθησία**, δηλαδή, μπορούν να προσδιορίσουν με ακρίβεια ουσίες που βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στα βιολογικά υγρά. Επιπλέον, οι τεχνικές αυτές χαρακτηρίζονται από μεγάλη **ειδικότητα**, δηλαδή, έχουν τη δυνατότητα να προσδιορίσουν μια ουσία χωρίς την παρεμβολή άλλων παρεμφερών ουσιών που βρίσκονται στο ίδιο διάλυμα.

Η αρχή των μεθόδων στηρίζεται στην αντίδραση αντιγόνου – αντισώματος (**Ag-Ab**) και τη δημιουργία ανοσοσυμπλεγμάτων, τα οποία στη συνέχεια ανιχνεύονται με ραδιενεργούς ή ενζυμικά σηματοδοτούμενους ανιχνευτές.

Η βιομηχανική παρασκευή έτοιμων αντιδραστηρίων (kits) διευκολύνει περαιτέρω την εφαρμογή των τεχνικών αυτών σε όλο και περισσότερα εργαστήρια. Χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό ή και ποιοτικό προσδιορισμό αντιγόνων (αντιγόνο ηπατίτιδας Β), αντισωμάτων (αντίσωμα ηπατίτιδας C), ορμονών (υπόφυσης, επινεφριδίων, θυρεοειδούς, γεννητικών αδένων) και καρκινικών δεικτών.

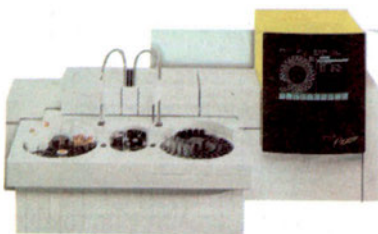


2.9 Συσκευή πλυσίματος στη μέθοδο ELISA

### 2.2.7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΥΤΟΜΑΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Η ραγδαία αύξηση του αριθμού των προς εξέταση δειγμάτων αλλά και του αριθμού των διαφορετικών εξετάσεων που απαιτούνται για κάθε ασθενή τα τελευταία χρόνια δημιούργησαν σοβαρά προβλήματα στη ροή εργασίας των εργαστηρίων. Οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνταν μέχρι τη δεκαετία του '80 παρουσίαζαν πολλά προβλήματα με κυριότερα τα κάτωθι:

- ▶ μεγάλος χρόνος μέχρι τη λήψη αποτελέσματος
- ▶ κακή επαναληψιμότητα
- ▶ έλλειψη ευαισθησίας
- ▶ κίνδυνος μόλυνσεων του προσωπικού με τους πολύπλοκους χειρισμούς των δειγμάτων



2.10 Αυτόματος βιοχημικός αναλυτής

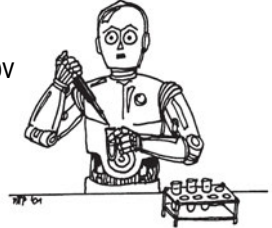
- ▶ κίνδυνος από τη χρήση τοξικών ή εύφλεκτων χημικών ουσιών
- ▶ αδυναμία ταυτόχρονης ανάλυσης πολλών δειγμάτων για την ίδια εργαστηριακή παράμετρο
- ▶ μεγάλη αρχική ποσότητα δείγματος.

Έτσι λοιπόν δημιουργήθηκε η ανάγκη κατασκευής συσκευών με δυνατότητα γρήγορης, ασφαλούς, οικονομικής και αξιόπιστης επεξεργασίας μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

Οι πρώτοι αναλυτές κατασκευάστηκαν έτσι, ώστε να χρησιμοποιούν μεθόδους αντίστοιχες με αυτές που εφαρμόζαν οι εργαζόμενοι. Γρήγορα όμως αντικαταστάθηκαν από πολύ «έξυπνα» και «φιλικά» μηχανήματα που χρησιμοποιούν άλλες αρχές λειτουργίας.

Οι σύγχρονοι αναλυτές έχουν τη δυνατότητα να:

- ▶ Χρησιμοποιούν ελάχιστο δείγμα (0,5 mL) για μεγάλο αριθμό εξετάσεων.
- ▶ Εξοικονομούν αντιδραστήριο ώστε να μειώνεται σημαντικά το κόστος.
- ▶ Εξοικονομούν αναλώσιμα υλικά.
- ▶ Εξαλείφουν το φαινόμενο της επιμόλυνσης από δείγμα σε δείγμα.
- ▶ Μειώνουν το χρόνο αφού μπορούν να εκτελούν ταυτόχρονα μεγάλο αριθμό εξετάσεων.
- ▶ Επεξεργάζονται τα αποτελέσματα και σε περίπτωση ακραίων τιμών (πολύ υψηλών ή πολύ χαμηλών) ενημερώνουν το χρήστη για επανέλεγχο. Σε μερικές περιπτώσεις προχωρούν αυτόματα σε διαδοχικές αραιώσεις του δείγματος.
- ▶ Ελέγχουν με εσωτερικά συστήματα την καλή λειτουργία του λογισμικού αλλά και των μηχανικών τμημάτων και δίνουν οδηγίες, μέσω οθόνης στο χρήστη για επιδιόρθωση βλαβών.
- ▶ Διακόπτουν την προγραμματισμένη λειτουργία τους για να ελέγξουν επείγοντα δείγματα.
- ▶ Επεξεργάζονται στατιστικά τα αποτελέσματα.
- ▶ Εκτυπώνουν τα αποτελέσματα ανά ασθενή ή ανά εξέταση σύμφωνα με τις οδηγίες που παίρνουν από το χρήστη.
- ▶ Μεταφέρουν τα αποτελέσματα μέσω κεντρικού δικτύου Η/Υ στις Κλινικές ή τις Διοικητικές Υπηρεσίες του Νοσοκομείου.
- ▶ Ελαχιστοποιούν την πιθανότητα σφάλματος αντιγραφής του ονόματος ή εκτέλεσης άλλων εξετάσεων από αυτές που απαιτούνται, μέσω της χρήσης bar – code.



2.11 Αυτόματος βιοχημικός αναλυτής

Οι κυριότεροι τύποι αυτόματων αναλυτών είναι οι **φυγοκεντρικοί αναλυτές** με ταχύτητα

περίπου 500 αποτελεσμάτων την ώρα, οι **επιτραπέζιοι μονοκάναλοι ή πολυκάναλοι αναλυτές** με ταχύτητα περίπου 1000-1500 αποτελεσμάτων την ώρα και οι **αναλυτές τυχαίας προσπέλασης**, οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να ελέγχουν κάθε δείγμα για τις αιτούμενες εξετάσεις μόνο και μπορούν να ελέγχουν περίπου 500 δείγματα την ώρα.

Ιδιαίτερη προσοχή κατά τη χρήση των αυτόματων αναλυτών πρέπει να επιδεικνύεται στη σήμανση των δειγμάτων, στην προπαρασκευή των αντιδραστηρίων, στη δημιουργία λίστας εργασίας με τις εντολές για κάθε δείγμα, στην επίβλεψη για την εμφάνιση βλαβών, στη συνεχή παρακολούθηση για την επάρκεια αντιδραστηρίων και αναλωσίμων, στην απομάκρυνση των αποβλήτων και τέλος στην καθημερινή και εβδομαδιαία συντήρηση του μηχανήματος.

## ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ ΑΥΤΟΜΑΤΩΝ ΑΝΑΛΥΤΩΝ

Οι αυτόματοι αναλυτές στηρίζουν τη λειτουργία τους σε τέσσερις κυρίως αρχές:

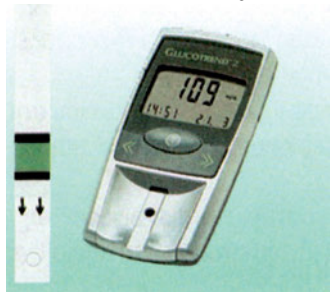
**Οι αναλυτές συνεχούς ροής** με τη βοήθεια μιας αντλίας προωθούν τα δείγματα και τα αντιδραστήρια στο εσωτερικό του αναλυτή όπου υπάρχει ένα δίκτυο επεξεργασίας των δειγμάτων, ένα όργανο ανίχνευσης των προϊόντων των χημικών αντιδράσεων και ένα καταγραφικό όργανο. Τα δείγματα διαχωρίζονται μεταξύ τους με παρεμβολή φυσαλίδων αέρα.



2.12 Αυτόματος αναλυτής

**Οι αναλυτές ασυνεχούς ροής** χρησιμοποιούν κυψελίδες για κάθε δείγμα και λειτουργούν σε θερμοστατούμενο περιβάλλον. Οι αναλυτές αυτοί επεξεργάζονται κάθε δείγμα ξεχωριστά, μιμούμενοι τους ανθρώπινους χειρισμούς.

**Οι φυγοκεντρικοί αναλυτές** χρησιμοποιούν έναν ρότορα και μια φυγοκεντρική κεφαλή με εγκοπλώσεις που καταλήγουν σε κυψελίδες. Η ανάμιξη των αντιδραστηρίων, η θερμική εξισορρόπηση και η μέτρηση γίνονται στο σύστημα του ρότορα ο οποίος περιστρέφεται με πολύ μεγάλη ταχύτητα.



2.13 Μικροαναλυτής ξηράς χημείας και μικροταινία για προσδιορισμό γλυκόζης στο αίμα

**Οι αναλυτές ξηράς χημείας** χρησιμοποιούν μικροταινίες ή πλάκες εμποτισμένες με αντιδραστήρια. Οι αναλυτές αυτοί χρησιμοποιούν ελάχιστη ποσότητα αίματος ή άλλων βιολογικών υγρών. Αναλυτές ξηράς χημείας χρησιμοποιούνται και για επείγουσες αναλύσεις στο θάλαμο που βρίσκεται ο ασθενής (π.χ. προσδιορισμός σακχάρου ή επιβεβαίωση ομάδας αίματος πριν την έναρξη μετάγγισης).



## 2.3 ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

### 2.3.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Η αξιολόγηση του αποτελέσματος του εργαστηριακού ελέγχου είναι πολύπλοκη διαδικασία. Ο κλινικός γιατρός οφείλει να συνεκτιμήσει το οικογενειακό και ατομικό ιστορικό του ασθενούς και να γνωρίζει πολλές άλλες παραμέτρους που πιθανά επηρεάζουν τη συγκέντρωση και τη βιολογική δραστικότητα των ουσιών στα βιολογικά υγρά π.χ. αν ο άρρωστος παίρνει φαρμακευτική αγωγή.

**Η στάση του ασθενούς** κατά τη διάρκεια της αιμοληψίας και η **φυσική άσκηση** που μπορεί να έχει προηγηθεί επηρεάζουν τη συγκέντρωση ουσιών στο αίμα (π.χ. η χολερυθρίνη αυξάνεται μετά από ορθοστασία, το κάλιο μειώνεται μετά από παρατεταμένη κατά-

κλιση, η πρόσφατη σωματική αύξηση αυξάνει τα επίπεδα γλυκόζης και η συστηματική σωματική άσκηση συνδέεται με χαμηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων). Γι' αυτούς τους λόγους συνιστάται **η αιμοληψία να γίνεται το πρωί και ο ασθενής να είναι ξαπλωμένος και ξεκούραστος.**



**Η λήψη τροφής** επηρεάζει τα επίπεδα γλυκόζης, τριγλυκεριδίων και την οξεοβασική ισορροπία. Γι' αυτό συνιστάται η αιμοληψία να γίνεται όταν ο ασθενής είναι **νηστικός** για τουλάχιστον 12 ή 14 ώρες, αν ο εξεταζόμενος έχει υποστεί χολοκυστεκτομή και όταν πρόκειται να προσδιοριστούν χοληστερόλη ή τριγλυκερίδια.

**Η ημερήσια διακύμανση** επιπέδων ουσιών που παρουσιάζουν μεταβολές κατά τη διάρκεια του 24ώρου όπως η αυξητική ορμόνη και η ινσουλίνη αλλά και του σιδήρου. Γι' αυτό **η αιμοληψία πρέπει να γίνεται πάντοτε την ίδια ώρα του 24ώρου** (κατά προτίμηση **πρωί**), **ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα.**

**Το κάπνισμα**, η **χρόνια χρήση οινοπνευματωδών ποτών** και η **λήψη φαρμάκων**, ο **πυρετός**, το **μετατραυματικό ή μετεγχειρητικό shock** και η **προηγηθείσα μεταγγιση αίματος ή παραγωγών** αυτού πρέπει να λαμβάνονται υπόψη από τον κλινικό γιατρό γιατί έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν τα επίπεδα πολλών ουσιών στο αίμα.

**Η ηλικία του ασθενούς**, το **φύλο**, το **γενετικό υπόβαθρο**, η **φυλή**, η **φάση του κύκλου στις γυναίκες (ωχρινική ή θυλακική)** και **τέλος η κύηση** είναι επιπλέον παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα πολλών ουσιών στα βιολογικά υγρά.

Έτσι λοιπόν, είναι **λάθος** να αποφασίζει κανείς αν μια εργαστηριακή τιμή είναι εντός ή εκτός φυσιολογικών ορίων, αν δεν γνωρίζει το πλήρες ιστορικό του ατόμου στο οποίο έχει γίνει η εξέταση.

## 2.3.2 ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑ ΜΕΘΟΔΩΝ

Στο 1<sup>ο</sup> κεφάλαιο περιγράφηκαν τα σφάλματα που μπορούν να συμβούν κατά την προετοιμασία του δείγματος με αποτέλεσμα να οδηγήσουν σε λανθασμένο αποτέλεσμα. Στο κεφάλαιο 2.3.1 περιγράφηκαν οι παράμετροι που μπορούν να επηρεάσουν ένα εργαστηριακό αποτέλεσμα και που οφείλονται στον ασθενή. Σ' αυτό το κεφάλαιο θα περιγραφούν οι παράμετροι που πρέπει να ελέγχονται κατά τη διάρκεια του εργαστηριακού ελέγχου και που αφορούν στην αξιοπιστία της μεθόδου και στον ποιοτικό έλεγχο της εφαρμογής της μεθόδου.

## ΣΤΑΔΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΠΙΘΑΝΑ ΣΗΜΕΙΑ ΣΦΑΛΜΑΤΟΣ

Οι παράμετροι που αφορούν την αξιοπιστία της κάθε μεθόδου και οι οποίες πρέπει να εκτιμώνται πριν την εφαρμογή της είναι οι ακόλουθες:

**Ακρίβεια**, δηλαδή η τιμή που παίρνουμε από τον εργαστηριακό έλεγχο να είναι όσο το δυνατό πλησιέστερη στην αληθινή τιμή. Ο έλεγχος της ακρίβειας γίνεται με πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης (standards).

**Επαναληψιμότητα**, δηλαδή πόσο συμφωνούν μεταξύ τους τα αποτελέσματα από ένα δείγμα, όταν αυτό ελεγχθεί πολλές φορές κάτω από τις ίδιες συνθήκες και με το ίδιο αντιδραστήριο. Ο έλεγχος της επαναληψιμότητας γίνεται με επανάληψη από το ίδιο ή και διαφορετικό άτομο της εργαστηριακής εξέτασης και με εφαρμογή στατιστικών μεθόδων που αξιολογούν τη μέση τιμή ( $\bar{x}$ ), τη σταθερή απόκλιση (SD) και το συντελεστή μεταβλητότητας (CV):

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{N} \quad SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad CV = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100$$

όπου  $x$  οι τιμές των διαδοχικών μετρήσεων και  $N$  ο αριθμός των επαναλήψεων.

**Ευαισθησία**, δηλαδή η μικρότερη συγκέντρωση της προς προσδιορισμό ουσίας που μπορεί να ανιχνευθεί με τη συγκεκριμένη τεχνική.

**Ειδικότητα**, δηλαδή η ικανότητα να μετράται μόνο η προς προσδιορισμό ουσία χωρίς παρεμβολές από άλλες ουσίες με παρεμφερείς φυσικές ή χημικές ιδιότητες.

**Πρακτικότητα**, δηλαδή ο χρόνος, το κόστος και ο εξοπλισμός ανάλογα με τον αριθμό των εξετάσεων που απαιτούνται καθώς και η ασφάλεια και η εξειδίκευση των εργαζομένων.



2.14 Ακρίβεια και επαναληψιμότητα μεθόδων



Από τα ανωτέρω γίνεται σαφές ότι η επιλογή μιας εργαστηριακής μεθόδου αποτελεί ένα σύνθετο πρόβλημα στο οποίο πρέπει να συνεκτιμηθούν πολλοί παράγοντες, ώστε το αποτέλεσμα να είναι αξιόπιστο και να συνεισφέρει στην κλινική διάγνωση.

## 2.4 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Ο ποιοτικός έλεγχος έχει σαν σκοπό τον έλεγχο της ποιότητας του εξοπλισμού, των αντιδραστηρίων, των εργαστηριακών συνθηκών και την ορθή εφαρμογή των πρωτοκόλλων από τους εργαζόμενους. Με την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του ποιοτικού ελέγχου, ο υπεύθυνος του εργαστηρίου είναι σε θέση να αντιλαμβάνεται έγκαιρα τα λάθη και να προβαίνει στις κατάλληλες διορθωτικές κινήσεις, ώστε να εξασφαλίζεται η ορθή λειτουργία του εργαστηρίου.

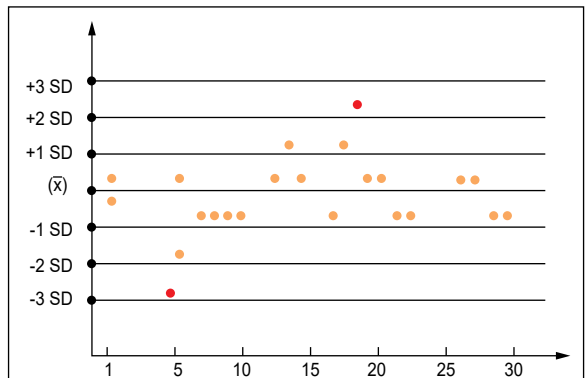
Ο ποιοτικός έλεγχος πραγματοποιείται με τη χρήση ορών ελέγχου (quality control) τους οποίους μπορεί κανείς να προμηθευτεί από το εμπόριο. Οι οροί αυτοί έχουν γνωστή συγκέντρωση σε μία ή περισσότερες ουσίες και χρησιμοποιούνται σε καθημερινή βάση στο εργαστήριο σαν εξεταστέα δείγματα.

Μετά από 20-30 μετρήσεις της ουσίας που περιέχεται στο δείγμα του ορού ποιοτικού ελέγχου κατασκευάζεται ένα διάγραμμα (Levy – Jennings) που περιλαμβάνει τις ακόλουθες τιμές:

- 1)  $(\bar{x})$ , η μέση τιμή των μετρήσεων
- 2) SD, η σταθερή απόκλιση

Στη συνέχεια, σε καθημερινή βάση, τοποθετείται στο διάγραμμα η τιμή που προσδιορίζεται για τη συγκεκριμένη ουσία στο δείγμα ποιοτικού ελέγχου. Μελέτη του διαγράμματος δίνει πληροφορίες για τα πιθανά σφάλματα. Όταν η τιμή του δείγματος είναι  $>2SD$  ή  $<2SD$  τότε όλη η ανάλυση της ημέρας, όσα δείγματα και αν έχουν ελεγχθεί, πρέπει να επαναληφθεί γιατί θεωρείται αναξιόπιστη.

Οι οροί ελέγχου διατίθενται συνήθως σε υγρή μορφή. Κάποιοι κατασκευαστές διαθέτουν τους ορούς σε λυοφιλοποιημένη μορφή οπότε πρέπει να ανασυσταθούν με κατάλληλο διαλύτη (συνήθως απιονισμένο  $H_2O$ ). Ο ορός ελέγχου πρέπει να συντηρείται σε θερμοκρασία  $4\text{ }^\circ\text{C}$  ή  $20\text{ }^\circ\text{C}$  ανάλογα με τις οδηγίες χρήσης και να αναδεύεται καλά πριν τη χρήση ώστε να αποφεύγεται πιθανή καταβύθιση κάποιων συστατικών.



2.15 Διάγραμμα Levy- Jennings.

Οι τιμές πάνω από  $+2\text{ SD}$  και κάτω από  $-2\text{ SD}$  απορρίπτονται.

Τα τελευταία χρόνια μεγάλοι κρατικοί ή ιδιωτικοί φορείς προμηθεύουν σε συμβεβλημένα με αυτούς εργαστήρια ορούς με άγνωστης συγκέντρωσης ουσίες. Πρόκειται για μεγάλες ποσότητες ορού που συνήθως παρασκευάζονται από δεξαμενές πολλών ορών (pool) και με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η ομοιότητα και η επάρκεια των δειγμάτων στα επιμέρους εργαστήρια. Τα εργαστήρια ελέγχουν τα άγνωστα δείγματα σε τακτά χρονικά διαστήματα και αποστέλλουν τα αποτελέσματα στον προμηθευτή. Εκεί τα δεδομένα επεξεργάζονται και τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα όλων των εργαστηρίων αποστέλλονται στα επιμέρους εργαστήρια. Με αυτό τον τρόπο το κάθε εργαστήριο μπορεί να αξιολογήσει τα αποτελέσματά του σε σχέση με τον μέσο όρο όλων των υπολοίπων. Για την τήρηση του απορρήτου, ο κατασκευαστής στέλνει σε κάθε εργαστήριο παράλληλα με τα δικά του αποτελέσματα και τα αποτελέσματα των άλλων εργαστηρίων με κωδικούς αριθμούς αναφορικά με την προέλευσή τους. Έτσι, το κάθε εργαστήριο γνωρίζει όχι μόνο την απόδοσή του σε κάθε χρονική στιγμή αλλά και σε σχέση με τα υπόλοιπα που παίρνουν μέρος στην Πολυκεντρική Μελέτη.

## 2.5 ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι **«φυσιολογικές τιμές»** είναι ένα εύρος τιμών που παρατηρούνται κατά τον εργαστηριακό έλεγχο μιας παραμέτρου (ουσίας) σε υγιή άτομα. Όπως είδαμε όμως στο κεφάλαιο 2.3.1 οι τιμές αυτές εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες (π.χ. φύλο, φυλή, ηλικία). Έτσι δημιουργήθηκε η ανάγκη ορισμού ενός νέου μεγέθους που θα περιγράφει τις τιμές που καταγράφονται σε συγκεκριμένες πληθυσμιακές ομάδες και που ορίζεται σαν **«τιμές αναφοράς»**.

Ο όρος **«φυσιολογικές τιμές»** που χρησιμοποιείται εδώ και χρόνια τείνει πλέον να αντικατασταθεί με τον όρο **«τιμές αναφοράς»**. Οι τιμές αναφοράς χρησιμοποιούνται για να αξιολογηθεί το αποτέλεσμα του εργαστηριακού ελέγχου ενός ατόμου σε σχέση με το αποτέλεσμα που θα περιμέναμε αν ο εξεταζόμενος ήταν υγιής.

Για να προσδιοριστούν οι τιμές αναφοράς κάθε εργαστηριακού προσδιορισμού τηρούνται αυστηρά κριτήρια. Κάθε εργαστήριο οφείλει να δημιουργεί τις δικές του τιμές αναφοράς οι οποίες δεν ταυτίζονται πάντα με αυτές που προτείνει ο κατασκευαστής του σετ (kit) ή με αυτές που αναγράφονται στη βιβλιογραφία.

Για τη δημιουργία τιμών αναφοράς υγιούς πληθυσμού πρέπει να πληρούνται οι εξής προϋποθέσεις:

- 1) Έλεγχος μεγάλου αριθμού δειγμάτων (συνήθως >100).
- 2) Αποκλεισμός ατόμων που ανήκουν σε ειδικές ομάδες (υπέρβαροι, υπερτασικοί, καπνιστές, γυναίκες σε εγκυμοσύνη).
- 3) Αποκλεισμός ατόμων που βρίσκονται υπό φαρμακευτική αγωγή (αντισυλληπτικά, αντιβιοτικά, αντιεπιληπτικά).

- 4) Προτυπομένη (τυποποιημένη) αιμοληψία (προετοιμασία ατόμων, στάση σώματος κ.λπ.).
- 5) Προτυπομένη (τυποποιημένη) εργαστηριακή μέθοδος.
- 6) Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Μετά το πέρας της στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων καταλήγουμε στον υπολογισμό των τιμών αναφοράς που είναι ειδικές για κάθε εργαστήριο και αναφέρονται σε συγκεκριμένες ομάδες πληθυσμού (π.χ. οι τιμές αναφοράς γαλακτικού οξέος είναι διαφορετικές για τον γενικό πληθυσμό και για τους χρόνια ασκούμενους αθλητές). Το εύρος των τιμών αναφοράς υπολογίζεται από τη μέση τιμή των μετρήσεων των δειγμάτων και τη σταθερή απόκλιση SD και είναι μεταξύ των τιμών ( $\bar{x}$ -2 SD) και ( $\bar{x}$ +2 SD).

ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΛΑΪΚΟ ΤΜΗΜΑ ΠΥΡΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ	
ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΨΗΣ ΑΙΜΑΤΟΣ: ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ Τ.Ε.Ρ.:	
ΟΡΜΟΝΕΣ	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ
Testosterone	ΓΥΝΑΙΚΕΣ: 0,1-0,8 ng/ml
Free Testosterone	ΓΥΝΑΙΚΕΣ: 0,29-3,18 pg/ml
SHBG	ΓΥΝΑΙΚΕΣ: 39-77 nmol/L
A4 A	ΓΥΝΑΙΚΕΣ: 0,21-3,68 ng/ml
DHEA-S	ΓΥΝΑΙΚΕΣ: 195-507 µg/dl
17-OH-Progesterone	ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗ ΦΑΣΗ: 0,4-1,02 ng/ml ΓΟΡΡΗΣΙΑ: 1,26-4,28 ng/ml
	ΓΧΡΠΝΙΚΗ ΦΑΣΗ:
LH	ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗ ΦΑΣΗ: 0,8-13 mIU/ml ΓΟΡΡΗΣΙΑ: 9,9-90 mIU/ml ΓΧΡΠΝΙΚΗ ΦΑΣΗ: 0,7-12 mIU/ml
FSH	ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗ ΦΑΣΗ: 2-13 mIU/ml ΓΟΡΡΗΣΙΑ: 6-43,5 mIU/ml ΓΧΡΠΝΙΚΗ ΦΑΣΗ: 0,8-13,9 mIU/ml
E2	ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗ ΦΑΣΗ: 30-80 pg/ml ΓΟΡΡΗΣΙΑ: 150-250 pg/ml ΓΧΡΠΝΙΚΗ ΦΑΣΗ: 60-150 pg/ml
Prolactin	ΓΥΝΑΙΚΕΣ: 2,7-19,7 ng/ml
Cortisol	ΠΗΛ: 5-25 µg/ml ΑΡΑΔΥ: 3-12 µg/ml
Insulin	2-25 µIU/ml
TSH	0,4-3,1 µIU/ml
T4	5-12 µg/dl
T3	90-190 ng/dl
FT4	0,73-2,01 ng/ml
FT3	1,5-5 pg/ml

H Διευθύντρια

2.16 Έντυπο αποτελεσμάτων

## 2.6 ΕΚΦΡΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για την έκφραση των αποτελεσμάτων είναι απαραίτητη η γνώση των βασικών μονάδων μάζας και όγκου και των υποδιαιρέσεών τους.

### ΜΟΝΑΔΕΣ ΜΑΖΑΣ

ΜΟΝΑΔΑ	ΣΥΜΒΟΛΟ	ΟΡΙΣΜΟΣ
Χιλιόγραμμο	kg	
Γραμμάριο	g	$10^{-3}$ kg
Χιλιοστογραμμάριο ή μιλλιγκράμ	mg	$10^{-6}$ kg ή $10^{-3}$ g
Μικρογραμμάριο ή μικρογκράμ	µg	$10^{-9}$ kg ή $10^{-6}$ g
Νανογραμμάριο ή νανογκράμ	ng	$10^{-12}$ kg ή $10^{-9}$ g
Πικογραμμάριο ή πικογκράμ	pg	$10^{-15}$ kg ή $10^{-12}$ g

## ΜΟΝΑΔΕΣ ΟΓΚΟΥ

ΜΟΝΑΔΑ	ΣΥΜΒΟΛΟ	ΟΡΙΣΜΟΣ
Λίτρο	L	
Δεκατόλιτρο	dL	10 <sup>-1</sup> L
Χιλιοστόλιτρο	mL	10 <sup>-3</sup> L
Μικρόλιτρο	μL	10 <sup>-6</sup> L
Νανόλιτρο	nL	10 <sup>-9</sup> L
Πικόλιτρο	pL	10 <sup>-12</sup> L

Η περιεκτικότητα μιας ουσίας σε ένα βιολογικό υγρό περιγράφεται συνήθως με τη συγκέντρωσή της στο υγρό αυτό, δηλαδή με το ποσό μάζας της ουσίας που είναι διαλυμένο στη μονάδα του όγκου. Οι συνηθέστερες μονάδες είναι mg/dL, ng/dL, g/dL, μg/dL κ.λπ.

Σε μερικές περιπτώσεις η συγκέντρωση αναφέρεται σε Διεθνείς μονάδες ανά μονάδα όγκου (π.χ. I.U./mL). Αυτό συμβαίνει συνήθως όταν δεν μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα το ποσόν της ουσίας αλλά μετράται έμμεσα η βιολογική της δραστικότητα (π.χ. ένζυμα). Η Διεθνής μονάδα ορίζεται αυθαίρετα σαν το ποσόν του υποστρώματος που καταναλώνεται στη μονάδα του χρόνου.

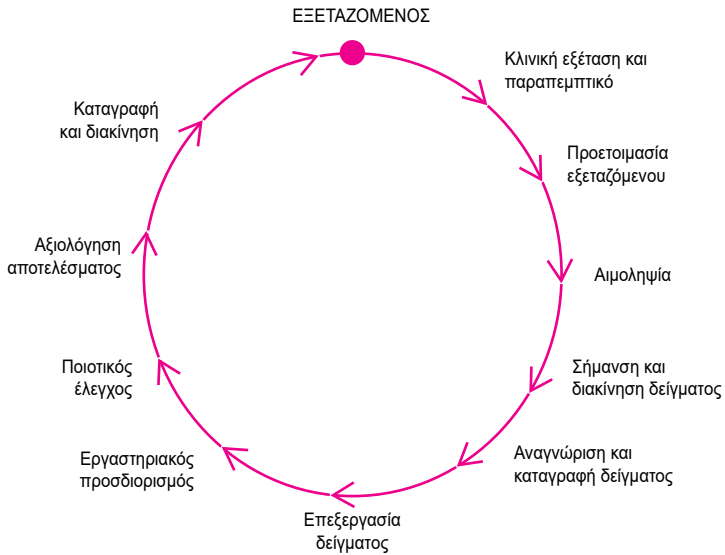
Η συγκέντρωση μιας ουσίας μπορεί ακόμα να εκφράζεται και σαν μοριακότητα δηλαδή ο αριθμός των γραμμομορίων της ουσίας που είναι διαλυμένα σε 1L διαλύματος.

$$1 \text{ M} = 1 \text{ mol/L} = \text{MB}(\text{σε g}) / \text{L}.$$

Η σχέση μεταξύ συγκέντρωσης σε mg/dL δηλαδή mg/100mL ή mg% και μοριακότητας δίνεται από τον τύπο:  $\text{mmol/L} = \frac{\text{mg/dL} \times 10}{\text{M.B.}}$

Η συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών εκφράζεται σε γραμμοϊσοδύναμα ανά λίτρο (mEq/L)

Κατά την έκφραση των αποτελεσμάτων είναι σημαντικό να χρησιμοποιούνται πάντοτε οι ίδιες μονάδες στο προς εξέταση δείγμα και στις τιμές αναφοράς, ώστε να γίνεται εύκολα η σύγκρισή τους. Για παράδειγμα, αν ένα δείγμα έχει τιμή οξαλοξικής τρανσαμινάσης (SGOT) 30 U/dL και οι τιμές αναφοράς της SGOT είναι 10-40 U/L είναι πολύ εύκολο το δείγμα να παρερμηνευθεί σαν φυσιολογικό. Αντίθετα, αν εκφραστεί στις ίδιες μονάδες με τις τιμές αναφοράς, δηλαδή σε U/L τότε η τιμή του δείγματος θα είναι 300 U/L, δηλαδή θα γίνει εμφανές ότι το δείγμα έχει πολύ υψηλή τιμή.



2.17 Η διαδικασία μιας εργαστηριακής εξέτασης

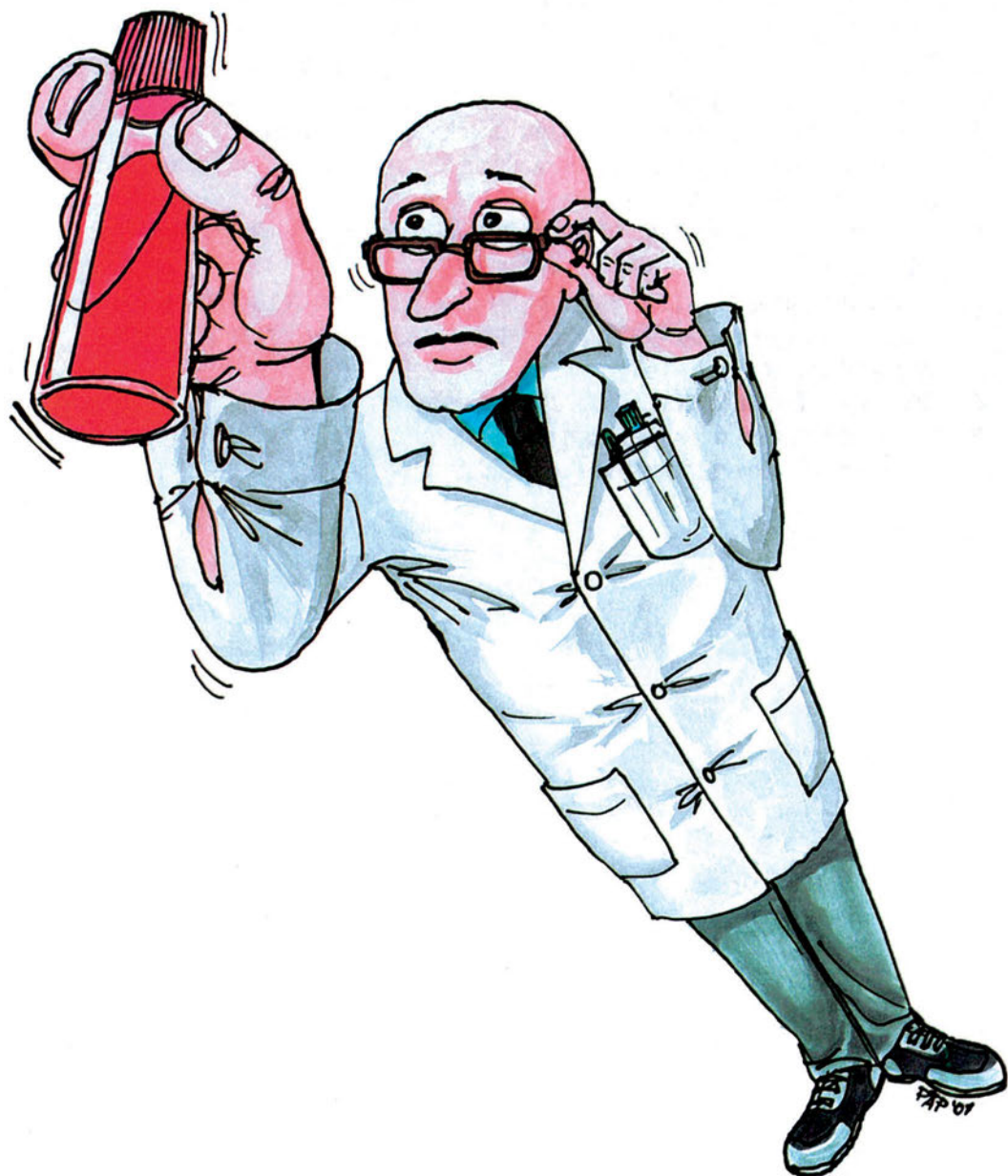
## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### ΝΑ ΜΗΝ ΞΕΧΝΩ

- Κατά τη φυγοκέντρηση ισοζυγίζω τα σωληνάκια και αν χρειάζεται χρησιμοποιώ αντίβαρο.
- Κατά τη φωτομέτρηση χρησιμοποιώ πάντοτε τυφλό δείγμα και φροντίζω την απόλυτη καθαριότητα της κυψελίδας.
- Οι αυτόματοι αναλυτές είναι «πολύ έξυπνα» αλλά και συγχρόνως «πολύ ανόητα» μηχανήματα. Πρέπει να τα χρησιμοποιώ τηρώντας απόλυτα τα πρωτόκολλα χρήσης.
- Προσέχω τις μονάδες μέτρησης, όταν καταγράφω αποτελέσματα.
- Δεν ερμηνεύω τα αποτελέσματα των εξετάσεων. Αυτό είναι ευθύνη του κλινικού ιατρού ο οποίος έχει την πλήρη εικόνα και το ιστορικό του εξεταζόμενου.

**ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ**

1. Ποιες είναι οι κυριότερες μέθοδοι διαχωρισμού που χρησιμοποιούνται στα εργαστήρια Κλινικής Βιοχημείας. Ποιον σκοπό εξυπηρετούν;
2. Περιγράψτε τα μέρη από τα οποία αποτελείται ένα φασματοφωτόμετρο και τη λειτουργία του μονοχρωμάτορα.
3. Ποια είναι τα πλεονεκτήματα της χρήσης των αυτόματων αναλυτών;
4. Περιγράψτε τους κυριότερους βιολογικούς παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα μιας ουσίας στα βιολογικά υγρά.
5. Τι ονομάζουμε επαναληψιμότητα μιας μεθόδου και ποια η διαφορά της από την ακρίβεια;
6. Ποια είναι η χρησιμότητα του εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου στα εργαστήρια;
7. Ποια είναι η αρχή της μεθόδου της χρωματογραφίας; Αναφέρετε τα κυριότερα είδη χρωματογραφίας.
8. Πώς υπολογίζεται η μέση τιμή και η σταθερή απόκλιση;
9. Πώς τοποθετούνται τα δείγματα στη φυγόκεντρο;
10. Αναφέρετε τις κυριότερες εφαρμογές της ηλεκτροφόρησης.





## 3.1 ΓΛΥΚΟΖΗ

### ΓΕΝΙΚΑ-ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Η κυριότερη πηγή ενέργειας για όλες τις λειτουργίες του οργανισμού είναι οι υδατάνθρακες, κυρίως η γλυκόζη που κυκλοφορεί στο αίμα. Τη γλυκόζη την προσλαμβάνουμε από τους υδατάνθρακες της τροφής. Το άμυλο και σε μικρότερα ποσά το γλυκογόνο και οι δισακχαρίτες σουκρόζη και λακτόζη, είναι κυρίως οι υδατάνθρακες της τροφής του ανθρώπου, που μπορούν να διασπαστούν ενζυμικά στο έντερο και στη συνέχεια να απορροφηθούν ως μονοσακχαρίτες. Ακόμα γλυκόζη μπορεί να παραχθεί κυρίως στο ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό στους νεφρούς και στο επιθήλιο του εντερικού βλεννογόνου με το δρόμο της γλυκονεογένεσης και να μεταφερθεί από εκεί με το αίμα στα κύτταρα άλλων ιστών.

*Γλυκονεογένεση* είναι η σύνθεση γλυκόζης από ενώσεις που δεν είναι υδατάνθρακες. Τέτοιες ενώσεις είναι αυτές του κύκλου του Krebs, το πυρουβικό (ή πυροσταφυλικό) και κυρίως το γαλακτικό οξύ, τα περισσότερα αμινοξέα και η γλυκερόλη. Όταν με την τροφή μας παίρνουμε ποσά γλυκόζης μεγαλύτερα από τις άμεσες ενεργειακές μας ανάγκες, τότε η περίσσειά της εναποθηκεύεται στα κύτταρα (κυρίως στο ήπαρ και τους μύς) ως γλυκογόνο (*γλυκογονογένεση*). Η εναποθηκευμένη αυτή γλυκόζη κινητοποιείται με *γλυκογονόλυση*, όταν υπάρχει ανάγκη. Ακόμα η γλυκόζη σε περίσσειά της μπορεί να μετατραπεί σε λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα, τα οποία εναποθηκεύονται ως τριακυλογλυκερόλες, μπορούν να κινητοποιηθούν με λιπόλυση και να χρησιμοποιηθούν ως καύσιμα μόρια.

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η διατήρηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης του αίματος μέσα σε σχετικά περιορισμένα φυσιολογικά όρια, παρ' όλο που πολλοί παράγοντες τείνουν να την διαταράξουν, αποτελεί παράδειγμα ομοιοστατικής ρύθμισης.

Οι κύριες ορμόνες που επιδρούν στο μεταβολισμό των υδατανθράκων και στην ομοιοστάση της γλυκόζης είναι από τη μια μεριά η ινσουλίνη, που είναι υπογλυκαιμικός παράγοντας (δηλαδή προκαλεί ελάττωση του ποσού της γλυκόζης στο αίμα), και από την άλλη μεριά το γλουκαγόνο ή γλυκαγόνη, η αδρεναλίνη, η θυροξίνη, η κορτικοτροπίνη, τα γλυκοκορτικοειδή και η αυξητική ορμόνη ή σωματοτροπίνη που είναι υπεργλυκαιμικοί παράγοντες (δηλαδή προκαλούν αύξηση του ποσού της γλυκόζης στο αίμα).

*Η συγκέντρωση* της γλυκόζης στο *ανθρώπινο αίμα* 8-12 ώρες μετά από ένα γεύμα κυμαίνεται μεταξύ 60-100 mg/dL και συνήθως μεταξύ 70-90 mg/dL. Η συγκέντρωσή της είναι μεγαλύτερη λίγο αμέσως μετά το φαγητό, ενώ νηστεία ακόμη και ημερών δεν προκαλεί αισθητή πτώση της.



## ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Επαρκή ποσά ινσουλίνης από τα β κύτταρα των νησιδίων του Langerhans στο πάγκρεας είναι απαραίτητα για την είσοδο της γλυκόζης στα κύτταρα των ιστών του σώματος και τη χρησιμοποίησή της ως καύσιμου στο μεταβολισμό. Ανεπαρκή ή μη δραστικά ποσά ινσουλίνης στερούν τα κύτταρα από την ενεργειακή τους πηγή, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του επιπέδου της γλυκόζης στο αίμα.

Αύξηση του επιπέδου της γλυκόζης στο αίμα προκύπτει επίσης από αυξημένη έκκριση άλλων ορμονών, όπως είναι το γλουκαγόνο (ή γλυκαγόνη), η αδρεναλίνη, η κορτικοτροπίνη, τα γλυκοκορτικοειδή, η αυξητική ορμόνη (ή σωματοτροπίνη) και η θυροξίνη.



## Υπογλυκαιμία-Υπεργλυκαιμία-Διαβήτης

Επίπεδα γλυκόζης υψηλότερα από τα φυσιολογικά όρια χαρακτηρίζονται ως υπεργλυκαιμικά, ενώ επίπεδα κάτω από τα φυσιολογικά όρια χαρακτηρίζονται ως υπογλυκαιμικά. Τιμές γλυκόζης κάτω από 60-65 mg/dL, όταν το άτομο είναι νηστικό, θεωρούνται υπογλυκαιμικές. Η υπογλυκαιμία είναι μια ένδειξη ότι ένας ή περισσότεροι από τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς της ομοιόστασης της γλυκόζης δεν λειτουργούν καλά.

Τιμές αναφοράς (Φυσιολογικές τιμές)		
8-12 ώρες μετά το γεύμα	60 - 100	mg/dL
Μικρή αύξηση της γλυκόζης στο αίμα	120 - 150	mg/dL
Μεγάλη αύξηση της γλυκόζης στο αίμα	200 - 300	mg/dL

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι ένα μεταβολικό νόσημα που προκαλείται από απόλυτη ή σχετική ανεπάρκεια στην έκκριση της ινσουλίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρουσιάζονται διαταραχές στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπών και στο ισοζύγιο του νερού και των ηλεκτρολυτών. Κύριο χαρακτηριστικό του σακχαρώδη διαβήτη είναι η αύξηση της γλυκόζης στο αίμα και πολλές φορές η γλυκοζουρία. Μακροχρόνιες συνέπειες του διαβήτη (χρόνιες διαβητικές επιπλοκές) είναι η νεφροπάθεια, η αμφιβληστροειδοπάθεια, η νευροπάθεια, η πρώιμη αθηροσκλήρωση και άλλες.

## ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΟΧΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

Η δοκιμασία ανοχής γλυκόζης είναι μια ευαίσθητη δοκιμασία ειδική για τον έλεγχο του μεταβολισμού των υδατανθράκων από την απάντηση της ινσουλίνης μετά από τη χορήγηση ενός φορτίου γλυκόζης στον ασθενή. Η δοκιμασία αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι σε μη

διαβητικά άτομα ένα δοκιμαστικό φορτίο γλυκόζης θα αφαιρεθεί από την κυκλοφορία του αίματος γρηγορότερα από ότι σε διαβητικούς. Καθώς η γλυκόζη απορροφάται στο αίμα, τα επίπεδά της στο αίμα υγιών ατόμων φθάνουν σε επίπεδα κορυφής 160-180 mg/dL μέσα σε 30 λεπτά έως μία ώρα μετά τη λήψη της γλυκόζης, γεγονός που προκαλεί έκκριση ινσουλίνης, και επιστρέφουν σε επίπεδα νηστείας ή χαμηλότερα μέσα σε 2-3 ώρες. Σε άτομα όμως με διαβήτη τα επίπεδα κορυφής της γλυκόζης του αίματος είναι πολύ υψηλότερα. Η επάνοδος των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα στα επίπεδα νηστείας καθυστερεί, επειδή δεν υπάρχει επαρκής απάντηση της ινσουλίνης στο ερέθισμα της γλυκόζης.

### 3.1.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

#### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΟΥ

Η πιο συνήθης εξέταση για γλυκόζη αίματος γίνεται σε ένα δείγμα αίματος που συλλέγεται το πρωί, ενώ ο ασθενής είναι **νηστικός**. Η γλυκόζη (σάκχαρο) αίματος νηστείας και η γλυκόζη (σάκχαρο) αίματος, που συλλέγεται δύο ώρες μετά από ένα πλήρες γεύμα, είναι αποτελεσματικές συνήθειες εξετάσεις ρουτίνας για την διαπίστωση του σακχαρώδους διαβήτη. Σε άτομα, που εμφανίζουν ανώμαλες τιμές σακχάρου με τις μεθόδους αυτές, πρέπει στη συνέχεια να εκτελείται μια δοκιμασία ανοχής γλυκόζης για την πληρέστερη διερεύνηση της περίπτωσης τους καθώς και η περιοδική μέτρηση της γλυκοαιμοσφαιρίνης ( $HbA_{1c}$ ), η οποία σε διαβητικούς, αποτελεί έναν εξαιρετικά χρήσιμο δείκτη για το πόσο καλή είναι η ρύθμιση της γλυκόζης του αίματος για μια μεγάλη χρονική περίοδο. Αυτό ισχύει γιατί η  $HbA_{1c}$ , εφόσον σχηματιστεί, παραμένει μέσα στο ερυθρό αιμοσφαίριο για όλο το διάστημα της ζωής του.

#### Επιπλέον πληροφορίες

- ▶ Ο εργαστηριακός προσδιορισμός της γλυκοαιμοσφαιρίνης παρέχει έναν αξιόπιστο δείκτη ελέγχου της γλυκόζης και βοηθά να εκτιμήσουμε την αποτελεσματικότητα μιας μακροχρόνιας διαιτητικής αγωγής ή θεραπείας με ινσουλίνη σε διαβητικούς.
- ▶ Οι συγκεντρώσεις της γλυκοαιμοσφαιρίνης δεν υφίστανται διακυμάνσεις από οξείες μεταβολές της συγκέντρωσης της γλυκόζης, επειδή δεν επηρεάζονται από πρόσφατη λήψη τροφών που περιέχουν υδατάνθρακες, από την άσκηση ή από αντιδιαβητικά φάρμακα.

## ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

■ A) Για τη λήψη ενός δείγματος αίματος για *γλυκόζη αίματος νηστείας* ακολουθούμε τα εξής:

- 1) Δεν επιτρέπουμε στον εξεταζόμενο να πάρει τροφές και υγρά μετά τα μεσάνυχτα και μέχρι τη λήψη αίματος το πρωί.
- 2) Δεν γίνεται ένεση ινσουλίνης στον ασθενή μέχρι τη λήψη αίματος.
- 3) Στέλνουμε το δείγμα αίματος στο εργαστήριο μέσα σε μισή ώρα από τη συλλογή του, ώστε να γίνει γρήγορα ο χωρισμός του ορού ή του πλάσματος από τα κύτταρα. Όταν το αίμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου, τα ερυθρά και λευκά αιμοσφαίρια συνεχίζουν το μεταβολισμό της γλυκόζης, με αποτέλεσμα να ελαττώνονται οι τιμές της γλυκόζης 5-7% κάθε ώρα. Μετά την αφαίρεση των κυττάρων, ο ορός ή το πλάσμα που δεν έχουν αιμολυθεί είναι σταθερά επί 8 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και επί 72 ώρες στο ψυγείο (4 °C).
- 4) Προσθέτουμε 2 mg φθοριούχου νατρίου για κάθε mL αίματος και τοποθετούμε το δείγμα σε πάγο ή στο ψυγείο, όταν το ολικό αίμα δεν μπορεί να εξεταστεί μέσα σε μία ώρα από τη συλλογή του. Η προφύλαξη αυτή εμποδίζει τη γλυκόλυση επί 48 ώρες.
- 5) Αναβάλλουμε τη συλλογή δείγματος αίματος για προσδιορισμό γλυκόζης, αν ο ασθενής έχει πάρει οποιοδήποτε φάρμακο τις προηγούμενες 24 ώρες, το οποίο μπορεί να επηρεάσει φυσιολογικά τη γλυκόζη ή να παρέμβει χημικώς σε ορισμένες δοκιμασίες.



■ B) Για τη λήψη ενός δείγματος αίματος για *γλυκόζη αίματος 2 ώρες μετά το γεύμα* ακολουθούμε τα εξής:

- 1) Χορηγούμε στον ασθενή τροφές πλούσιες σε υδατάνθρακες επί 2-3 μέρες πριν από τη δοκιμασία.
- 2) Δεν επιτρέπουμε στον ασθενή να πάρει τροφές και υγρά (εκτός από νερό) επί 8 ώρες πριν από τη δοκιμασία.
- 3) Χορηγούμε στον ασθενή 50 –100 g γλυκόζης ή ένα πρόγευμα πλούσιο σε υδατάνθρακες. Ένα πρόγευμα με χυμό πορτοκαλιού, δημητριακά με ζάχαρη, φρυγανιά με βούτυρο και γάλα παρέχει επαρκείς θερμίδες και υδατάνθρακες για μια σωστή ερμηνεία της δοκιμασίας.
- 4) Παίρνουμε ένα μόνο δείγμα αίματος για προσδιορισμό γλυκόζης ακριβώς δύο ώρες μετά τη χορήγηση της γλυκόζης ή τη λήψη του προγεύματος.
- 5) Η δοκιμασία αυτή μπορεί επίσης να εκτελεστεί μετά από ένα γεύμα πλούσιο σε υδατάνθρακες ή μετά από χορήγηση γλυκόζης κατά το μεσημέρι.

## Γ) Στα Ούρα:

Πολλές φορές ελέγχουμε τα ούρα για την παρουσία γλυκόζης. Αν η εξέταση αυτή των ούρων γίνεται για την παρακολούθηση της θεραπευτικής αγωγής με κανονική ινσουλίνη σε ένα διαβητικό 30 λεπτά πριν από τα γεύματα και κατά το χρόνο της κατάκλισης, τότε δίνουμε οδηγίες στον ασθενή να αδειάσει την ουροδόχο κύστη του 30 λεπτά πριν από τη λήψη του δείγματος των ούρων, τον ενθαρρύνουμε να πάρει υγρά και τέλος του ζητούμε να ουρήσει στον καθορισμένο χρόνο.

## ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ

Οι μέθοδοι για τον προσδιορισμό της γλυκόζης του αίματος κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες, τις **χημικές** και τις **ενζυμικές**. Αυτές μπορούν να διακριθούν σε πολλές κατηγορίες ανάλογα με το είδος της μέτρησης που χρησιμοποιείται (φωτομετρική, φθοριομετρική ή ηλεκτρομετρική) και το ενζυμικό σύστημα ή συστήματα που χρησιμοποιούνται. Σήμερα χρησιμοποιούνται οι ενζυμικές μέθοδοι.

Η σωστή αξιολόγηση των εργαστηριακών αποτελεσμάτων για τη γλυκόζη ή το σάκχαρο αίματος προϋποθέτει τη διάκριση μεταξύ αυτών των δυο όρων και τη γνώση των φυσιολογικών τιμών για την καθημιά εργαστηριακή μέθοδο που χρησιμοποιείται. Οι πιο σύγχρονες μέθοδοι είναι ειδικές για τη γλυκόζη και τα αποτελέσματα των δοκιμασιών δείχνουν την πραγματική συγκέντρωση της γλυκόζης. Ωστόσο πολλές παλιότερες χημικές μέθοδοι δεν είναι ειδικές για τη γλυκόζη, επειδή μετρούν όλες τις αναγωγικές ουσίες που βρίσκονται στο αίμα.

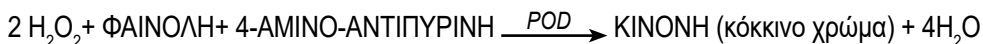
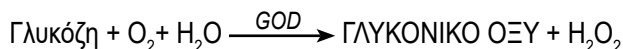
### 3.1.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΑΙΜΑΤΟΣ

(*Ενζυμική μέθοδος οξειδάσης της γλυκόζης ή μέθοδος GOD-POD*)

#### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

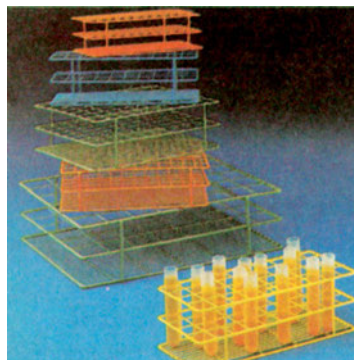
Η γλυκόζη του ορού με το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης (GOD) οξειδώνεται σε γλυκονικό οξύ και υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), το οποίο με τα κατάλληλα αντιδραστήρια και τη βοήθεια του ενζύμου υπεροξειδάση (POD) παράγει μια χρωματιστή ένωση, την κινόνη. Η ένταση του χρώματος της κινόνης (άρα και η απορρόφηση φωτός που κάνει αυτό) είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο δείγμα.

Πιο αναλυτικά, ο ενζυμικός προσδιορισμός της γλυκόζης ακολουθεί τις παρακάτω αντιδράσεις:



## ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- ▶ Σωληνάρια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- ▶ Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληναρίων.
- ▶ Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- ▶ Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέττες.
- ▶ Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- ▶ Φωτόμετρο αυτόματο.
- ▶ Υδατόλουτρο.
- ▶ Ανακινήτης σωληναρίων (Vortex).
- ▶ Parafilm.
- ▶ Γάντια και υαλογράφος.
- ▶ 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό γλυκόζης.



3.1 Στατώ σωληναρίων και σωληνάρια με αντιδραστήρια

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) με pH 7,4. Φαινόλη
2. Οξειδάση γλυκόζης, υπεροξειδάση, 4-αμινο-αντιπιρύνη.
3. Πρότυπο διάλυμα γλυκόζης: 100 mg/dL.

## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- **Ανασύσταση** αντιδραστηρίων:  
Ανακατεύουμε μια ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα (1) με το φιαλίδιο, στο οποίο βρίσκονται τα ένζυμα σε σκόνη - λυοφιλοποιημένα (2), σύμφωνα με τις οδηγίες του σετ.
- **Μετά** την ανασύσταση των αντιδραστηρίων περιορίζεται ο χρόνος «ζωής» τους. Διατηρούνται για ένα μήνα στο ψυγείο (2-8 °C). Πάντα σύμφωνα με τις οδηγίες του σετ.
- Πριν τη χρήση αφήνουμε τα αντιδραστήρια να πάρουν τη θερμοκρασία δωματίου.

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

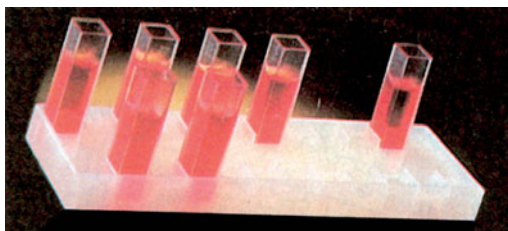
- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:

	E	St	T
<b>Αντιδραστήριο 1+2</b>	1000 μL	1000 μL	1000 μL
<b>Πρότυπο διάλυμα</b>	-	10 μL	-
<b>Ορός ή πλάσμα</b>	10 μL	-	-

όπου: E=εξεταστέο  
St=standard  
T=τυφλό

## Βασικές ουσίες στο αίμα **κεφ.3**

- Σκεπάζουμε τα σωληνάκια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινήτη.
  - Παραμονή 5' στους 37 °C (υδατόλουτρο) ή 10' στους 20-25 °C (θερμοκρασία δωματίου).
  - Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέτες.
  - Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 510 nm. Το χρώμα παραμένει σταθερό 2 ώρες.
- \*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ*



3.2 Κυβέτες με χρωματιστή ουσία για τη φωτομέτρηση

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

$$C \text{ γλυκόζης ορού σε mg / dL} = C_{(ST)} \times \frac{A_{(E)}}{A_{(ST)}}$$

### ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)

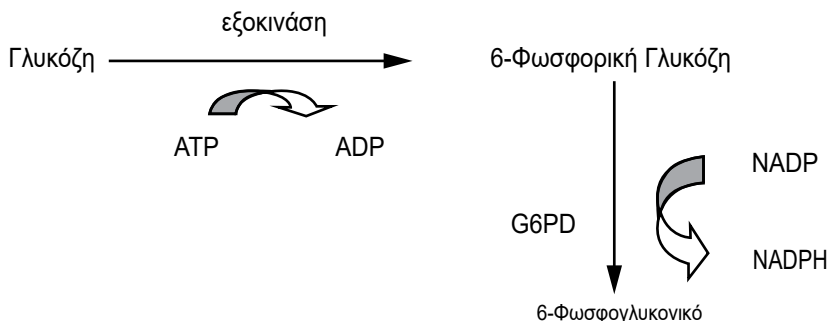
Στον ορό ή στο πλάσμα: 70- 105 mg/dL

στο ENY (Εγκεφαλονωτιαίο υγρό): 50 - 70 mg/dL

**ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ** έως 400 mg/dL

### ΑΛΛΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

Μια άλλη ενζυμική μέθοδος για τη γλυκόζη χρησιμοποιεί τα ένζυμα εξοκινάση και δεϋδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD), για να μετατρέψει τελικά τη γλυκόζη σε 6-φωσφογλυκονικό:



Το NADPH που σχηματίζεται μπορεί να μετρηθεί από την αύξηση της απορρόφησης στα 340 ή 360 nm.

## 3.2 ΛΕΥΚΩΜΑΤΑ

### ΓΕΝΙΚΑ

Ο ορός του αίματος περιέχει τουλάχιστον 100 πρωτεΐνες, οι οποίες συντίθενται στο ήπαρ και το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα και διαιρούνται σε διάφορα κλάσματα, τα οποία ταξινομούνται ως λευκωματίνη (αλβουμίνη) και σφαιρίνες (γλοβουλίνες). Οι μετρήσεις των πρωτεϊνών εκτελούνται συνήθως σε δείγματα ορού, για να αποφύγουμε τη μέτρηση του κλάσματος του ινωδογόνου, το οποίο περιέχεται στο πλάσμα του αίματος και χρησιμεύει κατά τη διάρκεια του μηχανισμού της πήξης.

### ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΠΟΣΤΟΛΗ

Οι πρωτεΐνες του πλάσματος επιτελούν πολλές ζωτικές φυσιολογικές λειτουργίες, οι οποίες είναι εντελώς διαφορετικές από εκείνες των πρωτεϊνών των ιστών και περιλαμβάνουν τα ακόλουθα:

- ▶ Παραγωγή αντισωμάτων.
- ▶ Προμήθεια παραγόντων πήξης.
- ▶ Προμήθεια πολλών ενζύμων και ορμονών.
- ▶ Διατήρηση της οσμωτικής πίεσης και του ισοζυγίου νερού μεταξύ αίματος και ιστών.
- ▶ Διατήρηση μιας παρακαταθήκης για την ανάπτυξη των ιστών και την αποκατάσταση βλαβών.
- ▶ Χρησιμοποίηση ως πρόδρομων ουσιών για τη σύνθεση των πρωτεϊνών των ιστών και ως μιας πηγής γρήγορης αντικατάστασης ιστών κατά τη διάρκεια απώλειας ιστών.
- ▶ Χρησιμοποίηση ως ρυθμιστικών διαλυμάτων του pH για την οξεοβασική ισορροπία.
- ▶ Μεταφορά άλλων συστατικών του αίματος, όπως είναι η χολερυθρίνη, το ασβέστιο, ορισμένα ένζυμα, οι στεροειδείς και οι θυροειδικές ορμόνες, τα λιπίδια, τα μέταλλα, το οξυγόνο και οι βιταμίνες.
- ▶ Συμβολή στις ανάγκες του οργανισμού για αζωτούχες ουσίες.

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

**Η λευκωματίνη**, το πιο μικρό από τα πρωτεϊνικά μόρια, παίζει ένα σπουδαίο ρόλο στη ρύθμιση της οσμωτικής πίεσης του πλάσματος σταθεροποιώντας τον όγκο του αίματος και ελέγχοντας την κατανομή του νερού μεταξύ αίματος και ιστών που γίνεται δια μέσου του τοιχώματος των τριχοειδών αγγείων. Ακόμα βοηθά στη μεταφορά ζωτικών φυσιολογικών ουσιών, οι οποίες είναι αδιάλυτες στο νερό.

**Οι σφαιρίνες**, είναι μια οικογένεια μη συγγενών από χημική άποψη πρωτεϊνών. Οι σφαιρίνες του ορού είναι ζωτικές στο ανοσολογικό αμυντικό σύστημα, στη διατήρηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης και του σιδήρου και στη μεταφορά ειδικών ορμονών και λιπιδίων.



## Βασικές ουσίες στο αίμα **κεφ.3**

Επίσης τα μόρια των σφαιρινών βοηθούν στη διατήρηση της ωσμωτικής πίεσης του αίματος.

Οι **τιμές αναφοράς** (φυσιολογικές τιμές) για τις ολικές πρωτεΐνες, τη λευκωματίνη, τις σφαιρίνες και τη σχέση Λ/Σ είναι οι ακόλουθες:

Ολικές πρωτεΐνες = Λευκωματίνη + Σφαιρίνες		
<b>Ολικές πρωτεΐνες</b>		
<i>Παιδιά</i>	<b>4,7 - 7,4</b>	<b>g/dL</b>
<i>Ενήλικοι</i>	<b>6,0 - 8,3</b>	<b>g/dL</b>
<b>Λευκωματίνη</b>	<b>3,5 - 5,5</b>	<b>g/dL</b>
<b>Σφαιρίνες</b>	<b>1,5 - 3,7</b>	<b>g/dL</b>
<b>Σχέση Λευκωματίνης/Σφαιρινών (Λ/Σ) = 1,5:1 – 2,5:1 Μέσος Όρος 2:1</b>		

### ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Οι τιμές των ολικών πρωτεϊνών αντιπροσωπεύουν τις πραγματικές συγκεντρώσεις στο πλάσμα, όταν τα υγρά του σώματος και οι ηλεκτρολύτες είναι σε ισορροπία, ενώ η υδατική δηλητηρίαση έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση των επιπέδων των ολικών πρωτεϊνών, που οφείλεται σε απλή αραίωση. Αντίθετα, στην αφυδάτωση η απώλεια του νερού του πλάσματος έχει ως αποτέλεσμα μια σχετική αύξηση στη συγκέντρωση όλων των πρωτεϊνικών κλασμάτων και έτσι οι τιμές των ολικών πρωτεϊνών είναι μεγαλύτερες από τις φυσιολογικές.

Σημαντικά ελαττωμένα επίπεδα λευκωματίνης συχνά υποδηλώνουν σοβαρές παθήσεις του ήπατος, οι οποίες ελαττώνουν τη σύνθεση της λευκωματίνης, παθολογική απώλεια λευκωματίνης από τους νεφρούς ή το γαστρεντερικό σύστημα και οποιαδήποτε νόσο που μεταβάλλει τη σύσταση των πρωτεϊνών. Οποιαδήποτε μεγάλη απώλεια λευκωματίνης από την κυκλοφορία του αίματος ελαττώνει την πυκνότητα του αίματος, με αποτέλεσμα το νερό να ρέει προς τους ιστούς και να δημιουργείται οίδημα.

Οι τιμές των ολικών σφαιρινών είναι τόσο γενικές, ώστε ελαφρές ανωμαλίες σε οποιοδήποτε από τα κλάσματα μπορεί να περάσουν απαρατήρητες, ενώ μια ελάττωση σε ένα κλάσμα μπορεί να αντισταθμιστεί από μια αύξηση σε ένα άλλο κλάσμα και έτσι να μη γίνει αντιληπτή. Αυξημένα επίπεδα σφαιρινών στον ορό (υπερσφαιριναιμία) παρατηρούνται σε πάθηση του συνδετικού ιστού, αιμοσυμπύκνωση, αφυδάτωση, ηπατικό καρκίνωμα, ηπατίτιδα, λευχαιμία, ρευματοειδή αρθρίτιδα κ.α. Ελαττωμένα επίπεδα των σφαιρινών στον

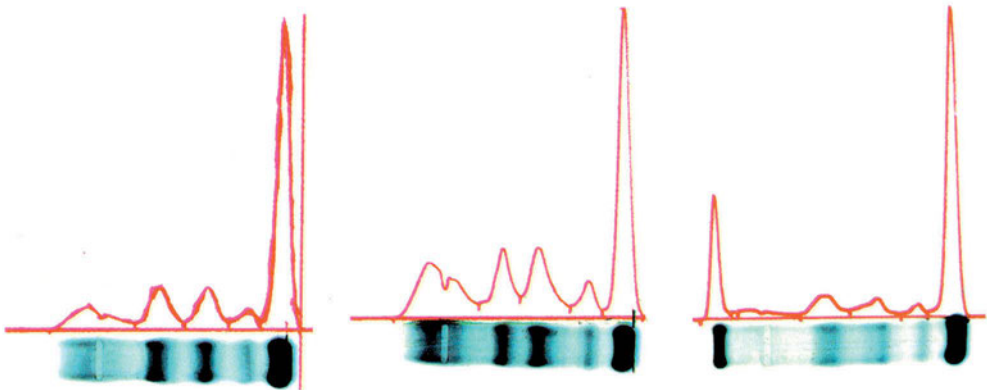
ορό (υποσφαιριναιμία) παρατηρούνται σε υδατική δηλητηρίαση, βαριά εγκαύματα, αγαμμασφαιριναιμία κ.α.

### ΕΙΔΗ ΛΕΥΚΩΜΑΤΩΝ

Με την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, που εφαρμόστηκε πρώτα από τον Tiselius, οι πρωτεΐνες του ορού διαχωρίζονται σε πέντε κύρια κλάσματα.

Ονομασία:

Λευκωματίνη (αλβουμίνη)  
 α1-σφαιρίνες  
 α2-σφαιρίνες  
 β-σφαιρίνες  
 γ-σφαιρίνες



3.3. Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση. Η 1η ταινία δείχνει μια ηλεκτροφόρηση φυσιολογικού ορού. Στη 2η και την 3η το αποτέλεσμα είναι παθολογικό. Η λωρίδα με το εντονότερο χρώμα είναι της λευκωματίνης. Ακολουθούν οι λωρίδες των σφαιρινών (α1, α2, β, γ).

Σήμερα χρησιμοποιούνται οι πιο εύχρηστες τεχνικές της ηλεκτροφόρησης ζώνης σε οξική κυτταρίνη για το διαχωρισμό και τη μέτρηση των παραπάνω κλασμάτων. Τα διάφορα κλάσματα των σφαιρινών περιέχουν περισσότερες από μία πρωτεΐνες.

Από λειτουργική άποψη οι πρωτεΐνες του πλάσματος διακρίνονται σε *πρωτεΐνες μεταφοράς*, *ανοσοσφαιρίνες*, *πρωτεΐνες αναστολείς πρωτεασών*, *πρωτεΐνες οξείας φάσης* που αυξάνονται πολύ, όταν βλάβη ιστών ή λοίμωξη οδηγεί σε τοπική φλεγμονή, και ένζυμα.

Οι ανοσοσφαιρίνες (Ig), οι οποίες παράγονται από τα Β-λεμφοκύτταρα και τα πλασματοκύτταρα, είναι μία ομάδα γ-σφαιρινών που είναι συγγενείς από λειτουργική και χημική άποψη και λειτουργούν ως αντισώματα.

## 3.2.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΛΕΥΚΩΜΑΤΩΝ

### ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ-ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Οι προσδιορισμοί των ολικών πρωτεϊνών και της λευκωματινής εκτελούνται γενικά ταυτόχρονα στο ίδιο δείγμα ορού. Οι τιμές των σφαιρινών στον **ορό** υπολογίζονται αφαιρώντας την τιμή της λευκωματινής από την τιμή των ολικών πρωτεϊνών (ολικές πρωτεΐνες – λευκωματινή = σφαιρίνες). Ένας πιο ειδικός προσδιορισμός των πρωτεϊνικών κλασμάτων γίνεται με ηλεκτροφόρηση και ανοσοηλεκτροφόρηση του ορού. Τα δείγματα του ορού για προσδιορισμούς των πρωτεϊνών παραμένουν σταθερά τουλάχιστο μία εβδομάδα, όταν διατηρούνται σε θερμοκρασία ψυγείου.

Για να εξασφαλίσουμε ένα κατάλληλο δείγμα ορού για αξιόπιστους προσδιορισμούς των πρωτεϊνών, ενεργούμε ως εξής:

- 1) Ελέγχουμε αν το αίμα του ασθενή περιέχει ουσίες, οι οποίες παρεμβαίνουν στις εργαστηριακές δοκιμασίες και δίνουν ανακριβή αποτελέσματα. Οι τιμές των πρωτεϊνών στον ορό είναι ψευδώς αυξημένες, όταν υπάρχει στο δείγμα του ορού η χρωστική βρωμοσουλφοφθαλείνη (BSP), που χρησιμοποιείται στη μελέτη της ηπατικής λειτουργίας (η οποία σήμερα έχει εγκαταλειφθεί), η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη, η χολερυθρίνη και άλλες χρωστικές, καθώς και η θολερότητα από λιπαιμικούς ορούς.
- 2) Συλλέγουμε το δείγμα του αίματος πριν από τη χορήγηση στον ασθενή ενός γεύματος με πολλά λίπη.
- 3) Αποφεύγουμε την αιμόλυση κατά τη συλλογή και μεταφορά του δείγματος στο εργαστήριο.

## 3.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΛΕΥΚΩΜΑΤΩΝ ΣΤΟΝ ΟΡΟ

### Μέθοδος διουρίας (χρωματομετρική μέθοδος)

#### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια, που έχουν τουλάχιστον δύο πεπτιδικούς δεσμούς, συνδέονται με ιόντα χαλκού σε αλκαλικό περιβάλλον και σχηματίζουν μία σύμπλοκη ένωση που έχει ιώδες χρώμα. Όσο περισσότερες πρωτεΐνες υπάρχουν στο εξεταζόμενο υγρό τόσο το χρώμα που αναπτύσσεται θα είναι πιο έντονο. Μετρώντας την ένταση του χρώματος, υπολογίζουμε το ποσό των πρωτεϊνών.

#### ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- Σωληνάρια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληνάριων.
- Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.

- Ρύγξη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέτες.
- Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- Φωτόμετρο αυτόματο.
- Ανακινήτης σωληναρίων (Vortex).
- Parafilm.
- Γάντια και υαλογράφος.
- 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό ολικών λευκωμάτων.

### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1) Ιωδιούχο κάλιο, θειικός χαλκός, καυστικό νάτριο.
- 2) Πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών: 6 g/dL.

### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Τα αντιδραστήρια είναι έτοιμα για χρήση.
- Πριν τη χρήση αφήνουμε τα αντιδραστήρια να πάρουν θερμοκρασία δωματίου.

### ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:

	E	St	T
<b>Αντιδραστήριο</b>	3000 µL	3000 µL	3000 µL
<b>Πρότυπο διάλυμα</b>	-	50 µL	-
<b>Ορός ή πλάσμα</b>	50 µL	-	-

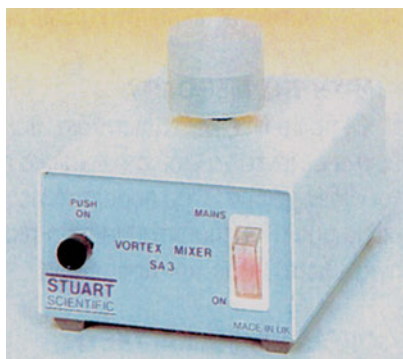
όπου: E=εξεταστέο  
St=standard  
T=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάρια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινήτη.
- Παραμονή για 5' στους 20-25 °C (θερμοκρασία δωματίου).
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέττες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 550 nm. Το χρώμα παραμένει σταθερό 1 ώρα.

\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ



3.4 Αυτόματη πιπέττα ρυθμιζόμενου όγκου με ρύγχος (εύρος 50-200 µL).



3.5 Ανακινήτης σωληναρίων

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ

$$C \text{ ολικών λευκωμάτων ορού σε g / dL} = C_{(ST)} \times \frac{A_{(E)}}{A_{(ST)}}$$

**ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)** 6,00– 8,3 g/dL  
**ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ** έως 12 g/dL

### 3.2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΕΥΚΩΜΑΤΙΝΗΣ (ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ) ΣΤΟΝ ΟΡΟ (Χρωματομετρική μέθοδος)

#### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αλβουμίνη αντιδρά με το πράσινο της βρωμοκρεζόλης (BCG) σε pH 4,2. Η απορρόφηση της BCG αυξάνεται παρουσία της αλβουμίνης και η αύξηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αλβουμίνης στον ορό.

#### ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- Σωληνάρια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληναρίων.
- Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέττες.
- Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- Φωτόμετρο αυτόματο.
- Ανακινήτης σωληναρίων (Vortex).
- Parafilm.
- Γάντια και υαλογράφος.
- 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό αλβουμίνης.

*3.6 Αυτόματη πιπέτα  
ρυθμιζόμενου όγκου  
με ρύγχος (εύρος 100-  
1000 µL).*



#### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1) Βρωμοκρεζόλη, ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) με pH 4,2.
- 2) Πρότυπο βοείου αλβουμίνης (bovine albumin): 5 g/dL.

#### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Τα αντιδραστήρια είναι έτοιμα για χρήση.
- Πριν τη χρήση αφήνουμε τα αντιδραστήρια να πάρουν θερμοκρασία δωματίου.

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:

	E	St	T
Αντιδραστήριο	5000 μL	5000 μL	5000 μL
Πρότυπο διάλυμα	-	20 μL	-
Ορός ή πλάσμα	20 μL	-	-

όπου: E=εξεταστέο  
St=standard  
T=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάρια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινητή.
- Παραμονή για 10' στους 20-25 °C (θερμοκρασία δωματίου).
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέττες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 630 nm. Το χρώμα παραμένει σταθερό 2 ώρες.



3.6 Αυτόματο φωτόμετρο.

\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ

$$C \text{ αλβουμίνης ορού σε } g / dL = C_{(ST)} \times \frac{A_{(E)}}{A_{(ST)}}$$

**ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)** 3,5 - 5,5 g/dL

**ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ** έως 6,9 g/dL

## 3.2.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΛΕΥΚΩΜΑΤΩΝ ΟΡΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

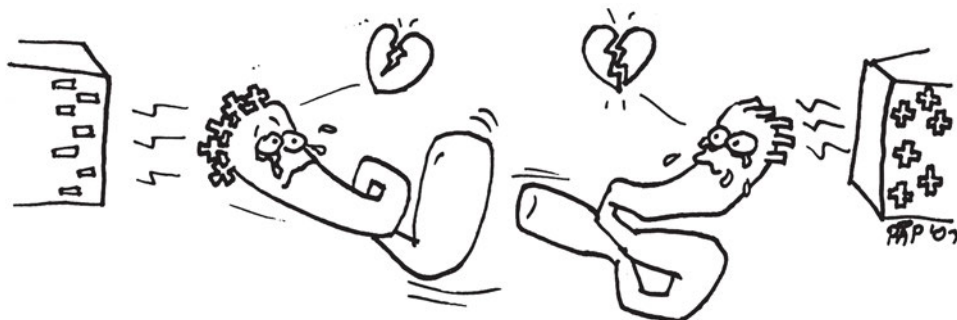
### Α) ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

#### ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΛΕΥΚΩΜΑΤΩΝ

Τα διάφορα λευκώματα του ορού παρουσιάζουν μεταξύ τους αρκετές διαφορές. Μια από αυτές είναι το διαφορετικό τους **ηλεκτρικό φορτίο**. Αυτό μπορεί να είναι θετικό ή αρνητικό, ανάλογα με το αν επικρατούν στα μόρια τους οι αμινικές ή οι καρβοξυλικές ομάδες. Άλλη χαρακτηριστική διαφορά είναι το **μοριακό τους βάρος**.

Έτσι αν τα λευκώματα του ορού βρεθούν σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, τότε θα μετακινηθούν,

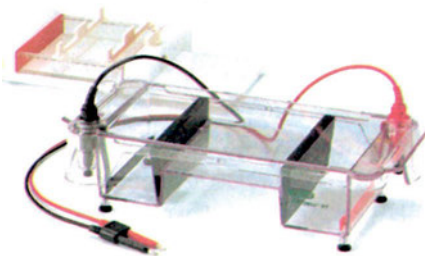
άλλα προς την άνοδο και άλλα προς την κάθοδο, ανάλογα με το ηλεκτρικό τους φορτίο.



Οι πρωτεΐνες έχουν **αμφολυτική ιδιότητα**, δηλ. παρουσιάζουν θετικό ή αρνητικό ολικό φορτίο, ανάλογα με το pH του διαλύματος μέσα στο οποίο βρίσκονται.

Για κάθε πρωτεΐνη υπάρχει ένα pH που αυτή έχει ουδέτερο φορτίο. Το pH αυτό λέγεται **ισοηλεκτρικό σημείο**. Έτσι, αν το pH του διαλύματος είναι πιο όξινο από το ισοηλεκτρικό σημείο της, η πρωτεΐνη φορτίζεται θετικά και οδεύει προς την κάθοδο (-). Ενώ, αν το pH του διαλύματος είναι πιο αλκαλικό από το ισοηλεκτρικό σημείο, τότε η πρωτεΐνη φορτίζεται αρνητικά και οδεύει προς την άνοδο (+).

Όταν λοιπόν το pH του διαλύματος είναι πολύ αλκαλικό, π.χ. 8,6, τότε όλα τα λευκώματα θα μετακινηθούν προς την άνοδο, αλλά με διαφορετική ταχύτητα το καθένα. Τα πιο αρνητικά φορτισμένα και τα μικροτέρου μοριακού βάρους, όπως είναι η λευκωματίνη, θα τρέξουν γρηγορότερα από τα θετικά φορτισμένα, όπως είναι οι σφαιρίνες.



3.8 Οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης

Η ταχύτητα μετακίνησης των πρωτεϊνών εξαρτάται από το φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα τους, την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, τη θερμοκρασία και τις ιδιότητες της ταινίας.

### ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ

Αν τοποθετήσουμε μια ταινία οξικής κυτταρίνης στην επιφάνεια ενός ρυθμιστικού διαλύματος με **pH 8,6** και στην μια άκρη της ταινίας βάλουμε μια σταγόνα ορού, και αφήσουμε να περάσει ηλεκτρικό ρεύμα, τότε τα λευκώματα που υπάρχουν στον ορό θ' αρχίσουν να τρέχουν προς την άνοδο αλλά με διαφορετική ταχύτητα καθένα. Με τον τρόπο αυτό θα διαχωρισθούν τα διάφορα λευκώματα του ορού. Αν κάποια στιγμή σταματήσουμε το ρεύμα, πριν όλα τα λευκώματα συσσωρευθούν στην άνοδο, και χρωματίσουμε την ταινία με χρωστική που χρωματίζει το λευκώμα, θα εμφανιστούν πάνω σ' αυτή, κάθετες λωρίδες, που η καθεμιά αντιστοιχεί σε κάποιο διαφορετικό κλάσμα λευκώματος.



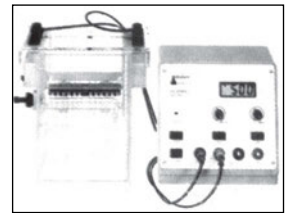
Το πάχος της λωρίδας και η ένταση του χρώματος θα είναι ανάλογα με το ποσό του λευκώματος που μαζεύτηκε εκεί. Αυτά είναι και τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα, για το αν η ηλεκτροφόρηση του εξεταστέου ορού είναι φυσιολογική ή όχι.

## ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

Με τον τρόπο αυτό διαχωρίζονται 5 λωρίδες, που αντιστοιχούν κατά σειρά στα εξής λευκώματα:

1. **Λευκωματίνη.** Είναι η πιο παχειά και η πιο απομακρυσμένη από το σημείο που τοποθετήθηκε ο ορός λωρίδα.
2. **α1-σφαιρίνη.**
3. **α2-σφαιρίνη.**
4. **β-σφαιρίνη.**
5. **γ-σφαιρίνη.** Είναι η πλησιέστερη στο σημείο τοποθετήσεως του ορού λωρίδα.

Η εκτίμηση του αποτελέσματος γίνεται είτε ποιοτικά με απλή παρατήρηση των κλασμάτων, είτε ποσοτικά με τη μέτρηση των κλασμάτων σε ειδικά όργανα (φωτόμετρο ή ντενσιτόμετρο).



3.9 Συσκευή ηλεκτροφόρησης με τροφοδοτικό.

## ΜΕΘΟΔΟΙ

Υπάρχουν και άλλες μέθοδοι ηλεκτροφόρησης, με τις οποίες μπορούμε να διαχωρίσουμε περισσότερα κλάσματα λευκωμάτων και τις χρησιμοποιούμε όταν χρειαζόμαστε περισσότερες και αναλυτικότερες πληροφορίες γι' αυτά, οι οποίες ήδη αναφέρθηκαν στο 2ο κεφάλαιο. Τέτοιες μέθοδοι είναι:

- ▶ Ηλεκτροφόρηση υψηλής διακριτικής ικανότητας.
- ▶ Ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδιο.
- ▶ Ισοηλεκτρική εστίαση.

## **Β) ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ:**

*Ειδικά για την ηλεκτροφόρηση χρειαζόμαστε:*

- ▶ Λουτρό ηλεκτροφόρησης με γέφυρα στη μέση.
- ▶ Τροφοδοτικό ρεύματος.
- ▶ Μεταφορέας δειγμάτων (Applicator).
- ▶ Ντενσιτόμετρο (καταγραφικό μηχάνημα για τις ταινίες).
- ▶ Ταινίες οξικής κυτταρίνης.
- ▶ 5 λεκανάκια (γυάλινα ή πλαστικά).

*Επίσης χρειαζόμαστε:*

- ▶ Σωληνάκια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.

## Βασικές ουσίες στο αίμα **κεφ.3**

- ▶ Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληναρίων.
- ▶ Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- ▶ Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέττες.
- ▶ Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- ▶ Φωτόμετρο αυτόματο.
- ▶ Ανακινητής σωληναρίων (Vortex).
- ▶ Parafilm.
- ▶ Γάντια και υαλογράφος.  
*Για την παρασκευή των απαιτούμενων διαλυμάτων χρειάζομαστε:*
- ▶ Ποτήρια ζέσεως, ογκομετρικές φιάλες, ογκομετρικούς κυλίνδρους.
- ▶ Ζυγό ακριβείας.

### Γ) ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ:

- 1) Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer με pH 8,8) : Παρασκευάζεται διαλύοντας 18 g high resolution buffer σε 800 mL απεσταγμένο νερό.  
ΠΡΟΣΟΧΗ ΔΗΛΗΤΗΡΙΟ! (Κατάποση μπορεί να προκαλέσει το θάνατο).
- 2) Διάλυμα βαφής: παρασκευάζεται διαλύοντας 0,5 g χρωστικής (PONCEAU S) σε 100 mL διαλύματος τριχλωροξικού οξέος 7,5 % W/V.
- 3) Διάλυμα αποχρωματισμού : Οξικό οξύ 5 % V/V.
- 4) Διάλυμα έκλουσης : Ακετόνη - Πυκνό οξικό οξύ 1:1.
- 5) Διάλυμα διαφανοποίησης : SEPRA CLEAR II (έτοιμο).  
ΠΡΟΣΟΧΗ! Ο ατμός του είναι βλαβερός.
- 6) Αιθανόλη – Οξικό οξύ (9:1).
- 7) Απεσταγμένο νερό.



3.10 Ζυγός ακριβείας.

### Δ) ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

- 1) Μέσα σε λεκανάκι με buffer αφήνουμε στην επιφάνειά του την ταινία οξικής κυτταρίνης. Όταν διαβραχεί τελείως, την βυθίζουμε στο buffer για 10' τουλάχιστον. Η ταινία αυτή έχει πόρους, που γεμίζουν με ρυθμιστικό διάλυμα.
- 2) Γεμίζουμε με 100 mL buffer κάθε πλευρά του λουτρού ηλεκτροφόρησης.
- 3) Τοποθετούμε την ταινία ανάμεσα σε 2 φύλλα διηθητικού χαρτιού.
- 4) Ανασηκώνουμε τη γέφυρα από το λουτρό και εφαρμόζουμε την ταινία πάνω της, τε-ντώνοντάς την (πιάνοντάς την μόνο από τα άκρα).
- 5) Επανατοποθετούμε τη γέφυρα στο λουτρό, προσέχοντας το (+) του λουτρού να συμπίπτει με το (+) της γέφυρας.
- 6) Στα πηγαδάκια του applicator βάζουμε περίπου 10  $\mu$ L ορό.
- 7) Πατάμε ελαφρά το κουμπί του applicator για 10-15" και τα clips του βουτούν μέσα στα δείγματα ορών.

- 8) Μεταφέρουμε το applicator πάνω στη γέφυρα του λουτρού.
  - 9) Πατάμε το κουμπί του applicator για 10-15". Ακουμπούν τα clips πάνω στην ταινία και μεταφέρονται οι οροί σ' αυτήν.
  - 10) Ανασηκώνουμε το applicator. Όταν δεν διαθέτουμε applicator, ο ορός μπορεί να τοποθετηθεί πάνω στην ταινία, με αυτόματη πιπέττα ή τριχοειδικό σωληνάριο.
  - 11) Συνδέουμε το λουτρό με το τροφοδοτικό (το + στο +), το ανάβουμε και εφαρμόζουμε τάση 210 VOLT για 20'. (Την τάση την έχουμε ήδη ρυθμίσει).
- Προσοχή:** δεν ανοίγουμε την συσκευή ηλεκτροδότησης καθόλη τη διάρκεια της εξέτασης. Υπάρχει κίνδυνος ηλεκτροπληξίας.
- 12) Μεταφέρουμε την ταινία οριζόντια, μέσα σε λεκανάκι με το διάλυμα βαφής. Πρώτα στην επιφάνειά του και μετά μέσα του για 10'. Το σκεπάζουμε για να μην εξατμίζεται.
  - 13) Τοποθετούμε την ταινία στο διάλυμα αποχρωματισμού για 10'. Για τον καλύτερο αποχρωματισμό της ταινίας την τοποθετούμε διαδοχικά σε τρία διαλύματα αποχρωματισμού, (μέσα σε 3 διαφορετικά λεκανάκια).
  - 14) Τοποθετούμε την ταινία ανάμεσα σε 2 φύλλα διηθητικού χαρτιού.

### Ε) ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΕΚΛΟΥΣΗ:

- 1) Κόβουμε προσεκτικά τα κλάσματα και τα τοποθετούμε σε αντίστοιχους δοκιμαστικούς σωλήνες.
- 2) Προσθέτουμε 1 mL διαλύματος έκλουσης σε κάθε σωλήνα.
- 3) Ανακινούμε καλά ώστε να διαλυθούν τα κλάσματα.
- 4) Φωτομετρούμε σε μήκος κύματος 525 nm, μηδενίζοντας με τυφλό σωληνάριο (T) που περιέχει απεσταγμένο νερό.
- 5) Υπολογίζουμε ως εξής:

$$ΑΛΒΟΥΜΙΝΗ = \frac{A(\text{αλβουμίνης})}{\text{Σύνολο } A (\text{όλων των κλασμάτων})} \times 100$$

$$\alpha 1 \text{ ΣΦΑΙΡΙΝΗ} = \frac{A(\alpha_1 \text{ σφαιρίνης})}{\text{Σύνολο } A (\text{όλων των κλασμάτων})} \times 100 \quad \text{κ.λπ.}$$

όπου A=απορρόφηση

ΠΡΟΣΟΧΗ: Η μέθοδος μέτρησης αυτή δεν μπορεί να δώσει ακριβή αποτελέσματα.

### ΣΤ) ΔΙΑΦΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΝΤΕΝΣΙΤΟΜΕΤΡΟ (ΠΥΚΝΟΜΕΤΡΙΑ):

Διαφανοποίηση (1<sup>ος</sup> τρόπος):

- 1) Τοποθετούμε την ταινία στο διάλυμα διαφανοποίησης για 5'.

## Βασικές ουσίες στο αίμα **κεφ.3**

- 2) Την μεταφέρουμε πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα σε κλίβανο με θερμοκρασία 80-90 °C για 10-15'.
- 3) Σαρώνουμε την ταινία στο ντενσιτόμετρο σε μήκος κύματος 525 nm.  
Το ντενσιτόμετρο είναι ειδικό καταγραφικό όργανο που απεικονίζει τις ποσότητες των πρωτεϊνικών κλασμάτων με ένα γραμμικό διάγραμμα.

3.11 Ντενσιτόμετρο για την καταγραφή και μέτρηση των πρωτεϊνικών κλασμάτων



### Διαφανοποίηση (2<sup>ος</sup> τρόπος):

- 1) Τοποθετούμε τις ταινίες σε ένα διάλυμα αιθανόλης επί 10'.
- 2) Στη συνέχεια εμβαπτίζουμε τις ταινίες μία - μία σε ένα πρόσφατο διάλυμα αιθανόλης και οξικού οξέος (90 mL αιθανόλης + 10 mL οξικού οξέος) επί 2'. Αμέσως τοποθετούμε τις ταινίες προσεκτικά μία μία επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και την αφήνουμε να διαφανοποιηθεί. Μετά τοποθετούμε την πλάκα στο καταγραφικό και παίρνουμε τις τιμές.

### **Z) ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ):**

ΟΛ.ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	6,0 - 8,3 g/ dL	$\alpha_2$ ΣΦΑΙΡΙΝΗ	6 - 17 %
ΑΛΒΟΥΜΙΝΗ	50 - 65 %	$\beta$ ΣΦΑΙΡΙΝΗ	7,5 - 18 %
$\alpha_1$ ΣΦΑΙΡΙΝΗ	2 - 6 %	$\gamma$ ΣΦΑΙΡΙΝΗ	9 - 20 %

## **3.3 ΛΙΠΙΔΙΑ-ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ**

### **3.3.1 ΓΕΝΙΚΑ**

Ο όρος λιπίδια αναφέρεται σε όλα τα **λίπη** και τα **λιπαρά οξέα** που βρίσκονται στο αίμα και στους ιστούς του σώματος και προέρχονται από τα λίπη των τροφών ή από εκείνα που συνθέτονται στο ήπαρ. Ένας αριθμός λιπιδίων που είναι σπουδαία από βιολογική άποψη, όπως η χοληστερόλη, οι εστέρες της χοληστερόλης, τα τριγλυκερίδια, τα φωσφολιπίδια,

οι λιποπρωτεΐνες και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, περιέχονται στο αίμα σε διάφορες συγκεντρώσεις.

### ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Μετά το σχηματισμό τους οι ενώσεις αυτές μπορεί να χρησιμοποιηθούν αμέσως για την κάλυψη ενεργειακών αναγκών, για το σχηματισμό στεροειδών ορμονών και για τη συγκρότηση των κυτταρικών μεμβρανών. Μπορεί επίσης να μεταφερθούν και να εναποθηκευτούν σε όλη την έκταση του σώματος, για να χρησιμοποιηθούν αργότερα.

Τα λιπίδια αυτά είναι αδιάλυτα στον ορό και γι' αυτό κυκλοφορούν στο αίμα είτε συνδεδεμένα με ορισμένες πρωτεΐνες, γνωστές ως λιποπρωτεΐνες, είτε σε μια γαλακτωματοποιημένη μορφή, γνωστή ως χυλομικρά.

Οι λιποπρωτεΐνες είναι μακρομοριακά συμπλέγματα λιπιδίων και πρωτεϊνών, τα οποία χρησιμεύουν στο πλάσμα ως μέσα μεταφοράς των αδιάλυτων στο νερό λιπιδίων. Επειδή έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε λιπίδια, εμφανίζουν μικρότερες πυκνότητες από ότι οι άλλες πρωτεΐνες. Οι πυκνότητες των λιποπρωτεϊνών ελαττώνονται, όσο το περιεχόμενό τους σε λιπίδια είναι μεγαλύτερο και όσο το περιεχόμενό τους σε πρωτεΐνες είναι μικρότερο. Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος μεταφέρουν ουσιαστικά όλη τη χοληστερόλη και τα εστεροποιημένα λιπίδια στο αίμα.

Οι λιποπρωτεΐνες διακρίνονται σε τέσσερις μεγαλύτερες τάξεις, τα χυλομικρά, τις λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL), τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) και τις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL), και σε δύο ποσοτικά μικρότερες λιποπρωτεΐνες, τις λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης πυκνότητας (IDL) και τη λιποπρωτεΐνη [a] [Lp(a)].

### 3.3.2 ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ

#### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η χοληστερόλη είναι η κυριότερη στερόλη για τον άνθρωπο. Βρίσκεται παντού στον οργανισμό σε όλα τα κύτταρα, όπου αποτελεί απαραίτητο παράγοντα της μεμβράνης. Είναι η πρόδρομη ένωση στο σχηματισμό σημαντικών ουσιών, όπως είναι διάφορες στεροειδείς ορμόνες, η βιταμίνη D και τα χολικά οξέα. Μεγάλα ποσά χοληστερόλης περιέχονται στο αίμα, τη χολή, το ήπαρ, το δέρμα, το νευρικό ιστό, το έντερο και τα επινεφρίδια. Το μεγάλο ποσό της χοληστερόλης στα επινεφρίδια χρησιμοποιείται στη βιοσύνθεση στεροειδών ορμονών. Η χοληστερόλη προέρχεται από τη χοληστερόλη των τροφών ή σχηματίζεται σε πολλούς ιστούς και κυρίως στο ήπαρ και το λεπτό έντερο. Το μεγαλύτερο μέρος της χοληστερόλης συντίθεται στο ήπαρ και απεκκρίνεται με τη χολή στο λεπτό έντερο, όπου αναμειγνύεται με τη χοληστερόλη των τροφών. Το μείγμα αυτό της ελεύθερης χοληστερόλης απορροφάται στην κυκλοφορία του αίματος και επιστρέφει στο ήπαρ, όπου το 70% περίπου συνδέεται με λιπαρά οξέα και σχηματίζει εστέρες της χοληστερόλης.

Παρ' όλο που η χοληστερόλη δεν προκαλεί μόνη της αθηροσκλήρωση, ωστόσο υπερ-

## Βασικές ουσίες στο αίμα **κεφ.3**

βολικά ποσά ορισμένων λιποπρωτεϊνών που περιέχουν χοληστερόλη συμβάλλουν πραγματικά στην εναπόθεση πλακών, οι οποίες αποφράζουν τις στεφανιαίες αρτηρίες. Φυσιολογικά περίπου τα 2/3 της χοληστερόλης του πλάσματος μεταφέρεται ως λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL) και ένα μικρό ποσό συνδέεται με τις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL). Επειδή η συγκέντρωση της HDL-χοληστερόλης φαίνεται να είναι αντιστρόφως ανάλογη στην τάση προς καρδιακή νόσο, υψηλότερα επίπεδα της μπορεί να συνδέονται με ελαττωμένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου και αυξημένη μακροβιότητα. Η σχέση ολικής χοληστερόλης προς HDL-χοληστερόλη (αθηρωματικός δείκτης ή αθηρογενετικός δείκτης) παρέχει έναν δείκτη του αριθμού των λιποπρωτεϊνών που υπάρχουν και επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην εκτίμηση του κινδύνου μελλοντικού εμφράγματος του μυοκαρδίου. Υψηλές τιμές του δείκτη υποδηλώνουν ένα μεγάλο παράγοντα κινδύνου για τη νόσο των στεφανιαίων αγγείων, ενώ χαμηλές τιμές του δείκτη είναι ένα ευνοϊκό εύρημα.

Οι **τιμές αναφοράς** (φυσιολογικές τιμές) για την ολική χοληστερόλη, την HDL-χοληστερόλη, την LDL-χοληστερόλη, και τη VLDL-χοληστερόλη στον ορό είναι οι ακόλουθες:

### **Ολική χοληστερόλη**

Επιθυμητά επίπεδα	< 200	mg/dL
Οριακά υψηλά επίπεδα	200- 240	mg/dL
Υψηλά επίπεδα	> 240	mg/dL

### **HDL-χοληστερόλη**

Επιθυμητά επίπεδα	> 35	mg/dL
Χαμηλά επίπεδα	< 35	mg/dL

### **LDL-χοληστερόλη**

Επιθυμητά επίπεδα	< 100	mg/dL
Οριακά υψηλά επίπεδα	130- 160	mg/dL
Υψηλά επίπεδα (υψηλού κινδύνου)	> 160	mg/dL

### **VLDL-χοληστερόλη**

Επιθυμητά επίπεδα	< 40	mg/dL
-------------------	------	-------

## **ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ**

Η ελεύθερη χοληστερόλη και οι εστέρες της είναι ενώσεις αδιάλυτες στο πλάσμα και επομένως πρέπει να συνδεθούν με διάφορες πρωτεΐνες του πλάσματος, για να είναι δυνατή η μεταφορά τους σε όλη την έκταση του σώματος. Οποιαδήποτε ηπατική πάθηση, η οποία προκαλεί ηπατοκυτταρική βλάβη ή εμποδίζει τη ροή της χολής από το ήπαρ, επηρεάζει τη συγκέντρωση στον ορό της ολικής χοληστερόλης και μεταβάλλει τη σχέση της ελεύθερης χοληστερόλης προς την εστεροποιημένη.

Ο οργανισμός του ανθρώπου δεν διαθέτει κατάλληλα ένζυμα για τη διάσπαση και οξείδωση στεροειδών πυρήνων. Έτσι η χοληστερόλη δεν μπορεί να οξειδωθεί σε CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O και επομένως δεν μπορεί να χρησιμεύει ως μόριο καύσιμο. Όμως ο οργανισμός διαθέτει

κατάλληλους μηχανισμούς, ώστε να αποφεύγεται η υπερφόρτωση των ιστών σε χοληστερόλη. Οι ρυθμιστικοί αυτοί μηχανισμοί έχουν σχέση με τη βιοσύνθεση, τη μεταφορά, την απέκκριση και τη χρησιμοποίηση της χοληστερόλης. Όταν υπάρχουν ανωμαλίες στους ρυθμιστικούς αυτούς μηχανισμούς, τότε προκαλείται εναπόθεση της χοληστερόλης και άλλων λιπιδίων στην εσωτερική επιφάνεια των αγγείων οδηγώντας σε αθηροσκλήρωση. Έτσι δημιουργείται απόφραξη αγγείων της καρδιάς (έμφραγμα) και του εγκεφάλου (εγκεφαλική προσβολή).

### 3.3.3 ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ

#### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Τα τριγλυκερίδια ή «πραγματικά» λίπη αποτελούνται από τρία λιπαρά οξέα και ένα μόριο γλυκερόλης, είναι δηλαδή εστέρες της γλυκερόλης με τρία λιπαρά οξέα (τριακυλογλυκερόλες). Προέρχονται από τα λίπη των τροφών ή συνθέτονται στο ήπαρ. Οι ενώσεις αυτές είναι, ως γνωστό, αδιάλυτες σε υδατικά μέσα. Γι' αυτό τα τριγλυκερίδια που παίρνουμε με τις τροφές, όταν φτάσουν στο έντερο, υφίστανται γαλακτωματοποίηση, δηλαδή καταμερισμό σε πολύ μικρά σταγονίδια. Η γαλακτωματοποίηση των λιπιδίων διευκολύνει τη δράση των ενζύμων που τα διασπούν, επειδή αυξάνεται η επιφάνεια που προσφέρεται για τη δράση της λιπάσης και την απορρόφησή τους.

Τα τριγλυκερίδια είναι τα λιπίδια εναποθήκευσης. Η σύνθεσή τους γίνεται κυρίως στο λιπώδη ιστό, τους μαστούς και το ήπαρ. Τα τριγλυκερίδια αποτελούν τη μορφή με την οποία εναποθηκεύονται τα λιπαρά οξέα, τα οποία είναι από τα κυριότερα καύσιμα-μόρια στα κύτταρα.

Οι **τιμές αναφοράς** (φυσιολογικές τιμές) για τα τριγλυκερίδια του ορού είναι:

<b>Επιθυμητά επίπεδα</b>	<b>&lt; 200</b>	<b>mg/dL</b>
<b>Οριακά υψηλά επίπεδα</b>	<b>200- 400</b>	<b>mg/dL</b>
<b>Υψηλά επίπεδα</b>	<b>400- 1000</b>	<b>mg/dL</b>
<b>Πολύ υψηλά επίπεδα</b>	<b>&lt; 1000</b>	<b>mg/dL</b>

#### ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Οι μετρήσεις των επιπέδων των τριγλυκεριδίων στον ορό, όπως και οι προσδιορισμοί της χοληστερόλης, χρησιμεύουν ως ένας δείκτης του αριθμού των λιποπρωτεϊνικών μορίων, τα οποία σχετίζονται με τις εναποθέσεις πλακών και την αθηροσκλήρωση. Αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων υποδηλώνουν την παρουσία οποιασδήποτε από τις διάφορες ανωμαλίες του μεταβολισμού των λιπιδίων, οι οποίες αναφέρονται ομαδικά ως υπερλιποπρωτεϊναιμίες. Συνήθως εκτελούνται και άλλες δοκιμασίες, όπως η χοληστερόλη του ορού και η ηλεκτροφόρηση των λιποπρωτεϊνών, μαζί με τις μετρήσεις των τριγλυκεριδίων, για να συμπληρώσουν την εικόνα των λιπιδίων του αίματος και να κάνουν δυνατή μια ακριβή διάγνωση.



## 3.3.4 ΑΡΤΗΡΙΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

Η νόσος των στεφανιαίων αγγείων είναι ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα υγείας στις σύγχρονες κοινωνίες. Ο γενικός όρος για τη σκλήρυνση του τοιχώματος των αρτηριών είναι αρτηριοσκλήρωση. Η κυριότερη μορφή αρτηριοσκλήρωσης χαρακτηρίζεται από εναπόθεση λιπιδίων και ιδίως εστέρων χοληστερόλης στο εσωτερικό τοίχωμα των αγγείων. Η μορφή αυτή ονομάζεται αθηροσκλήρωση. Στην αθηροσκλήρωση υπάρχουν διάφορες αλλαγές στον έσω χιτώνα των αρτηριών, όπως είναι η εστιακή συσσώρευση λιπιδίων και άλλων συστατικών του αίματος. Η ανάπτυξη ινώδους συνδετικού ιστού και η εναπόθεση αλάτων ασβεστίου στις σχηματιζόμενες αθηρωματικές πλάκες μπορεί τελικά να οδηγήσει σε αρτηριοσκλήρωση.



Αρτηριοσκλήρωση μπορεί να συμβεί σε διάφορες αρτηρίες και κυρίως στις μεσαίου μεγέθους μυϊκές αρτηρίες (στεφανιαίες, καρωτίδες, μηριαία και άλλες). Η κλινική εικόνα που προκύπτει εξαρτάται από το αγγείο που προσβάλλεται. Πιο συχνά προσβάλλονται τα στεφανιαία αγγεία και η προσβολή μπορεί να οδηγήσει σε έμφραγμα του μυοκαρδίου.

### Επιπλέον πληροφορίες

- Διάφοροι παράγοντες κινδύνου έχουν αναγνωριστεί ως υπεύθυνοι για την πρόκληση της νόσου των στεφανιαίων αγγείων. Οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι οι εξής:
  - 1) Αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης και ιδιαίτερα της LDL-χοληστερόλης (>160 mg/dL)
  - 2) Υπέρταση
  - 3) Χαμηλά επίπεδα HDL-χοληστερόλης (<35 mg/dL)
  - 4) Κάπνισμα
  - 5) Stress
  - 6) Σακχαρώδης διαβήτης
  - 7) Παχυσαρκία
  - 8) Έλλειψη σωματικής άσκησης
  - 9) Υπερτριγλυκεριδαμία
  - 10) Υπερουρικαμία
  - 11) Ηλικία. ΑΝΔΡΕΣ: >45 έτη    ΓΥΝΑΙΚΕΣ: >55 έτη
  - 12) Οικογενειακό ιστορικό πρώιμης στεφανιαίας νόσου
  - 13) Αντισυλληπτικά

### 3.3.5 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

#### ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ-ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Οι προσδιορισμοί της ολικής χοληστερόλης, της HDL-χοληστερόλης των τριγλυκεριδίων, των ολικών λιπιδίων, των φωσφολιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών πραγματοποιούνται στον **ορό** ή το **πλάσμα**. Απαιτούν 2 mL μη αιμολυμένου αίματος που συλλέγεται από ένα νηστικό άτομο σε ένα σωληνάριο χωρίς αντιπηκτικά ή σε ένα σωληνάριο που περιέχει EDTA ως αντιπηκτικό.

Οι συγκεντρώσεις της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα είναι περίπου 3% χαμηλότερες από ότι στον ορό. Τα δείγματα του ορού ή του πλάσματος παραμένουν σταθερά επί μία εβδομάδα σε θερμοκρασία δωματίου, επί 1-2 μήνες στην κατάψυξη σε  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  και επί ένα έτος ή περισσότερο, όταν διατηρηθούν στην κατάψυξη σε  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  ή χαμηλότερα. Ωστόσο, οι δοκιμασίες για τους εστέρες της χοληστερόλης πρέπει να εκτελούνται αμέσως, επειδή οι εστέρες μετατρέπονται στην ελεύθερη μορφή της χοληστερόλης, όταν παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για μεγάλο χρονικό διάστημα παράγοντας ανακριβείς σχέσεις της ελεύθερης χοληστερόλης προς την εστεροποιημένη.

Οι μετρήσεις των επιπέδων των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών είναι πάρα πολύ ακριβείς, όταν τα δείγματα του αίματος συλλέγονται το πρωί μετά από μία ολονύκτια **νηστεία 12-14 ωρών**.

Τα αποτελέσματα των δοκιμασιών είναι περισσότερο αξιόπιστα, όταν το δείγμα του αίματος συλλέγεται πριν ο ασθενής πάρει οποιαδήποτε φάρμακα. Τα φωσφολιπίδια δεν προσδιορίζονται πια, εκτός ελαχίστων περιπτώσεων, καθώς βρέθηκε ότι η συγκέντρωσή τους μεταβάλλεται προς την ίδια κατεύθυνση και στην ίδια έκταση με τη χοληστερόλη.

Οι δοκιμασίες πρέπει να εκτελούνται όσο το δυνατό πιο γρήγορα μετά από τη συλλογή του δείγματος, επειδή οι τιμές των λιποπρωτεϊνών είναι ανακριβείς, όταν τα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για μεγάλο χρονικό διάστημα. Επίσης τα δείγματα δείχνουν αλλοιωμένα ηλεκτροφορητικά διαγράμματα των λιποπρωτεϊνών και απώλεια των LDL και VLDL κλασμάτων, όταν διατηρούνται σε θερμοκρασίες ψυγείου για περισσότερο από 24 ώρες.

### 3.3.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ (ΧΟΛΗΣΤΕΡΙΝΗΣ) ΣΤΟΝ ΟΡΟ (Ενζυμική Μέθοδος)

#### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εστεροποιημένη χοληστερόλη του ορού διασπάται με το ένζυμο εστεράση της χοληστερόλης σε χοληστερόλη και λιπαρά οξέα. Έτσι το σύνολο της χοληστερόλης (αυτή που προέρχεται από την προηγούμενη διάσπαση και η ελεύθερη) οξειδώνεται με το ένζυμο οξειδάση της χοληστερόλης, παράγεται υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), το οποίο με

## Βασικές ουσίες στο αίμα **κεφ.3**

τα κατάλληλα αντιδραστήρια και τη βοήθεια του ενζύμου υπεροξειδάση (POD) παράγει μια χρωματιστή ένωση, την κινόνη. Η ένταση του χρώματος της κινόνης (άρα και η απορρόφηση φωτός που κάνει αυτό) είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στο δείγμα.

Αναλυτικά ο ενζυμικός προσδιορισμός της ολικής χοληστερόλης γίνεται σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις:

1. ΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ  $\xrightarrow{\text{ΕΣΤΕΡΑΣΗ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ}}$  ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ + ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ
2. ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ  $\xrightarrow{\text{ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ}}$  3-ΧΟΛΕΣΤΕΝΟΝΗ + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + ΦΑΙΝΟΛΗ + ΑΜΙΝΟ-4-ΑΝΤΙΠΥΡΙΝΗ  $\xrightarrow{\text{ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ}}$  ΚΙΝΟΝΗ (κόκκινο χρώμα) + H<sub>2</sub>O

### ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

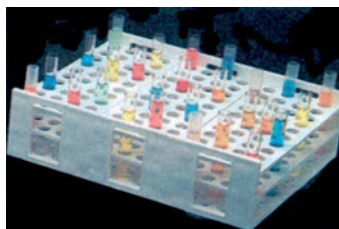
- Σωληνάκια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληναρίων.
- Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέττες.
- Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- Φωτόμετρο αυτόματο.
- Ανακινητής σωληναρίων (Vortex).
- Υδατόλουτρο.
- Parafilm.
- Γάντια και υαλογράφος.
- 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό χοληστερόλης.



3.12 Parafilm.

### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1) Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) με pH 6,9 και φαινόλη.
- 2) Εστεράση χοληστερόλης, οξειδάση χοληστερόλης, υπεροξειδάση, αμινο-4-αντιπυρίνη.
- 3) Πρότυπο χοληστερόλης: 200 mg/dL.



3.13 Στατώ με σωληνάκια

### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

– **Ανασύσταση** αντιδραστηρίων:

Ανακατεύουμε μια ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα (1) με το φιαλίδιο, στο οποίο βρίσκονται τα ένζυμα σε σκόνη λυοφιλοποιημένα (2), σύμφωνα με τις οδηγίες του σετ.

- **Μετά** την ανασύσταση των αντιδραστηρίων περιορίζεται ο χρόνος «ζωής» τους. Διατηρούνται για ένα μήνα στο ψυγείο (2-8 °C). Πάντα σύμφωνα με τις οδηγίες του σετ.
- Πριν τη χρήση αφήνουμε τα αντιδραστήρια να πάρουν θερμοκρασία δωματίου.

### ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:

	<b>E</b>	<b>St</b>	<b>T</b>
<b>Αντιδραστήριο 1 + 2</b>	1000 µL	1000 µL	1000 µL
<b>Πρότυπο διάλυμα</b>	-	10 µL	-
<b>Ορός ή πλάσμα</b>	10 µL	-	-

όπου: E=εξεταστέο  
St=standard  
T=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάρια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινήτη.
- Παραμονή για 5' σε 37 °C (υδατόλουτρο).
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέττες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 510 nm. Το χρώμα παραμένει σταθερό 30'.

*\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ*

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

$$C \text{ χοληστερόλης ορού σε mg / dL} = C_{(ST)} \times \frac{A_{(E)}}{A_{(ST)}}$$

**ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)** 150-240 mg/dL

**ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ** έως 500 mg/dL

### 3.3.7 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ ΣΤΟΝ ΟΡΟ (Ενζυμική μέθοδος)

#### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

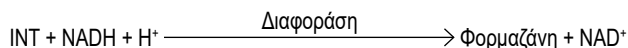
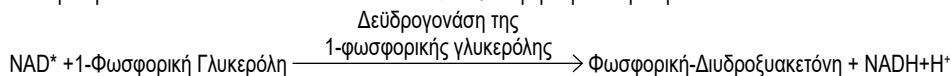
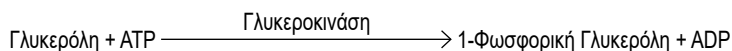
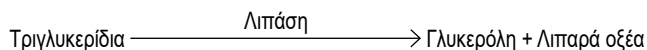
Στις ενζυμικές μεθόδους τα τριγλυκερίδια υδρολύονται σε γλυκερόλη και προσδιορίζεται με ενζυμικές αντιδράσεις. Η ενζυμική μέθοδος είναι πολύ πιο απλή και γρήγορη αλλά έχει το μειονέκτημα, επειδή ο προσδιορισμός γίνεται απευθείας στον ορό, να προσδιορίζεται επίσης το μικρό ποσό της ελεύθερης γλυκερόλης στον ορό.

Η τελική παραγόμενη χρωματιστή ουσία, μετά από μια σειρά αντιδράσεων, είναι η φορμαζάνη. Η ένταση του χρώματος της φορμαζάνης (άρα και η απορρόφηση φωτός που

## Βασικές ουσίες στο αίμα **κεφ.3**

κάνει αυτό) είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων στο δείγμα.

Μία σχηματική παρουσίαση των αντιδράσεων που περιλαμβάνονται στον ενζυμικό προσδιορισμό των τριγλυκεριδίων είναι η εξής:



### ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- Σωληνάκια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληναρίων.
- Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέττες.
- Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- Φωτόμετρο αυτόματο.
- Ανακινήτης σωληναρίων (Vortex).
- Υδατόλουτρο.
- Parafilm.
- Γάντια και υαλογράφος.
- 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό τριγλυκεριδίων.

### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) με pH 7,9.
2. Enzyme-reagent (αντιδραστήριο ενζύμων).  
Περιέχει: ATP, NAD<sup>+</sup>, Διαφοράση, Γλυκεροκινάση, Δεϋδρογονάση της 1-φωσφορικής γλυκερόλης, Λιπάσες, Ιόντα μαγνησίου, INT (Ιωδονιτροτετραζόλιο).
3. Acid Reagent (όξινο αντιδραστήριο). Βοηθητικό αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.
4. Πρότυπο διάλυμα τριγλυκεριδίων 200 mg/dL.



3.14 Αυτόματες πιπέττες ρυθμιζόμενου όγκου σε ειδικά στατώ.

## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- **Ανασύσταση** αντιδραστηρίων:  
Ανακατεύουμε μια ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα (1) με το φιαλίδιο, στο οποίο βρίσκονται τα ένζυμα σε σκόνη - λυοφιλοποιημένα (2), σύμφωνα με τις οδηγίες του σετ.
- **Μετά** την ανασύσταση των αντιδραστηρίων περιορίζεται ο χρόνος «ζωής» τους. Διατηρούνται για τρεις ημέρες στο ψυγείο (2-8 °C) ή στην κατάψυξη επί έναν τουλάχιστο μήνα. Πάντα σύμφωνα με τις οδηγίες του σετ.
- Πριν τη χρήση αφήνουμε τα αντιδραστήρια να πάρουν θερμοκρασία δωματίου.

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:

	E	St	T
<b>Αντιδραστήριο 1+2</b>	1000 μL	1000 μL	1000 μL
<b>Δείγμα (ορός ή πλάσμα)</b>	20 μL	-	-
<b>Πρότυπο διάλυμα</b>	-	20 μL	-

όπου: E=εξεταστέο  
St=standard  
T=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάρια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινήτη.
- Παραμονή για 15' σε 37 °C (υδατόλουτρο) ή 60' σε θερμοκρασία δωματίου (στους 20-25 °C).
- Με πιπέττα προσθέτουμε στα σωληνάρια\*:

	E	St	T
<b>Acid Reagent</b>	2000 μL	2000 μL	2000 μL

- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέτες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 510 nm. Το χρώμα παραμένει σταθερό 60'.

\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

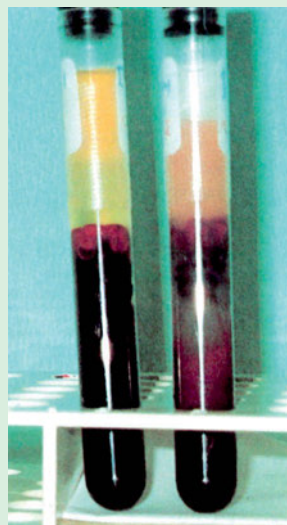
$$C \text{ τριγλυκεριδίων ορού σε mg / dL} = C_{(ST)} \times \frac{A_{(E)}}{A_{(ST)}}$$

**ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)** 36 -165 mg/dL

**ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ** έως 500 mg/dL

## ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ:

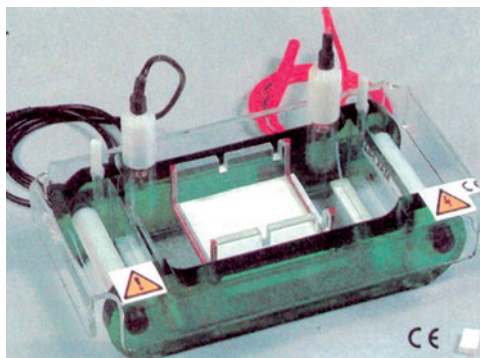
- α)** Πολύ λιπαιμικοί οροί πρέπει να αραιώνονται με φυσιολογικό ορό 1:10. Το αποτέλεσμα πολλαπλασιάζεται επί 10. **Λιπαιμικός** είναι ο ορός με θολή «γαλακτόχρωμη» όψη από τα πολύ αυξημένα λιπίδια που περιέχει.
- β)** Σε αιμολυμένους ή ικτερικούς ορούς συνιστάται η χρήση τυφλού αντιδραστηρίου για κάθε ορό. Δηλαδή 20  $\mu\text{L}$  ορού αναμειγνύονται με 2000  $\mu\text{L}$  απεσταγμένου νερού. Το μείγμα φωτομετρείται έναντι απεσταγμένου νερού σε μήκος κύματος 510 nm. Η απορρόφηση του μείγματος αφαιρείται από την απορρόφηση του εξεταστέου. Η διαφορά  $\Delta A$  (όπου  $\Delta A = A$  εξεταστέου  $- A$  τυφλού εξεταστέου) μπαίνει στον τύπο υπολογισμού ως η πραγματική  $A$  εξεταστέου.



3.15 Ορός φυσιολογικός (αριστερά) και λιπαιμικός (δεξιά).

### 3.3.8 ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Οι λιποπρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση, με υπερφυγοκέντρωση ή με συνδυασμό των δύο αυτών μεθόδων. Η ηλεκτροφόρηση σε οξική κυτταρίνη ή σε πηκτή αγαρόζης είναι απλούστερη αλλά δεν δίνει πάντα σαφείς απαντήσεις, ενώ η υπερφυγοκέντρωση έχει μεγάλο κόστος καθώς απαιτεί ακριβό όργανο.



3.16 Συσκευή ηλεκτροφόρησης



Οι λιποπρωτεΐνες, σύμφωνα με τη μέθοδο διαχωρισμού τους\*, κατατάσσονται ως εξής:

### Οι μεγαλύτερες τάξεις των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Λιποπρωτεΐνες	Διάμετρος (nm)	Πυκνότητα (kg/L)	Ηλεκτροφορητική κινητικότητα
Χυλομικρά	75 - 1200	< 0,95	Δεν μετακινούνται
VLDL	30 - 70	0,95 - 1,006	Προ - β
IDL		1,006 - 1,019	β ή προ - β
LDL	18 - 30	1,019 - 1,063	β
HDL2		1,063 - 1,125	
	5 - 12		α1
HDL3		1,125 - 1,210	
Lp(a)		1,045 - 1,080	Προ - β

\* Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

#### Σημείωση

VLDL = Λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (Very Low Density Lipoprotein)

IDL = Λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης πυκνότητας (Intermediate Density Lipoprotein)

LDL = Λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (Low Density Lipoprotein)

HDL = Λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (High Density Lipoprotein)

Lp (a) = Lipoprotein (a)

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

#### ΝΑ ΜΗΝ ΞΕΧΝΩ:

- Η κυριότερη πηγή ενέργειας του οργανισμού είναι οι υδατάνθρακες, κυρίως η **γλυκόζη** που κυκλοφορεί στο αίμα. Οι ορμόνες που επιδρούν στην ομοιόσταση της γλυκόζης είναι από τη μία η ινσουλίνη (υπογλυκαιμικός παράγοντας) και από την άλλη μεριά το γλουκαγόνο, η αδρεναλίνη, η θυροξίνη κ.α. (υπεργλυκαιμικοί παράγοντες). Ο **διαβήτης** είναι νόσημα που προκαλείται από ανεπάρκεια στην έκκριση της ινσουλίνης, με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται διαταραχές στο μεταβολισμό των υδατανθράκων. Ο προσδιορισμός της γλυκόζης στον ορό γίνεται σήμερα με ενζυμική μέθοδο.
- Ο ορός του αίματος περιέχει τουλάχιστον 100 **πρωτεΐνες**, οι οποίες συνθέτονται στο ήπαρ και το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα και διαιρούνται σε διάφορα κλάσματα, τα οποία ταξινομούνται ως λευκωματίνη (αλβουμίνη) και σφαιρίνες (γλοβουλίνες). Επιτελούν πολλές ζωτικές φυσιολογικές λειτουργίες, εντελώς διαφορετικές από εκείνες των πρωτεϊνών των ιστών. Οι πρωτεΐνες του ορού διαχωρίζονται στο εργαστήριο με τη μέθοδο της **ηλεκτροφόρησης**, αξιολογώντας βασικές ιδιότητές τους.
- **Λιπίδια** καλούνται όλα τα λίπη και τα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στο αίμα και τους ιστούς του σώματος και προέρχονται από τα λίπη των τροφών ή από εκείνα που συνθέτονται στο ήπαρ. Λιπίδια όπως η **χοληστερόλη**, οι εστέρες της χοληστερόλης, τα **τριγλυκερίδια**, τα φωσφολιπίδια, οι λιποπρωτεΐνες και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, περιέχονται στο αίμα σε διάφορες συγκεντρώσεις και χρησιμοποιούνται για την κάλυψη ενεργειακών αναγκών, το σχηματισμό στεροειδών ορμονών και τη συγκρότηση των κυτταρικών μεμβρανών. Μπορεί επίσης να εναποθηκευτούν για να χρησιμοποιηθούν αργότερα. Ο εργαστηριακός τους προσδιορισμός (συνήθως με **ενζυμικές μεθόδους**) προϋποθέτει νηστεία για 12-14 ώρες από τον εξεταζόμενο.

## ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

### ΘΕΩΡΙΑ

- 1) Τι είναι η γλυκονεογένεση;
- 2) Τι είναι ο σακχαρώδης διαβήτης ; Ποιες οι συνέπειές του μακροχρόνια;
- 3) Ποιοι θεωρούνται υπογλυκαιμικοί παράγοντες και ποιοι υπεργλυκαιμικοί;
- 4) Πού βασίζεται η δοκιμασία ανοχής γλυκόζης;
- 5) Γιατί όταν θέλουμε να δούμε πόσο καλή είναι η ρύθμιση της γλυκόζης στο αίμα για μεγάλο χρονικό διάστημα σε διαβητικούς, χρησιμοποιούμε την περιοδική μέτρηση της γλυκοαιμοσφαιρίνης;
- 6) Ποιες είναι οι βασικότερες λειτουργίες των πρωτεϊνών του πλάσματος;
- 7) Ποιος ο ρόλος της λευκωματίνης στον οργανισμό και ποιος ο ρόλος των σφαιρινών;
- 8) Πώς διακρίνονται οι λιποπρωτεΐνες;
- 9) Τι αντιπροσωπεύει ο αθηρογενετικός ή αθηρωματικός δείκτης; Πού μας βοηθά το να γνωρίζουμε την τιμή του;
- 10) Τι είναι η αρτηριοσκλήρωση; Ποια αγγεία προσβάλλονται από αυτήν συνήθως;

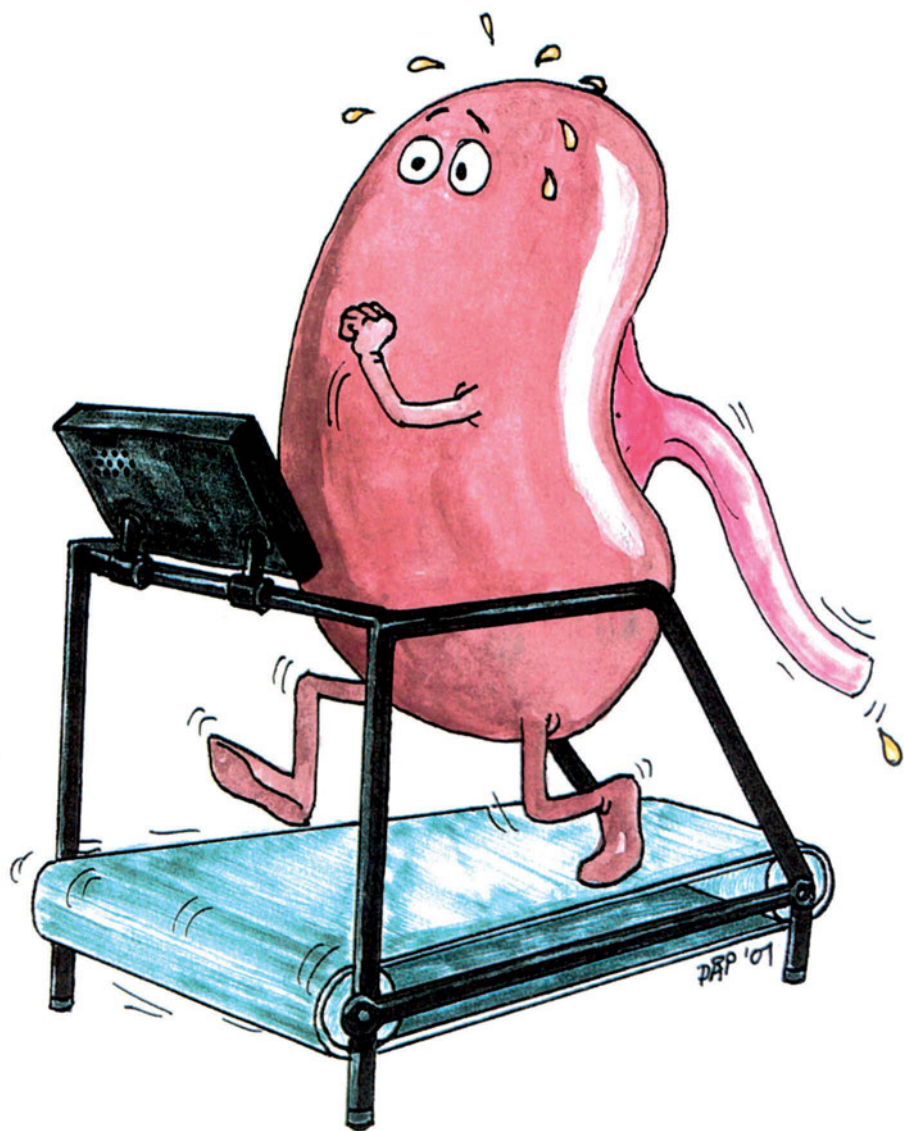
### Ερωτήσεις (θέματα) για συζήτηση

- Τι είναι οι ακτινοσκοιερές ουσίες;
- Τι είναι η υπερφυγοκέντρωση;
- Τι είναι οι μονοσακχαρίτες, τι οι δισακχαρίτες; Τι είναι η κοινή ζάχαρη;
- Τι ξέρετε για τον αθηρωματικό δείκτη;
- Τι εννοούμε με τον όρο «ομοιοστατική ρύθμιση»;

### ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

- 1) Ποια είναι η αρχή ενζυμικού προσδιορισμού της γλυκόζης αίματος;
- 2) Ποια η αρχή του ενζυμικού προσδιορισμού της χοληστερόλης ορού;
- 3) Πώς γίνεται η συλλογή του δείγματος αίματος για τον προσδιορισμό χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων;
- 4) Ποια η αρχή του ενζυμικού προσδιορισμού των τριγλυκεριδίων ορού;
- 5) Πώς γίνεται η αξιοποίηση (εφαρμογή) των ιδιοτήτων των λευκωμάτων στην ηλεκτροφόρηση του ορού;
- 6) Ποια τα απαραίτητα σκεύη και αντιδραστήρια για την ηλεκτροφόρηση λευκωμάτων;
- 7) Με ποιους τρόπους και σε ποια όργανα γίνεται η μέτρηση των κλασμάτων των λευκωμάτων στην ηλεκτροφόρηση λευκωμάτων;
- 8) Ηλεκτροφόρηση λευκωμάτων:
  - α. Με ποια σειρά εμφανίζονται τα κλάσματα λευκωμάτων πάνω στην ταινία οξικής κυτταρίνης ανάμεσα στην κάθοδο και την άνοδο;
  - β. Από ποια στοιχεία καταλαβαίνουμε μακροσκοπικά αν μια ηλεκτροφόρηση είναι φυσιολογική ή όχι; (χωρίς μέτρηση κλασμάτων).

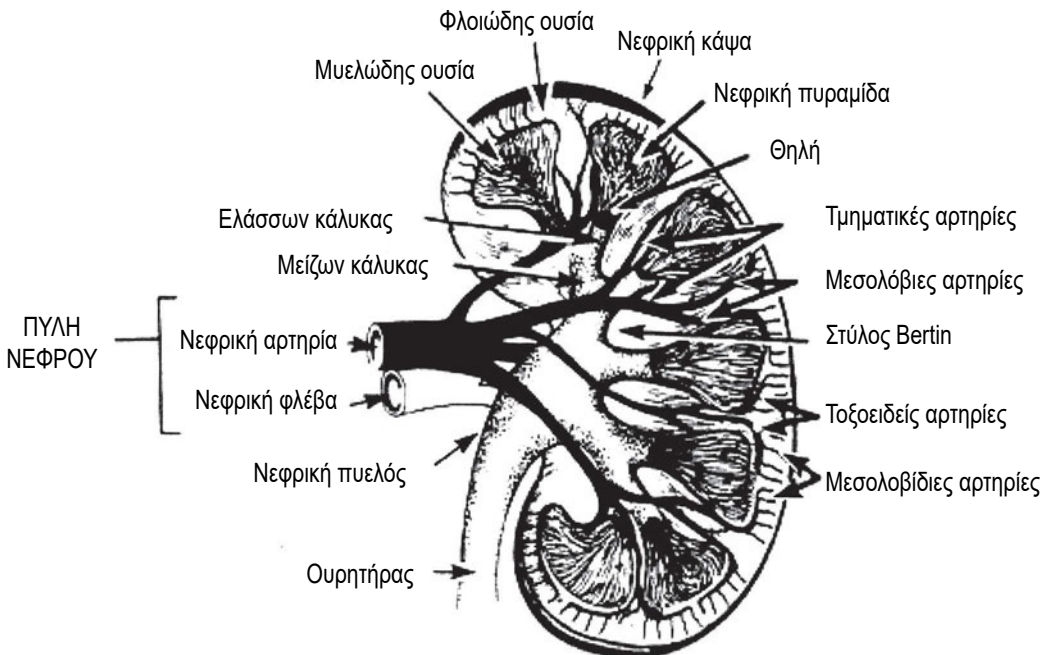
Έλεγχος νεφρικής λειτουργίας **κεφ.3**



## 4.1 ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Η κύρια λειτουργία των νεφρών είναι η διατήρηση της σύστασης, του pH και του όγκου του εξωκυτταρικού υγρού και παράλληλα η αποβολή με τα ούρα προϊόντων του μεταβολισμού, όπως είναι η ουρία, η κρεατινίνη και το ουρικό οξύ. Η λειτουργία αυτή επιτελείται από τις λειτουργικές μονάδες των νεφρών, τους νεφρώνες. Τα μικροσκοπικά αυτά μορφώματα μεταβάλλουν τον όγκο, τη συγκέντρωση και τα συστατικά των ούρων σε μια βάση, λεπτό προς λεπτό, σύμφωνα με τις ανάγκες του οργανισμού. Κάθε νεφρός περιέχει 1-1,5 εκατομμύριο νεφρώνες. Ένας νεφρώνας αποτελείται από δύο κύρια τμήματα, το **νεφρικό** ή **μαλπιγιανό σωματίο** και το **ουροφόρο σωληνάριο**. Στα νεφρικά σωματίδια γίνεται υπερδιήθηση υγρού από το πλάσμα, ενώ στα ουροφόρα σωληνάρια ελαττώνεται δραστικά ο όγκος του υγρού που διηθήθηκε και τροποποιείται η σύστασή του.

Ο σχηματισμός των ούρων περιλαμβάνει τρεις διακριτές λειτουργίες: τη σπειραματική διήθηση, τη σωληναριακή επαναρρόφηση και τη σωληναριακή απέκκριση.



4.1 Σχηματική παράσταση των μορφολογικών στοιχείων του νεφρού, όπως εμφανίζονται σε μια κατά μήκος διατομή του. (Από το βιβλίο του Α. Τρακατέλλη, Βιοχημεία, Τόμος Β', Μέρος 10, 1992).

Ο ταυτόχρονος προσδιορισμός μερικών από τις ενώσεις μη πρωτεϊνικού αζώτου που προαναφέρθηκαν (ουρία, κρεατινίνη και ουρικό οξύ), βοηθά στην εκτίμηση της νεφρικής λειτουργίας, επειδή οι ουσίες αυτές συσσωρεύονται στο αίμα ασθενών με νεφρική πάθηση, που οφείλεται σε κάποια βλάβη στο σύστημα διήθησης. Οι συγκεντρώσεις τους είναι ένας οδηγός για την εκτίμηση του βαθμού και της έκτασης της νεφρικής βλάβης. Ωστόσο οι προσδιορισμοί τους δεν αντικαθιστούν πλήρως τις ειδικές δοκιμασίες ελέγχου της νεφρικής λειτουργίας.

### 4.1.1 ΔΙΑΦΟΡΑ ΣΤΙΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Οι προσδιορισμοί των ενώσεων του μη πρωτεϊνικού αζώτου (ουρία, κρεατινίνη, ουρικό οξύ) στο αίμα και στα ούρα χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της νεφρικής λειτουργίας. Η πιο αξιόπιστη από αυτές τις εξετάσεις θεωρείται ο προσδιορισμός της κρεατινίνης, επειδή τα επίπεδά της στον ορό παραμένουν σε μεγάλο βαθμό σταθερά για κάθε άτομο και δεν επηρεάζονται από την πρόσληψη πρωτεϊνών με την τροφή. Αντίθετα οι τιμές της ουρίας ποικίλλουν στα υγιή άτομα καθώς επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, όπως από την πρόσληψη πρωτεϊνών με την τροφή. Να σημειωθεί ότι σε χρόνια νεφρική νόσο η ουρία παρά η κρεατινίνη συσχετίζεται περισσότερο με τα συμπτώματα της ουραιμίας.

#### Επιπλέον πληροφορίες

- Οι **ειδικές δοκιμασίες ελέγχου της νεφρικής λειτουργίας** είναι: η δοκιμασία πλασματικής κάθαρσης που ελέγχει τη σπειραματική διήθηση, η δοκιμασία συμπίκνωσης των ούρων που ελέγχει τη σωληναριακή επαναρρόφηση και η δοκιμασία φαινολοσουλφονοφθαλείνης που ελέγχει τη νεφρική αιμάτωση και την απεκκριτική ικανότητα των νεφρικών σωληναρίων (η οποία έχει εγκαταλειφθεί).
- Όταν η σπειραματική διήθηση μειωθεί σημαντικά κάτω από 5 mL/min (Φυσ. Τιμές: Άνδρες 107-141 mL/min, Γυναίκες 87-132 mL/min), η συντηρητική θεραπεία δεν μπορεί να ελέγξει τις εκδηλώσεις της ουραιμίας και υπάρχει μεγάλος κίνδυνος θανατηφόρων επιπλοκών. Στους ασθενείς αυτούς γίνεται υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας με περιοδική **αιμοκάθαρση με τεχνητό νεφρό** ή περιτοναϊκή κάθαρση. Σήμερα η μεγάλη ηλικία και διάφορα συστηματικά νοσήματα δεν αποτελούν αντένδειξη για αιμοκάθαρση εξαιτίας της μεγάλης εξέλιξης των μεθόδων αυτών και της προηγμένης τεχνολογίας που εφαρμόζεται. Ένδειξη άμεσης έναρξης της αιμοκάθαρσης αποτελεί η μεγάλη αύξηση των αζωτούχων ουσιών στο αίμα (ουρία, κρεατινίνη). Η διαδικασία της αιμοκάθαρσης γίνεται συνήθως με τη χρήση τεχνητού νεφρού, τρεις φορές την εβδομάδα. Το χρονικό διάστημα που απαιτείται για κάθε αιμοκάθαρση, είναι περίπου τέσσερις ώρες.

## 4.2 ΟΥΡΙΑ

### ΓΕΝΙΚΑ

Η ουρία, το κύριο τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πρωτεϊνών και των αμινοξέων, σχηματίζεται στο ήπαρ και μεταφέρεται από το αίμα στους νεφρούς για απέκκριση στα ούρα. Επομένως οι συγκεντρώσεις της ουρίας στο αίμα και στα ούρα επηρεάζονται άμεσα από τη λήψη πρωτεϊνών με τις τροφές και τον καταβολισμό τους, από το βαθμό παραγωγής ουρίας στο ήπαρ και από το βαθμό απομάκρυνσης της ουρίας από τους νεφρούς.

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Ο σχηματισμός της ουρίας γίνεται στο ήπαρ των ουριοτελικών ζώων. Ο δρόμος βιοσύνθεσης της ουρίας είναι κυκλικός και ονομάζεται κύκλος της ουρίας. Ο κύκλος της ουρίας αποτελεί τον κύριο τρόπο αποτοξίνωσης από την αμμωνία, η οποία παράγεται κατά τη διάρκεια της πέψης και του καταβολισμού των πρωτεϊνών.

Οι φυσιολογικές και κλινικές σημαντικές τιμές (**τιμές αναφοράς**) για την ουρία στο αίμα και τα ούρα είναι:

#### ΦΤ Ουρίας αίματος

10 - 50 mg / dL

#### ΦΤ Ουρίας ούρων

12 - 36 g / 24h

### ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Αζωθαιμία είναι ένας βιοχημικός όρος που αναφέρεται σε οποιαδήποτε σημαντική αύξηση στο πλάσμα της συγκέντρωσης των ενώσεων μη πρωτεϊνικού αζώτου, κυρίως της ουρίας και της κρεατινίνης. Η αζωθαιμία διακρίνεται σε προνεφρική (αφυδάτωση, shock, ελαττωμένος όγκος αίματος, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια), νεφρική (ελαττωμένη σπειραματική διήθηση και επομένως κατακράτηση ουρίας ως αποτέλεσμα οξείας ή χρόνιας νεφρικής πάθησης) και μετανεφρική (είναι συνήθως το αποτέλεσμα απόφραξης των ουροφόρων οδών).

Ουραιμία είναι ένα κλινικό σύνδρομο που μπορεί να παρατηρηθεί σε παρατεταμένη βαριά αζωθαιμία και περιλαμβάνει οξέωση, διαταραχή του ισοζυγίου του νερού και των ηλεκτρολυτών, ναυτία, εμετό, αναιμία, νευροψυχιατρικές αλλαγές και μια ποικιλία άλλων κλινικών εκδηλώσεων που μπορεί να καταλήξουν και σε κώμα.

### 4.2.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΥΡΙΑΣ

#### ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ-ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Οι προσδιορισμοί της ουρίας στο αίμα πραγματοποιούνται στον ορό, δηλ. απαιτούν ένα δείγμα αίματος που συλλέγεται χωρίς αντιπηκτικά. Αν και δείγματα πλάσματος μπορεί επίσης



## Έλεγχος νεφρικής λειτουργίας **κεφ.4**

να χρησιμοποιηθούν για προσδιορισμούς ουρίας, δεν θα πρέπει να συλλέγονται χρησιμοποιώντας τα διπλά οξαλικά άλατα ως αντιπηκτικά, επειδή αυτά περιέχουν αμμώνιο, το οποίο μπορεί να δώσει ανακριβή αποτελέσματα κατά τον προσδιορισμό της ουρίας. Τα δείγματα ολικού αίματος για τον προσδιορισμό της ουρίας μπορεί να διατηρηθούν σε ψυγείο μέχρι 72 ώρες, χωρίς να προκληθούν σημαντικές αλλαγές στις συγκεντρώσεις της ουρίας. Τα δείγματα ορού και πλάσματος μπορεί να διατηρηθούν στο ψυγείο επί μία περίπου εβδομάδα μετά το χωρισμό τους από τα κύτταρα ή να μείνουν στην κατάψυξη επί ένα μήνα χωρίς σημαντικές αλλαγές στις τιμές της ουρίας.



Η μέτρηση των συγκεντρώσεων της ουρίας **στα ούρα** απαιτεί ένα δείγμα 50–100 mL από το ολικό δείγμα ούρων 24 h. Τα δείγματα των ούρων είναι ειδικά ευαίσθητα σε απώλεια ουρίας, που οφείλεται σε διάσπασή της από μικρόβια και για το λόγο αυτόν τα δείγματα πρέπει να παραδίδονται στο εργαστήριο αμέσως για γρήγορη μέτρηση της ουρίας. Για τον προσδιορισμό της ουρίας στα ούρα γίνεται αραίωση του δείγματος των ούρων με απεσταγμένο νερό, σύμφωνα με τις οδηγίες του σετ, και το αποτέλεσμα πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή αραίωσης.

Για να εξασφαλίσουμε ακριβείς προσδιορισμούς ουρίας, αναβάλλουμε τη συλλογή του δείγματος, όποτε είναι δυνατό, αν ο ασθενής παίρνει οποιαδήποτε φάρμακα τα οποία έχουν τοξική ενέργεια στο νεφρό.

### ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ

Σήμερα χρησιμοποιούνται ενζυμικές μέθοδοι (μέθοδος ουρεάσης) είτε με τη χρήση φωτομέτρου είτε με τη χρήση αυτόματων βιοχημικών αναλυτών. Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές της μεθόδου ουρεάσης, από τις οποίες οι πιο σύγχρονες χρησιμοποιούν το συνένζυμο NADH-NAD<sup>+</sup>.

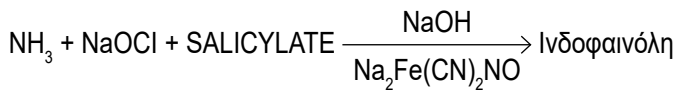
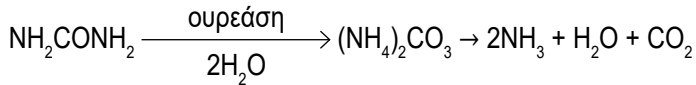
Η συγκέντρωση της ουρίας στα βιολογικά υγρά συνήθως εκφράζεται ως άζωτο ουρίας αίματος (**BUN** = Blood Urea Nitrogen) στις Η.Π.Α. και ως ουρία στην Ευρώπη (τιμή ουρίας = τιμή BUN x 2,14).

### 4.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΥΡΙΑΣ (Μέθοδος ουρεάσης)

#### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

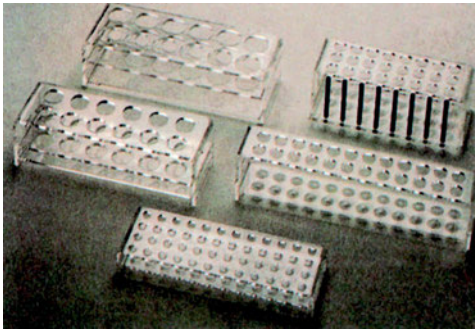
Η ουρία διασπάται σε αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα με τη δράση του ενζύμου ουρεάση. Η αμμωνία που παράγεται κατά την αντίδραση αντιδρά σε αλκαλικό περιβάλλον με σαλικυλικό άλας και υποχλωριώδες νάτριο προς σχηματισμό μιας χρωματιστής

ένωσης, της ινδοφαινόλης, παρουσία νιτροπρωσσικού νατρίου ως καταλύτη (αντίδραση BERTHELOT). Ο σχηματισμός του χρώματος είναι ανάλογος προς την ποσότητα ουρίας στο δείγμα του αίματος και μετρείται φωτομετρικά. Πιο αναλυτικά, ο ενζυμικός προσδιορισμός ακολουθεί τις παρακάτω αντιδράσεις:



### ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- ▶ Σωληνάρια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- ▶ Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληναρίων.
- ▶ Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- ▶ Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέττες.



4.3 Στατώ για σωληνάρια



4.2 Αυτόματη πιπέττα σταθερού όγκου (100 µL) με ρύγχος μιας χρήσης.

- ▶ Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- ▶ Φωτόμετρο αυτόματο.
- ▶ Ανακινητής σωληναρίων (Vortex).
- ▶ Υδατόλουτρο.
- ▶ Parafilm.
- ▶ Γάντια και υαλογράφος.
- ▶ 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό ουρίας.

# Έλεγχος νεφρικής λειτουργίας **κεφ.4**

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1) Ουρεάση, νιτροπρωσσικό Na, σαλικυλικό άλας
- 2) Υποχλωριώδες Na, NaOH
- 3) Πρότυπο διάλυμα (standard) ουρίας : 50 mg/dL
- 4) Απεσταγμένο νερό.

*ΠΡΟΣΟΧΗ: τα αντιδραστήρια είναι καυστικά.*

## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Διαλύουμε (σε σκοτεινή φιάλη) τα αντιδραστήρια 1 και 2 με 250 mL απεσταγμένο νερό.
- Διατηρούνται διαλυμένα στο ψυγείο 21 μέρες και 5 μήνες αντίστοιχα.
- Το πρότυπο διάλυμα (Standard) είναι έτοιμο.

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:

	E	St	T
Αντιδραστήριο 1	2500 $\mu$ L	2500 $\mu$ L	2500 $\mu$ L
Πρότυπο διάλυμα	-	20 $\mu$ L	-
Ορός ή πλάσμα	20 $\mu$ L	-	-

όπου: E=εξεταστέο  
St=standard  
T=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάρια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινητή.
- Παραμονή 10' σε θερμ. δωματίου (στους 20-25 °C) ή 5' σε 37 °C (Υδατόλουτρο).
- Με πιπέττα προσθέτουμε στα σωληνάρια\*:

	E	St	T
Αντιδραστήριο 2	2500 $\mu$ L	2500 $\mu$ L	2500 $\mu$ L
Πρότυπο διάλυμα	-	20 $\mu$ L	-
Ορός ή πλάσμα	20 $\mu$ L	-	-

- Σκεπάζουμε τα σωληνάρια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινητή.
- Παραμονή 10' σε θερμ. δωματίου (στους 20-25 °C) ή 5' σε 37 °C (Υδατόλουτρο).
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέττες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 600 nm ( $\pm$  10 nm).
- Το χρώμα παραμένει σταθερό για 2 ώρες.



\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

$$C \text{ ουρίας σε mg / dL} = C_{ST} \times \frac{A_{(E)}}{A_{(ST)}}$$

**ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)** Στον ορό: 10-50 mg/dL  
**ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ** Μέχρι 300 mg/dL.

## 4.3 ΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ

### ΓΕΝΙΚΑ

Το ουρικό οξύ είναι το τελικό προϊόν του καταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο, το δαλματικό σκύλο, τα πουλιά και σε ορισμένα αμφίβια, το οποίο αποβάλλεται τελικά στο περιβάλλον.



### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Ο μεταβολισμός των πουρινών γίνεται στο μυελό των οστών, τους μύς και το ήπαρ. Η προέλευση των πουρινών του οργανισμού είναι είτε ενδογενής από τη διάσπαση των κυτταρικών νουκλεϊκών οξέων είτε εξωγενής από τις σύμπλοκες νουκλεοπρωτεΐνες που περιέχονται στις τροφές. Το ουρικό οξύ, που παράγεται κάθε ημέρα από το μεταβολισμό των πουρινών και νουκλεοπρωτεϊνών, περνά στην κυκλοφορία του αίματος και απεκκρίνεται ελεύθερα στα ούρα.

Οι συγκεντρώσεις του ουρικού οξέος στον ορό και τα ούρα εξαρτώνται από τη νεφρική λειτουργία καθώς και από το βαθμό του μεταβολισμού των πουρινών και από την πρόσληψη τροφών πλούσιων σε πουρίνες, όπως είναι τα όσπρια, τα μανιτάρια, το σπανάκι, οι φράουλες, ο καφές, το τσάι, το κακάο και το κρέας, ιδιαίτερα το ήπαρ και το πάγκρεας. Το ποσό του ουρικού οξέος που απεκκρίνεται εξαρτάται από το βαθμό παραγωγής του και από την επάρκεια της νεφρικής λειτουργίας και ειδικά της σπειραματικής διήθησης και της σωληναριακής έκκρισης.

Οι **τιμές αναφοράς** (φυσιολογικές τιμές - Φ.Τ.) του ουρικού οξέος στον ορό είναι:

#### ΦΤ Ουρικού οξέος ορού

Ανδρες 4,0 – 8,0 mg/dL  
 Γυναίκες 2,5 – 7,5 mg/dL

#### ΦΤ Ουρικού οξέος ούρων

Διατροφή φτωχή σε πουρίνες 0,25 – 0,5 g/24 h  
 Κανονική διατροφή σε πουρίνες 0,4 – 0,8 g/24 h

### ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Βαριά νεφρική πάθηση και βλάβη της νεφρικής λειτουργίας, που ελαττώνουν την απέκκριση του ουρικού οξέος, είναι τα πιο συχνά αίτια αυξημένων συγκεντρώσεων ουρικού

οξέος στον ορό (*υπερουρικαιμία*). Η *δευτεροπαθής υπερουρικαιμία*, που οφείλεται στη νεφρική ανεπάρκεια, είναι το πιο συχνό αίτιο αύξησης του ουρικού οξέος παρά η *πρωτοπαθής υπερουρικαιμία*, η οποία οφείλεται σε γενετικές διαταραχές του μεταβολισμού που περιλαμβάνουν το μεταβολισμό των πουρινών, όπως στην πρωτοπαθή ουρική αρθρίτιδα.

Στο πλάσμα το ουρικό οξύ υπάρχει κυρίως ως ουρικό μονονάτριο. Τόσο το ουρικό οξύ όσο και τα άλατά του είναι σχετικά δυσδιάλυτα στο νερό. Για το λόγο αυτόν αυξημένες συγκεντρώσεις του ουρικού οξέος στον ορό και τα ούρα μπορεί να έχουν σοβαρές συνέπειες, εξαιτίας του σχηματισμού κρυστάλλων στους νεφρούς και στις ουροφόρους οδούς. Το ουρικό οξύ επίσης εμφανίζεται στο αρθρικό υγρό ασθενών με **ουρική αρθρίτιδα** και προκαλεί εναποθέσεις κρυστάλλων ουρικού νατρίου (τόφοι). Οι χαρακτηριστικοί αυτοί τόφοι εμφανίζονται συχνότερα γύρω από τις αρθρώσεις των άκρων.

### 4.3.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΥΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

#### ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ-ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Οι προσδιορισμοί του ουρικού οξέος στον **ορό** απαιτούν ένα δείγμα αίματος που συλλέγεται χωρίς αντιπηκτικά. Ο προσδιορισμός των επιπέδων του ουρικού οξέος στα **ούρα** απαιτεί ένα δείγμα 50 mL από το ολικό δείγμα ούρων 24 h, το οποίο έχει διατηρηθεί στο ψυγείο κατά τη διάρκεια ολόκληρης της περιόδου συλλογής των ούρων. Όταν οι προσδιορισμοί του ουρικού οξέος δεν μπορεί να εκτελεστούν αμέσως, τα δείγματα του ορού και των ούρων μπορεί να παραμείνουν σταθερά επί μία τουλάχιστο εβδομάδα στο ψυγείο ή επί ένα μήνα στην κατάψυξη. Για τον υπολογισμό του ουρικού οξέος στα ούρα το αποτέλεσμα της μέτρησης πολλαπλασιάζεται επί 10, επειδή τα ούρα έχουν αραιωθεί 1:10 με απεσταγμένο νερό.

Για να εξασφαλίσουμε ακριβή αποτελέσματα στον προσδιορισμό του ουρικού οξέος, αναβάλλουμε τη συλλογή του δείγματος, όποτε είναι δυνατό, σε ασθενείς που έχουν πάρει ορισμένα φάρμακα τις τελευταίες 24 ώρες. Ψευδώς αυξημένες τιμές ουρικού οξέος μπορεί να παρατηρηθούν σε ορισμένες μεθόδους, όταν υπάρχουν στο αίμα μεγάλα ποσά αναγωγικών ουσιών, όπως είναι τα σάκχαρα εκτός από τη γλυκόζη και μια ποικιλία φαρμάκων, όπως είναι το ασκορβικό οξύ, L-dopa και methylidopa, εξαιτίας της υπερβολικής αναγωγής των αντιδραστηρίων των μεθόδων αυτών.

#### ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ

Οι περισσότερες μέθοδοι βασίζονται στην οξειδωση του ουρικού οξέος προς αλλαντοΐνη είτε με χημικά αντιδραστήρια είτε ενζυμικά.

Παρά τις πολυάριθμες τροποποιήσεις της βασικής χρωματομετρικής μεθόδου, που είχαν σκοπό τη βελτίωση της ευαισθησίας και εξειδίκευσης, η οξειδωση του ουρικού οξέος με τη χρήση του ενζύμου ουρικάση παραμένει η πιο ειδική μέθοδος που υπάρχει.

Η ενζυμική μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι το ουρικό οξύ έχει μια χαρακτηριστική απορρόφηση στα 293nm, ενώ το προϊόν της οξειδωσης, η αλλαντοΐνη, δεν απορροφά σ' αυτό το μήκος κύματος. Έτσι η διαφορά στην απορρόφηση πριν και μετά τη δράση της ουρικής στο δείγμα, είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση του ουρικού οξέος. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι ότι αποφεύγει την καθίζηση των πρωτεϊνών και έχει μεγαλύτερη ευαισθησία και εξειδίκευση. Πολλές τροποποιήσεις της μεθόδου αυτής υπάρχουν, κατά τις οποίες το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, συνδέεται με μια άλλη οξειδωτική αντίδραση, ώστε να παραχθεί μια έγχρωμη ένωση από την οξειδωση ενός χρωμογόνου.

Στη χρωματομετρική μέθοδο το ουρικό οξύ προσδιορίζεται, μετά από απολευκωμάτωση, στο ελεύθερο πρωτεϊνών υπερκείμενο του ορού, με αναγωγή του φωσφοροβολφραμικού νατρίου σε αλκαλικό περιβάλλον προς μία σύμπλοκη ένωση του βολφραμίου που έχει κυανό χρώμα και μετρείται φωτομετρικά.

### 4.3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΥΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (Ενζυμική μέθοδος)

#### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το ουρικό οξύ με τη δράση του ενζύμου ουρική οξειδώνεται προς αλλαντοΐνη, CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, που σχηματίζεται κατά την αντίδραση, μετατρέπεται με τη δράση του ενζύμου υπεροξειδάση ένα χρωμογόνο προς έγχρωμη σύμπλοκη ένωση που μετρείται φωτομετρικά. Η ένταση του χρώματός της (άρα και η απορρόφηση φωτός που κάνει αυτό) είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ουρικού οξέος στο δείγμα. Πιο αναλυτικά, ο ενζυμικός προσδιορισμός ακολουθεί τις παρακάτω αντιδράσεις :



#### ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- ▶ Σωληνάκια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- ▶ Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληνάρων.
- ▶ Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- ▶ Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέττες.
- ▶ Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.

# Έλεγχος νεφρικής λειτουργίας **κεφ.4**

- ▶ Φωτόμετρο αυτόματο.
- ▶ Ανακινήτης σωληναρίων (Vortex).
- ▶ Υδατόλουτρο.
- ▶ Parafilm.
- ▶ Γάντια και υαλογράφος.
- ▶ 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό ουρικού οξέος.



4.5 Σωληνάρια σε στατώ

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1) Buffer με pH 7,5 / θειϊκό άλας διχλωρο 2-4-φαινόλης
- 2) 4-αμινο-αντιπιρρίνη / υπεροξειδάση / ουρικάση (λυοφιλοποιημένα)
- 3) Πρότυπο διάλυμα (standard) ουρικού οξέος: 6 mg/dL

## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Διαλύουμε το αντιδραστήριο 2 στο 1.

Παραμένει διαλυμένο για 2 εβδομάδες στο ψυγείο (2-8 °C)

Πριν την εκτέλεση πρέπει να το αφήσουμε να πάρει τη θερμοκρασία της αντίδρασης.

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:

	E	St	T
Αντιδραστήριο 1+2	2000 $\mu$ L	2000 $\mu$ L	2000 $\mu$ L
Πρότυπο διάλυμα	-	50 $\mu$ L	-
Ορός ή πλάσμα	50 $\mu$ L	-	-

όπου: E=εξεταστέο  
St=standard  
T=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάρια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινήτη.
- Παραμονή 15' σε θερμ. δωματίου (στους 20-25 °C) ή 5' σε 37 °C (Υδατόλουτρο).
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέτες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 510 nm.
- Το χρώμα παραμένει σταθερό για 30'.



4.6 Φωτομέτρηση σε αυτόματο φωτόμετρο

\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

$$C \text{ ουρικού οξέος σε mg / dL} = C_{ST} \times \frac{A_{(E)}}{A_{(ST)}}$$

### ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)

Ανδρες: 4,0 – 8, 0 mg/dL. Γυναίκες: 2,5 – 7,5 mg/dL.

**ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ** έως 25 mg/dL.

## 4.4 ΚΡΕΑΤΙΝΙΝΗ

### ΓΕΝΙΚΑ

Η κρεατινίνη είναι το τελικό μεταβολικό προϊόν της ενέργειας που απελευθερώνεται από τη φωσφοκρεατινή, η οποία παίζει ρόλο αποθήκης χημικής ενέργειας στα κύτταρα των σκελετικών μυών.

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η κρεατινίνη υπάρχει στο αίμα σε συγκεντρώσεις ανάλογες προς την ολική μάζα των σκελετικών μυών του σώματος και συνήθως απεκκρίνεται ελεύθερα στα ούρα. Τα επίπεδα της κρεατινίνης στον ορό παραμένουν σε μεγάλο βαθμό σταθερά για κάθε άτομο, επειδή δεν επηρεάζονται σημαντικά από τη λήψη πρωτεϊνών με τις τροφές, τη μυϊκή άσκηση, τη λήψη νερού και το βαθμό παραγωγής των ούρων. Η κρεατινίνη απομακρύνεται από την κυκλοφορία του αίματος από τους νεφρούς και απεκκρίνεται στα ούρα σε ποσά παραπλήσια με εκείνα της παραγωγής της.

Οι **τιμές αναφοράς** (φυσιολογικές τιμές-Φ.Τ.) της κρεατινίνης στον ορό και στα ούρα είναι:

#### ΦΤ Κρεατινίνης ορού

Παιδιά <0,6 mg/dL

Ανδρες 0,6 – 1,5 mg/dL

Γυναίκες 0,5 – 1,0 mg/dL

#### ΦΤ Κρεατινίνης ούρων

Ανδρες 1,0 – 2,0 g/24h

20-26 mg/kg σωματικού βάρους/24h

Γυναίκες 0,6 – 1,5 g/24 h

14-22 mg/kg σωματικού βάρους/24h

### ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Οι προσδιορισμοί της κρεατινίνης στον ορό και τα ούρα χρησιμοποιούνται ως μια συνήθης εξέταση ρουτίνας για τον έλεγχο της νεφρικής λειτουργίας. Άτομα με νεφρικές ανωμαλίες και ουραιμία κατακρατούν την κρεατινίνη στο αίμα τους, επειδή έχουν χαμηλές τιμές νεφρικής κάθαρσης, και μπορεί να εμφανίσουν πολύ υψηλά επίπεδα κρεατινίνης στον ορό. Οι τιμές της κρεατινίνης στον ορό χρησιμοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά για τη διάγνωση και την παρακολούθηση νεφρικής πάθησης, ενώ οι προσδιορισμοί της

## Έλεγχος νεφρικής λειτουργίας **κεφ.4**

κρεατίνης στα ούρα εκτελούνται πολύ συχνά ως ένα μέρος της δοκιμασίας πλασματικής κάθαρσης (clearance) της κρεατίνης.

Τα επίπεδα της κρεατίνης στον ορό δείχνουν το ισοζύγιο μεταξύ παραγωγής και απέκκρισης της κρεατίνης και αντανakλούν την επάρκεια της σπειραματικής διήθησης και της ενεργητικής σωληναριακής έκκρισης. Από την άλλη μεριά τα επίπεδα της κρεατίνης στα ούρα είναι ένα μέτρο του ποσού του ενεργού μυϊκού ιστού στο σώμα και όχι του βάρους του σώματος. Έτσι, άτομα με πολύ μεγάλη μυϊκή μάζα ή αυξημένο καταβολισμό των ιστών έχουν υψηλότερες τιμές κρεατίνης στα ούρα παρά άτομα με μικρότερη μυϊκή μάζα.



### 4.4.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΡΕΑΤΙΝΙΝΗΣ

#### ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ-ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Οι προσδιορισμοί της κρεατίνης στον **ορό** απαιτούν ένα δείγμα αίματος που συλλέγεται χωρίς αντιπηκτικά. Οι προσδιορισμοί της κρεατίνης στα **ούρα** απαιτούν ένα δείγμα ούρων 24 h, το οποίο πρέπει να διατηρείται στο ψυγείο σε όλη τη διάρκεια της περιόδου συλλογής των ούρων, επειδή η κρεατίνη είναι ασταθής και εύκολα διασπάται σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα του ορού και των ούρων παραμένουν σταθερά για προσδιορισμούς κρεατίνης επί μία περίπου εβδομάδα, όταν διατηρούνται στο ψυγείο, και επί έναν τουλάχιστο μήνα, όταν διατηρούνται στην κατάψυξη.

Αναβάλλουμε τη συλλογή του δείγματος, όποτε είναι δυνατό, αν ο ασθενής έχει πάρει οποιαδήποτε φάρμακα.

#### ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ

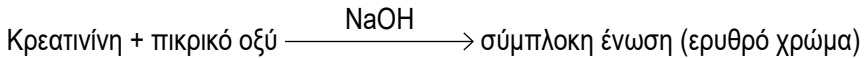
Οι περισσότερες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της κρεατίνης βασίζονται στην αντίδραση μεταξύ της κρεατίνης και του πικρικού οξέος σε αλκαλικό περιβάλλον (αντίδραση JAFFE). Σήμερα έχουν αναπτυχθεί περισσότερο ειδικές μέθοδοι που βασίζονται σε διαφορετική αρχή από την αντίδραση JAFFE, όπως είναι η μέθοδος που χρησιμοποιεί το αντιδραστήριο Lloyd, και ενζυμικές μέθοδοι.

Η ενζυμική μέθοδος για την κρεατίνη δεν απαιτεί την απολευκωμάτωση του ορού και στηρίζεται στην κινητική της ίδιας αντίδρασης με την κλασσική μέθοδο.

## 4.4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΡΕΑΤΙΝΙΝΗΣ (Χρωματομετρική μέθοδος JAFFE)

### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η κρεατινίνη αντιδρά με αλκαλικό διάλυμα πικρικού οξέος, οπότε σχηματίζεται σύμπλοκη ένωση ερυθρού χρώματος, η οποία μετρείται φωτομετρικά. Η ένταση του χρώματος της παραγόμενης ένωσης είναι ανάλογη με το ποσό της κρεατινίνης στο δείγμα. Πιο αναλυτικά, ο προσδιορισμός της κρεατινίνης ακολουθεί την παρακάτω αντίδραση:



### ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- ▶ Σωληνάρια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- ▶ Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληνάριων.
- ▶ Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- ▶ Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέττες.



4.7 Ρύγχη διαφόρων μεγεθών, για τις αυτόματες επαναληπτικές πιπέττες.

- ▶ Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- ▶ Φωτόμετρο αυτόματο.
- ▶ Φυγόκεντρος.
- ▶ Ανακινητής σωληναρίων (Vortex).
- ▶ Parafilm.
- ▶ Γάντια και υαλογράφος.
- ▶ 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό κρεατινίνης.

# Έλεγχος νεφρικής λειτουργίας **κεφ.4**

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Αντιδραστήριο απολευκωμάτωσης (περιέχει τριχλωροξικό οξύ) έτοιμο προς χρήση.
2. Χρωμογόνο (περιέχει NaOH και πικρικό οξύ).
3. Πρότυπο διάλυμα κρεατινίνης (Standard) 2 mg/dL, έτοιμο προς χρήση.
4. Απεσταγμένο νερό.

## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Για το αντιδραστήριο 2 ετοιμάζουμε πριν από τη χρησιμοποίησή του, την ποσότητα που χρειαζόμαστε αναμειγνύοντας ίσους όγκους NaOH και πικρικού οξέος. Μένει σταθερό επί 8 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου μακριά από φως.

Τα αντιδραστήρια πριν από τη χρησιμοποίησή τους πρέπει να είναι σε θερμοκρασία δωματίου.

## ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Χρησιμοποιούμε ως δείγμα **ορό** ή **ούρα** αραιωμένα 1:50 με απεσταγμένο νερό.

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:

	<b>E</b>	<b>St</b>	<b>T</b>
<b>Αντιδρ. απολευκωμάτωσης</b>	2000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
<b>Δείγμα (ορός ή πλάσμα)</b>	1000 $\mu$ L	-	-
<b>Πρότυπο</b>	-	500 $\mu$ L	-
<b>Νερό απεσταγμένο</b>	-	-	500 $\mu$ L

όπου: E=εξεταστέο  
St=standard  
T=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάρια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινητή.



4.8 Επιτραπέζια φυγόκεντρος συσκευή

## ΕΙΔΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟ ΕΞΕΤΑΣΤΕΟ:

- Χρησιμοποιούμε κωνικό σωληνάριο.
- Το αναμειγνύουμε ισχυρά αποφεύγοντας τον αφρό.
- Το αφήνουμε για 5' σε θερμοκρασία δωματίου (στους 20-25 °C) και το φυγοκεντρούμε στις 3000-6000 στροφές/λεπτό επί 10'.
- Χρησιμοποιούμε στη συνέχεια το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης.
- Χρησιμοποιούμε ένα νέο σωληνάριο για εξεταστέο.

	<b>E</b>	<b>St</b>	<b>T</b>
<b>Καθαρό υπερκείμενο</b>	1500 $\mu$ L	-	-
<b>Χρωμογόνο</b>	1500 $\mu$ L	1500 $\mu$ L	1500 $\mu$ L

όπου: E=εξεταστέο  
St=standard  
T=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάκια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινήτη.
- Παραμονή επί 30' σε θερμοκρασία δωματίου (στους 20-25 °C) μακριά από το φως.
- Φωτομετρούμε σε μήκος κύματος 525 nm. Το τελικό χρώμα είναι σταθερό επί 15'.

*\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ*

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ**

$$C \text{ κρεατινίνης σε mg / dL} = C_{ST} \times \frac{A_{(E)}}{A_{(ST)}}$$

Ο υπολογισμός της κρεατινίνης στα ούρα γίνεται με πολλαπλασιασμό της τιμής που μετρήσαμε επί 50, επειδή η αραιώση των ούρων ήταν 1:50.

### **ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)**

Στον ορό: Άνδρες: 0,6-1,5 mg/dL.

Γυναίκες: 0,5-1,0 mg/dL

### **ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ**

#### **Τι είναι απολευκωμάτωση:**

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει στο 1ο κεφάλαιο, οι πρωτεΐνες μπορεί να παρεμποδίσουν την ανάλυση. Για να ελαχιστοποιηθεί αυτή η παρεμβολή, οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με τη μέθοδο της απολευκωμάτωσης πριν την έναρξη της ανάλυσης.

Απολευκωμάτωση είναι η απομάκρυνση των λευκωμάτων από τον ορό με τη μορφή ίζήματος.

Έτσι λοιπόν η μέθοδος γίνεται σε δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση γίνεται η απολευκωμάτωση του ορού με τη βοήθεια του τριχλωροξικού οξέος. Στη δεύτερη η κυρίως αντίδραση μετατροπής της κρεατινίνης σε χρωματιστή ένωση.

#### **Πώς παίρνουμε το υπερκείμενο:**

Η λήψη με πιπέττα, του υπερκείμενου υγρού στο εξεταστέο, πρέπει να γίνει με προσοχή ούτως ώστε:

- \* να μη πάρουμε μαζί και ίζημα,
- \* να μην ανακατευθεί το ίζημα με το υπερκείμενο,
- \* το υπερκείμενο να είναι διαυγές.

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

### **ΝΑ ΜΗΝ ΞΕΧΝΩ:**

- ▶ Η κύρια λειτουργία των **νεφρών** είναι η διατήρηση της σύστασης, του pH και του όγκου του εξωκυτταρικού υγρού και παράλληλα η αποβολή με τα ούρα προϊόντων του μεταβολισμού, όπως είναι η ουρία, η κρεατινίνη και το ουρικό οξύ.
- ▶ Η **ουρία**, το κύριο τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πρωτεϊνών και των αμινοξέων, σχηματίζεται στο ήπαρ και μεταφέρεται από το αίμα στους νεφρούς για απέκκριση στα ούρα.
- ▶ Το **ουρικό οξύ** είναι το τελικό προϊόν του καταβολισμού των πουρινών, το οποίο αποβάλλεται τελικά στο περιβάλλον.
- ▶ Η **κρεατινίνη** είναι το τελικό μεταβολικό προϊόν της ενέργειας που απελευθερώνεται από τη φωσφοκρεατίνη, η οποία παίζει ρόλο αποθήκης χημικής ενέργειας στα κύτταρα των σκελετικών μυών.
- ▶ Ο ταυτόχρονος **προσδιορισμός** μερικών από τις ενώσεις που προαναφέρθηκαν (ουρία, κρεατινίνη και ουρικό οξύ), βοηθά στην εκτίμηση της νεφρικής λειτουργίας, επειδή οι ουσίες αυτές συσσωρεύονται στο αίμα ασθενών με νεφρική πάθηση, που οφείλεται σε κάποια βλάβη στο σύστημα διήθησης.
- ▶ Στη μέθοδο προσδιορισμού κρεατινίνης (JAFFE) προηγείται η **απολευκωμάτωση** του ορού. Η ουρία και το ουρικό οξύ συνήθως μετριοούνται με ενζυμικές μεθόδους.

**ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ****ΘΕΩΡΙΑ**

1. Ποια είναι η κύρια λειτουργία των νεφρών;
2. Ποια είναι τα δυο κύρια τμήματα ενός νεφρώνα και τι επιτελείται στο καθένα;
3. Από τι επηρεάζεται η συγκέντρωση της ουρίας στο αίμα και τα ούρα;
4. Τι είναι ο κύκλος της ουρίας;
5. Τι είναι η αζωθαιμία και πώς διακρίνεται;
6. Τι είναι η ουραιμία και τι περιλαμβάνει;
7. Από τι επηρεάζεται η συγκέντρωση του ουρικού οξέος στο αίμα και τα ούρα;
8. Τι δείχνουν τα επίπεδα της κρεατινίνης του ορού και τι των ούρων;
9. Από τους προσδιορισμούς των ενώσεων μη πρωτεϊνικού αζώτου, ποια εξέταση θεωρείται πιο αξιόπιστη και γιατί;
10. Τι είναι η υπερουρικαιμία και πώς διακρίνεται;

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

1. Ποια η αρχή προσδιορισμού ουρίας αίματος με τη μέθοδο ουρεάσης;
2. Πώς γίνεται η συλλογή του δείγματος των ούρων για τον προσδιορισμό της ουρίας;
3. Ποια η αρχή του ενζυμικού προσδιορισμού του ουρικού οξέος αίματος;
4. Ποια είναι η αρχή προσδιορισμού της κρεατινίνης αίματος; (μέθοδος Jaffe)
5. Πώς γίνεται η απολευκωμάτωση στον προσδιορισμό της κρεατινίνης και τι προσέχουμε ιδιαίτερα στην πράξη; (μέθοδος Jaffe)

Ερωτήσεις  
(θέματα)  
για συζήτηση

Τι είναι οι ενώσεις μη πρωτεϊνικού αζώτου;

Τι εννοούμε με την έννοια «ουριοτελικά» ζώα;

Τι είναι οι πουρίνες;

Τι είναι η κάθαρση κρεατινίνης;

Τι γνωρίζετε για τον τεχνητό νεφρό;



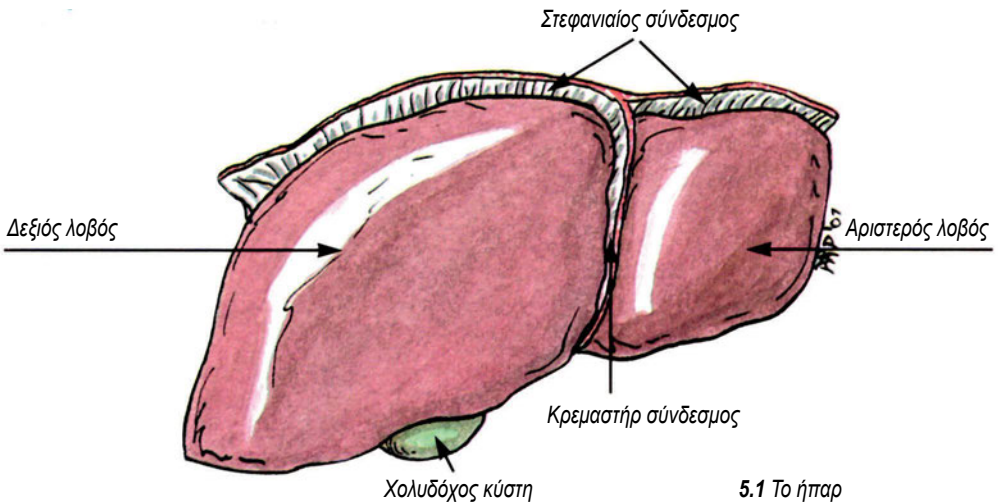
Έλεγχος ηπατικής λειτουργίας **κεφ.5**



## 5.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΗΠΑΤΟΣ

Το ήπαρ είναι το μεγαλύτερο όργανο του σώματος και εκτελεί πολλές σημαντικές βιοχημικές λειτουργίες. Έχει μεγάλη εφεδρική ικανότητα και σχεδόν τα 4/5 του οργάνου μπορούν να αφαιρεθούν χωρίς σοβαρή επίδραση στη λειτουργία του. Μερικές από τις ζωτικές λειτουργίες του είναι:

- Σύζευξη και απέκκριση της χολερυθρίνης
- Αδρανοποίηση αλκοόλης, φαρμάκων και άλλων τοξικών ουσιών
- Μεταβολισμός υδατανθράκων, λιπών και πρωτεϊνών
- Μεταβολισμός σιδήρου
- Μεταβολισμός στεροειδών ορμονών
- Παραγωγή χολής
- Εναποθήκευση γλυκογόνου
- Εναποθήκευση βιταμινών και ιχνοστοιχείων
- Σύνθεση παραγόντων πήξης του αίματος
- Φαγοκυττάρωση με τα κύτταρα Kupffer



## 5.2 ΕΙΔΗ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ

Οι ακόλουθες εργαστηριακές δοκιμασίες χρησιμοποιούνται πιο συχνά για τη διερεύνηση της ηπατικής λειτουργίας:

- ▶ Ένζυμα ορού:
  - Γλουταμική οξαλοξική τρανσαμινάση (GOT) ή Ασπαρτική τρανσαμινάση (AST)
  - Γλουταμική πυρουβική (ή πυροσταφυλική) τρανσαμινάση (GPT) ή Τρανσαμινάση αλανίνης (ALT)
  - Αλκαλική φωσφατάση (ALP)
  - γ-Γλουταμυλοτρανσφεράση (γ-GT)
  - Γαλακτική δεϋδρογονάση (LDH)
  - 5'-Νουκλεοτιδάση
  - Ψευδοχολινεστεράση
- ▶ Χολοχρωστικές:
  - Χολερυθρίνη ορού (ολική, έμμεση και άμεση)
  - Χολερυθρίνη ούρων
  - Ουροχολινογόνο ούρων
  - Ουροχολινογόνο κοπράνων
- ▶ Αντιγόνα και αντισώματα που συνδέονται με ηπατίτιδα
- ▶ Χρόνος προθρομβίνης
- ▶ Πρωτεΐνες ορού:
  - Ολικές πρωτεΐνες
  - Λευκωματίνη
  - Σφαιρίνες
  - Σχέση λευκωματίνης/σφαιρινών
  - Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών του ορού
  - Ινωδογόνο
  - α1-Αντιθρυψίνη
  - Σερουλοπλασμίνη
  - α-Φετοπρωτεΐνη ή α-εμβρυϊκή σφαιρίνη
- ▶ Χοληστερόλη ορού (ολική και εστέρες)
- ▶ Αμμωνία αίματος

Μερικές από τις σημαντικότερες εξετάσεις στον ορό για τον έλεγχο της ηπατικής λειτουργίας είναι οι προσδιορισμοί της χολερυθρίνης και της ενεργότητας των ενζύμων GOT, GPT, γGT, ALP και 5'-νουκλεοτιδάσης.

### 5.3 ΧΟΛΕΡΥΘΡΙΝΗ

#### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η χολερυθρίνη (bilirubin) αποτελεί προϊόν του καταβολισμού της αίμης της αιμοσφαιρίνης, της μυοσφαιρίνης και ορισμένων ενζύμων που περιέχουν αίμη (κυτοχρώματα). Σχηματίζεται στα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (ΔΕΣ), κυρίως στο σπλήνα, το μυελό των οστών και το ήπαρ. Περίπου 250-350 mg χολερυθρίνης παράγονται το εικοσιτετράωρο και κατά 70% προέρχονται από τον καταβολισμό της αιμοσφαιρίνης, που ελευθερώνεται από γερασμένα ή καταστραμμένα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η χολερυθρίνη, που είναι μια μη υδατοδιαλυτή ουσία, εισέρχεται στο πλάσμα και μεταφέρεται στο ήπαρ ως σύμπλεγμα με τη λευκωματίνη (αλβουμίνη). Ένα μικρό μέρος της χολερυθρίνης, που δεν συνδέεται με τη λευκωματίνη, έχει μεγάλη κλινική σημασία, επειδή μπορεί να περνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Από την άλλη μεριά η χολερυθρίνη που συνδέεται με τη λευκωματίνη δεν διηθείται στα μαλπιγιανά σωμάτια και επομένως δεν μπορεί να περάσει στα ούρα. Στο ήπαρ η υδρόφοβη χολερυθρίνη θα συζευχθεί με γλυκουρονικό οξύ και θα δώσει πιο υδρόφιλες ενώσεις καταλληλότερες για αποβολή στα ούρα. Επειδή η ασύζευκτη χολερυθρίνη, που μεταφέρεται με τη λευκωματίνη στο αίμα, δεν αντιδρά άμεσα με το διαζωταντιδραστήριο του Ehrlich (διαζωτωμένο σουλφανιλικό οξύ), αλλά αντιδρά ύστερα από προσθήκη αιθυλικής αλκοόλης, ονομάζεται και έμμεση χολερυθρίνη (indirect bilirubin). Αντίθετα η συζευγμένη χολερυθρίνη, που είναι πιο υδατοδιαλυτή, δίνει αμέσως την αντίδραση και γι' αυτό ονομάζεται και άμεση χολερυθρίνη (direct bilirubin). Η συζευγμένη χολερυθρίνη απεκκρίνεται με τη χολή στο έντερο και φυσιολογικά μόνο πολύ μικρά ποσά ανευρίσκονται στο πλάσμα, όπου δεν ξεπερνά φυσιολογικά τα 1,2 mg/dL.

Στο έντερο η συζευγμένη χολερυθρίνη ανάγεται με μικροβιακή δράση προς ουροχολινογόνο. Περίπου το μισό από το ουροχολινογόνο απεκκρίνεται με τα κόπρανα ως κοπροχολινογόνο, που αποτελεί προϊόν παραπέρα αναγωγής του ουροχολινογόνου. Στον αέρα το κοπροχολινογόνο υφίσταται αυτοοξειδωση προς κοπροχολίνη, στην οποία οφείλεται το χαρακτηριστικό καστανό χρώμα των κοπράνων. Το υπόλοιπο μέρος του ουροχολινογόνου του εντέρου περνά στην κυκλοφορία του αίματος από το σύστημα της πυλαίας φλέβας. Το μεγαλύτερο μέρος του ουροχολινογόνου αυτού, που απορροφήθηκε από το έντερο στο αίμα, επιστρέφει στο ήπαρ και απεκκρίνεται πάλι με τη χολή (εντεροηπατική κυκλοφορία), ενώ ένα πολύ μικρό μέρος απεκκρίνεται στα ούρα, καθώς το αίμα περνά από τους νεφρούς. Το ουροχολινογόνο στα ούρα δίνει με αυτοοξειδωση ουροχολίνη, που συμβάλλει στο χρώμα των ούρων.

Η χολερυθρίνη εθεωρείτο ότι είναι ένα άχρηστο προϊόν καταβολισμού της αίμης. Νεότερες μελέτες όμως έδειξαν ότι, η χολερυθρίνη είναι μια δραστική αντιοξειδωτική ουσία, η οποία μαζί με τη βιταμίνη C και το ουρικό οξύ αποτελούν τα κυριότερα αντιοξειδωτικά μέσα του αίματος. Στις μεμβράνες των κυττάρων η προστατευτική αντιοξειδωτική δράση της χολερυθρίνης είναι το ίδιο αποτελεσματική με αυτή της βιταμίνης E.

# Έλεγχος ηπατικής λειτουργίας **κεφ.5**

Οι **τιμές αναφοράς** (φυσιολογικές τιμές) για τη χολερυθρίνη του ορού είναι:

<b>Ολική χολερυθρίνη</b>		
Ενήλικοι	0,3 - 1,4	mg/dL
Παιδιά	0,2 - 0,8	mg/dL
Νεογνά	1,0 - 12,0	mg/dL
Άμεση χολερυθρίνη	0,1 - 0,4	mg/dL
Έμμεση χολερυθρίνη	0,2 - 0,8	mg/dL

## ΠΙΝΑΚΑΣ: ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΜΕΣΗΣ ΚΑΙ ΕΜΜΕΣΗΣ ΧΟΛΕΡΥΘΡΙΝΗΣ

ΕΜΜΕΣΗ ΧΟΛΕΡΥΘΡΙΝΗ	ΑΜΕΣΗ ΧΟΛΕΡΥΘΡΙΝΗ
Ασύζευκτη χολερυθρίνη	Συζευγμένη χολερυθρίνη
Δεν διηθείται στα μαλπιγιανά σωμάτια και έτσι δεν περνά στα ούρα.	Διηθείται στα μαλπιγιανά σωμάτια και έτσι αποβάλλεται στα ούρα.
Μη υδατοδιαλυτή ουσία	Υδατοδιαλυτή ουσία
Δεν αντιδρά άμεσα με το διαζωταντιδραστήριο του Ehrlich αλλά αντιδρά ύστερα από προσθήκη αιθυλικής αλκοόλης.	Δίνει αμέσως την αντίδραση με το διαζωταντιδραστήριο του Ehrlich.
Δεν απεκκρίνεται με τη χολή στο έντερο.	Απεκκρίνεται με τη χολή στο έντερο όπου ανάγεται προς ουροχολινογόνο που απεκκρίνεται στα κόπρανα ως κοπροχολινογόνο.

## ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Οι συγκεντρώσεις της χολερυθρίνης στον ορό αυξάνονται, όταν υπάρχει υπερβολική καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων και όταν ελαττώνεται η ικανότητα του ήπατος να συνδέει τη χολερυθρίνη ή να απεκκρίνει τη συζευγμένη χολερυθρίνη στη χολή. Επειδή ο ίκτερος εμφανίζεται, όταν οι συγκεντρώσεις της χολερυθρίνης γίνονται πάνω από 2 mg/dL, είναι χρήσιμο να γνωρίζουμε τα αυξημένα επίπεδα της χολερυθρίνης πριν από την εμφάνιση του ικτέρου. Ωστόσο η αιφνίδια εμφάνιση του ικτέρου μπορεί να είναι μερικές φορές η πρώτη ένδειξη οξείας ή χρόνιας πάθησης του ήπατος, αιμολυτικής αναιμίας ή άλλων παθήσεων.

## Ίκτερος

Αυξημένα επίπεδα χολερυθρίνης οδηγούν σε εναπόθεσή της στους ιστούς και σε *ίκτερο*, δηλαδή κίτρινη χρώση του δέρματος, των επιπεφυκώτων



και των βλεννογόνων. Υπάρχουν τρεις γενικοί τύποι, οι οποίοι διακρίνονται ανάλογα με τον τρόπο σχηματισμού και απέκκρισης της χολερυθρίνης.

Αιμολυτικός ίκτερος. Προκύπτει από μεγάλη καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό χολερυθρίνης σε ποσά που υπερβαίνουν την ικανότητα του ήπατος να την απομακρύνει από την κυκλοφορία. Ακόμη και όταν η λειτουργία του ήπατος είναι σχετικά φυσιολογική, αν ο βαθμός της αιμόλυσης ξεπερνά την ικανότητα του ήπατος να συνδέει τη χολερυθρίνη, τότε αυτή συσσωρεύεται στο πλάσμα και προκαλεί μια αύξηση της συγκέντρωσης της έμμεσης χολερυθρίνης και επομένως και της ολικής χολερυθρίνης.

Ηπατικός ίκτερος. Προκύπτει από την ελαττωμένη ικανότητα του ήπατος να συνδέει τη χολερυθρίνη και να απεκκρίνει τη συζευγμένη αυτή ένωση στη χολή εξαιτίας βλάβης στα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος από τοξικά, λοιμώδη και μηχανικά αίτια.

Αποφρακτικός ίκτερος (χολοστατικός). Οφείλεται σε απόφραξη των χοληφόρων οδών, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η ροή της χολής στο δωδεκαδάκτυλο. Μπορεί να προκύψει από λίθους, όγκους ή ουλώδη ιστό είτε στους εκφορητικούς πόρους του ήπατος είτε στο χοληδόχο πόρο.

Η διαφορική διάγνωση των διάφορων τύπων ικτέρου δεν είναι πάντοτε δυνατή μόνο από τις μετρήσεις της χολερυθρίνης στον ορό. Συχνά χρειάζονται επιπλέον οι τιμές της χολερυθρίνης και του ουροχολινογόνου στα ούρα καθώς και τα επίπεδα του ουροχολινογόνου στα κόπρανα.

## 5.3.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΟΛΕΡΥΘΡΙΝΗΣ ΑΙΜΑΤΟΣ

### ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ-ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Οι προσδιορισμοί της χολερυθρίνης στον **ορό** απαιτούν 2 mL αίματος που συλλέγεται χωρίς αντιπηκτικά. Τα δείγματα του ορού για προσδιορισμούς χολερυθρίνης παραμένουν σταθερά επί μία εβδομάδα, όταν διατηρούνται στο σκοτάδι σε ψυγείο, και επί τρεις μήνες, όταν παραμένουν στην κατάψυξη.

Για να εξασφαλίσουμε ακριβή αποτελέσματα στους προσδιορισμούς της χολερυθρίνης στον ορό, απαιτούνται:

- 1) Αναβάλλουμε τον προσδιορισμό τουλάχιστο για 24 ώρες, αν έχει γίνει στον ασθενή ένεση ακτινοσκιερών ουσιών για ακτινολογικές εξετάσεις, επειδή οι ουσίες αυτές παρεμβαίνουν στο χρώμα της αντίδρασης.
- 2) Η αποφυγή λήψης ορισμένων τροφών, όπως είναι τα πορτοκάλια, τα καρότα και τα καροτένια, αρκετές ημέρες πριν από τη δοκιμασία, επειδή αυτά μπορεί να προσδώσουν ένα κίτρινο έως πορτοκαλί χρώμα και να οδηγήσουν σε αυξημένες τιμές χολερυθρίνης.



- 3) Αποφυγή λήψης τροφής και υγρών επί 14 ώρες πριν από τη συλλογή του δείγματος του αίματος, επειδή ένα υψηλό περιεχόμενο λιπιδίων στο αίμα θα παρέμβει στην αντίδραση της ανάλυσης και θα δώσει ένα ψευδώς χαμηλό επίπεδο χολερυθρίνης στον ορό.
- 4) Συλλέγουμε το δείγμα του αίματος χωρίς τραύμα και το χειριζόμαστε ήπια, ώστε να μην προκληθεί λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και ελευθέρωση αιμοσφαιρίνης, η οποία μπορεί να δώσει ψευδώς χαμηλές τιμές.
- 5) Προστατεύουμε το δείγμα από το δυνατό ηλιακό φως και το φυλάσσουμε σε ένα σκοτεινό μέρος, όπως είναι το ψυγείο, μέχρι να παραδοθεί στο εργαστήριο, επειδή το φως αποικοδομεί τη χολερυθρίνη. Οι συγκεντρώσεις της χολερυθρίνης μπορεί να ελαττωθούν μέχρι 50% μέσα σε μια ώρα, εάν ο ορός παραμείνει σε μέρος με έντονο φωτισμό.
- 6) Ψευδώς αυξημένες τιμές χολερυθρίνης μπορεί να προκύψουν από οποιαδήποτε φάρμακα, τα οποία δίνουν ένα κίτρινο ή πορτοκαλί χρώμα. Αυξημένες τιμές χολερυθρίνης μπορεί επίσης να προκύψουν από την παρατεταμένη χορήγηση ορισμένων φαρμάκων, τα οποία τροποποιούν προσωρινά τη λειτουργία του ήπατος και θεωρούνται ηπατοτοξικά.



Για τον προσδιορισμό χολερυθρίνης νεογνών, το αίμα λαμβάνεται, αν χρειαστεί, από τη φτέρνα του σε μικρό σωληνάριο ή σε χοντρό τριχοειδές. Μετά την πήξη φυγοκεντρείται το τριχοειδές σε φυγόκεντρο τριχοειδών και διαχωρίζεται το κομμάτι που έχει τον ορό, από όπου παραλαμβάνεται ο ορός με πιπέττα Pasteur.

### ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ

Δύο μορφές χολερυθρίνης υπάρχουν στο πλάσμα, η έμμεση (ασύζευκτη) και η άμεση (συζευγμένη) χολερυθρίνη. Υπάρχουν αναλυτικές μέθοδοι ρουτίνας για τον προσδιορισμό της ολικής χολερυθρίνης (έμμεση + άμεση) και για τη μέτρηση της άμεσης μόνο. Το κλάσμα της έμμεσης χολερυθρίνης υπολογίζεται από τη διαφορά της άμεσης από την ολική χολερυθρίνη.

Η κλασική μέθοδος (Van den Bergh) για τον προσδιορισμό της χολερυθρίνης στηρίζεται στο γεγονός ότι η χολερυθρίνη, μόνη από όλες τις χολοχρωστικές, μπορεί να αντιδράσει με διαζωνιακά άλατα, π.χ. με διαζωτωμένο σουλφανιλικό οξύ και να δώσει αζωχρώματα. Το αζώχρωμα έχει κόκκινο-ιώδες χρώμα σε όξινο διάλυμα και κυανό σε αλκαλικό διάλυμα. Η άμεση χολερυθρίνη είναι ευδιάλυτη στο νερό και δίνει αμέσως χρώμα με την προσθήκη του διαζωνιακού άλατος, ώστε λέμε ότι δίνει την «άμεση» αντίδραση Van den Bergh.



Η έμμεση χολερυθρίνη, που συνδέεται ισχυρά με λευκωματίνη, δεν αντιδρά με το αντιδραστήριο. Επειδή είναι αδιάλυτη στο νερό, χρειάζεται την προσθήκη αλκοόλης (αιθυλικής ή μεθυλικής) ή κάποιου άλλου διαλυτικού αντιδραστηρίου για να δώσει το χαρακτηριστικό χρώμα με το διαζωνιακό άλας. Έτσι λέμε ότι δίνει την «έμμεση» αντίδραση Van den Bergh.

Στον προσδιορισμό χολερυθρίνης νεογνών, επειδή το ποσό της χολερυθρίνης είναι πολύ υψηλό, χρησιμοποιείται μικρότερη ποσότητα ορού και πυκνότερο αζωαντιδραστήριο, ενώ και ο χρόνος ανάπτυξης του χρώματος είναι μικρότερος.

### 5.3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΧΟΛΕΡΥΘΡΙΝΗΣ (Χρωματομετρική μέθοδος)

#### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η χολερυθρίνη αντιδρά με το χλωριούχο 4-σουλφοβενζολοδιαζωνιακό άλας και σχηματίζει αζωχολερυθρίνη που έχει κόκκινο χρώμα. Η ένταση του χρώματος είναι ευθέως ανάλογη προς τη συγκέντρωση της χολερυθρίνης και μετρείται φωτομετρικά. Με την προσθήκη του επιταχυντή αντιδρά και η άμεση και η έμμεση χολερυθρίνη.

#### ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- ▶ Σωληνάρια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- ▶ Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληνάρων.
- ▶ Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- ▶ Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέττες.
- ▶ Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- ▶ Φωτόμετρο αυτόματο.
- ▶ Ανακινητής σωληναρίων (Vortex).
- ▶ Parafilm.
- ▶ Γάντια και υαλογράφος.
- ▶ 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό χολερυθρίνης.



5.3 Ρύθμιση του όγκου αυτόματης πιπέτας

#### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Διαζωαντιδραστήριο I (περιέχει 4-αμινοβενζολοσουλφονικό οξύ, υδροχλωρικό οξύ).
2. Διαζωαντιδραστήριο II (περιέχει νιτρώδες νάτριο).
3. Αντιδραστήριο επιτάχυνσης της αντίδρασης (περιέχει καφεΐνη 12%, βενζοϊκό νάτριο 17% και οξικό νάτριο 71%).
4. Fehling II (περιέχει τρυγικό καλιονάτριο και καυστικό νάτριο).
5. Απεσταγμένο νερό.

# Έλεγχος ηπατικής λειτουργίας **κεφ.5**

## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Το περιεχόμενο του αντιδραστήριου 3 χρειάζεται διάλυση σε 200 mL απεσταγμένο νερό, ενώ μπορεί να χρειαστεί και θέρμανση σε υδατόλουτρο. Παραμένει σταθερό για 6 μήνες στους 18-26 °C. Είναι βλαβερό.

Το αντιδραστήριο 4 είναι ερεθιστικό για τα μάτια και το δέρμα. Αν πέσει στα μάτια, άμεσο πλύσιμο με άφθονο νερό και μετάβαση σε νοσοκομείο.

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:

	E	TE
Διαζωαντιδραστήριο I	200 μL	200 μL
Διαζωαντιδραστήριο II	20 μL	-
Αντιδραστήριο 3	1000 μL	1000 μL
Ορός ή πλάσμα	200 μL	200 μL

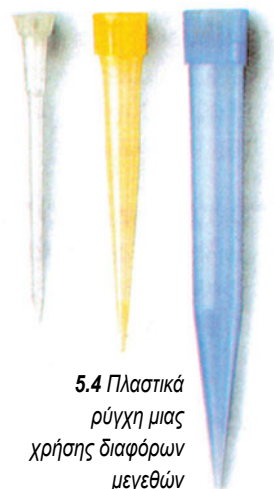
όπου: E=εξεταστέο  
TE=τυφλό για το  
εξεταστέο

- Σκεπάζουμε τα σωληνάρια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινητή.
- Παραμονή για 10' σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C), μακριά από το φως.
- Με πιπέττα προσθέτουμε στα σωληνάρια\*:

	E	TE
Fehling II	1000 μL	1000 μL

όπου: E=εξεταστέο  
TE=τυφλό για το  
εξεταστέο

- Σκεπάζουμε τα σωληνάρια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινητή.
- Παραμονή για 5', σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C), μακριά από το φως.
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέττες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 578 nm. Μηδενίζουμε με το TE. Το χρώμα παραμένει σταθερό 30'.



5.4 Πλαστικά  
ρύγχη μιας  
χρήσης διαφόρων  
μεγεθών

\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

C ολικής Χολερυθρίνης σε mg/dL =  $A_{(E)} \times 11$  (συντελεστής που μας δίνεται στο σετ)

**ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)** 0,3 - 1,4 mg/dL  
**ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ** Μέχρι 25 mg/dL

## ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ

Σε αυτή την τεχνική βλέπουμε ορισμένες διαφορές:

A) Δεν χρησιμοποιούμε standard. Γι' αυτό πολλαπλασιάζουμε τις απορροφήσεις των εξεταστέων με έναν συντελεστή (factor). Αυτός ο συντελεστής έχει υπολογιστεί στο εργαστήριο που κατασκευάστηκε το set, βάσει καμπύλης τιμών απορρόφησης (A), γνωστών συγκεντρώσεων χολερυθρίνης.

B) Τα τυφλά (T) σωληνάρια εδώ είναι πολλά. Ένα για κάθε εξεταστέο, λέγονται ΤΕ (τυφλό εξεταστέο) και περιέχουν και ορό. Αυτό γιατί θέλουμε να αφαιρέσουμε το χρώμα του ορού, γιατί επηρεάζει τη μέτρηση της απορρόφησης στη χολερυθρίνη. Και επειδή κάθε ορός έχει δική του ένταση και απόχρωση χρώματος, χρησιμοποιούμε ένα τυφλό για κάθε εξεταστέο.

### Γ) ΠΡΟΣΟΧΗ ΙΔΙΑΙΤΕΡΗ:

Να μην χρησιμοποιούμε **αιμολυμένο** ορό.

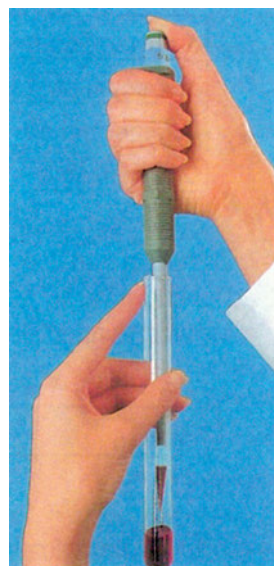
Να χρησιμοποιούμε μόνο **πρόσφατα** δείγματα.

Να μην εκτίθεται η αντίδραση στο **ηλιακό φως**.

## 5.3.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΕΣΗΣ ΧΟΛΕΡΥΘΡΙΝΗΣ (Χρωματομετρική μέθοδος)

### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η χολερυθρίνη αντιδρά με το χλωριούχο 4-σουλφοβενζο-λοδιαζωνιακό άλας και σχηματίζει αζωχολερυθρίνη που έχει κόκκινο χρώμα. Η ένταση του χρώματος είναι ευθέως ανάλογη προς τη συγκέντρωση της χολερυθρίνης. Χωρίς την προσθήκη του επιταχυντή αντιδρά μόνο η άμεση χολερυθρίνη.



5.5 Λήψη με αυτόματη πιπέττα

### ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- Σωληνάρια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληνάριων.
- Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέττες.
- Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- Φωτόμετρο αυτόματο.

# Έλεγχος ηπατικής λειτουργίας **κεφ.5**

- ▶ Ανακινητής σωληναρίων (Vortex).
- ▶ Parafilm.
- ▶ Γάντια και υαλογράφος.
- ▶ 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό χολερυθρίνης.

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Διαζωαντιδραστήριο I (περιέχει 4-αμινοβενζολοσουλφονικό οξύ, υδροχλωρικό οξύ).
2. Διαζωαντιδραστήριο II (περιέχει νιτρώδες νάτριο).
3. Φυσιολογικός ορός (9 g NaCl / L).

Τα αντιδραστήρια είναι έτοιμα.

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:

	Ε	ΤΕ
Διαζωαντιδραστήριο I	200 μL	200 μL
Διαζωαντιδραστήριο II	20 μL	-
Φυσιολογικός ορός	2000 μL	2000 μL
Ορός ή πλάσμα	200 μL	200 μL

όπου: Ε=εξεταστέο  
ΤΕ=τυφλό για το  
εξεταστέο

- Σκεπάζουμε τα σωληνάρια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινητή.
- Παραμονή για 5', σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C), μακριά από το φως.
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέττες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 546 nm. Μηδενίζουμε με το ΤΕ. Το χρώμα παραμένει σταθερό 30'.

*\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ*

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

C άμεσης χολερυθρίνης σε mg/dL =  $A_E \times 14,7$  (συντελεστής που μας δίνεται στο σετ)

**ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)** 0,1 – 0,4 mg/dL

**ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ** Μέχρι 20 mg/dL

## ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ

Ισχύουν τα ίδια με την ολική χολερυθρίνη.

## 5.3.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΟΛΕΡΥΘΡΙΝΗΣ ΝΕΟΓΝΩΝ (Χρωματομετρική μέθοδος)

### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η ολική χολερυθρίνη αντιδρά με τη διαζωτωμένη διχλωροανιλίνη.

### ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- ▶ Σωληνάρια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- ▶ Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληνάρων.
- ▶ Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- ▶ Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέττες.
- ▶ Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- ▶ Φωτόμετρο αυτόματο.
- ▶ Ανακινητής σωληναρίων (Vortex).
- ▶ Parafilm.
- ▶ Γάντια και υαλογράφος.
- ▶ 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό χολερυθρίνης νεογνών.

### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Διχλωροανιλίνη, Υδροχλωρικό οξύ, Απορρυπαντικό
2. Νιτρώδες νάτριο

### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Παρασκευάζουμε το χρωμογόνο αναμειγνύοντας το περιεχόμενο του φιαλιδίου 1 με το αντίστοιχο περιεχόμενο του φιαλιδίου 2 με αναλογία 50:1. (π.χ. 4,9 mL από το αντιδραστήριο 1 και 0,1 mL από το αντιδραστήριο 2). Το αντιδραστήριο παραμένει σταθερό για 5 ημέρες στους 18-25 °C και για 3 εβδομάδες στους 2-8 °C.

### ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:

	E	TE
Δείγμα (ορός)	50 µL	50 µL
Αντιδραστήριο 1	-	2000 µL
Χρωμογόνο (Αντιδραστήριο 1+2)	2000 µL	-

## Έλεγχος ηπατικής λειτουργίας **κεφ.5**

- Σκεπάζουμε τα σωληνάκια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινήτη.
- Παραμονή για 5', σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C), μακριά από το φως.
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέττες.
- Ο μηδενισμός του φωτόμετρου γίνεται έναντι του αντιδραστήριου 1.
- Φωτομετρούμε σε μήκος κύματος 546 nm το τυφλό εξεταστέο (TE) και το εξεταστέο (E) έναντι του αντιδραστήριου 1. Το τελικό χρώμα παραμένει σταθερό για μία ώρα.

*\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το set*

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

C χολερυθρίνης σε mg/dL =  $A_E - A_{TE} \times 69,5$  (συντελεστής που μας δίνεται από το set)

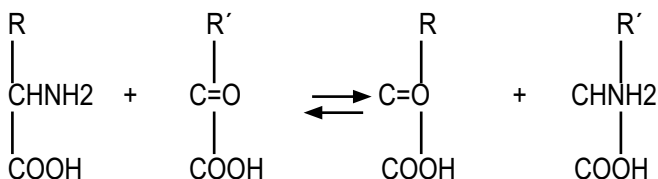
**ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)** 1,0 – 12,0 mg/dL

**ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ** Μέχρι 40 mg/dL

## 5.4 ΤΡΑΝΣΑΜΙΝΑΣΕΣ

### ΕΙΔΗ

Οι τρανσαμινάσες ή αμινοτρανσφεράσες είναι ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις τρανσαμίνωσης και χρησιμοποιούν ως συνένζυμο φωσφορική πυριδοξάλη. Τρανσαμίνωση (transamination) είναι η μεταφορά της α-αμινομάδας από ένα αμινοξύ στον α-άνθρακα ενός κετοξέος. Έτσι δημιουργείται ένα νέο αμινοξύ, που αντιστοιχεί στο α-κετοξύ το οποίο δέχτηκε την αμινομάδα, και ένα νέο α-κετοξύ, που αντιστοιχεί στο α-αμινοξύ από το οποίο αφαιρέθηκε η αμινομάδα:



Οι αντιδράσεις τρανσαμίνωσης είναι αντιστρεπτές με μια σταθερά ισορροπίας περίπου 1.

Υπάρχουν σε όλους τους ιστούς και ιδιαίτερα στο ήπαρ. Ένας μεγάλος αριθμός τρανσαμινάσεων είναι γνωστός και σχεδόν όλες αυτές οι τρανσαμινάσες χρησιμοποιούν ως δέκτη αμινομάδων το α-κετογλουταρικό, είναι δηλαδή ειδικές για το ζεύγος γλουταμικό/α-κετογλουταρικό:

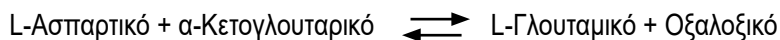


Στο ήπαρ υπάρχουν αμινοτρανσφεράσες για κάθε α-αμινοξύ με την πιθανή εξαίρεση της λυσίνης και θρεονίνης. Έτσι η τρανσαμίνωση επιτρέπει ουσιαστικά την ανακατανομή αμινομάδων μεταξύ διάφορων αμινοξέων και γλουταμικού και δίνει δυνατότητες μεταβολής του μείγματος των αμινοξέων των κυττάρων.

Πολύ μεγάλο ενδιαφέρον στην κλινική ιατρική έχει ο προσδιορισμός στον ορό των τρανσαμινασών GOT (AST) και GPT (ALT).

## ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

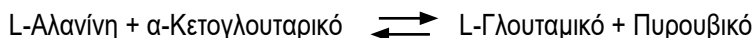
Η τρανσαμινάση, που χρησιμοποιεί ως δεύτερο ζεύγος το ασπαρτικό/οξαλοξικό, είναι πολύ διαδομένη στους διάφορους ιστούς και ονομάζεται ασπαρτική αμινοτρανσφεράση ή ασπαρτική - γλουταμική ή γλουταμική - οξαλοξική τρανσαμινάση (GOT - Glutamic Oxaloacetic Transaminase ή AST - Aspartate Aminotransferase) και καταλύει την αντίδραση:



Οι **τιμές αναφοράς** (φυσιολογικές τιμές) της GOT (AST) εξαρτώνται από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται και είναι:

<b>Ενήλικοι</b>	8-33 U/L σε 37 °C
<b>Βρέφη</b>	4 φορές πάνω από τα επίπεδα των ενηλίκων

Μια άλλη επίσης σπουδαία τρανσαμινάση είναι η αμινοτρανσφεράση της αλανίνης ή γλουταμική - πυρουβική (ή πυροσταφυλική) τρανσαμινάση (GPT - Glutamic Pyruvic Transaminase ή ALT - Alanine Aminotransferase) και καταλύει την αντίδραση:



Οι **τιμές αναφοράς** (φυσιολογικές τιμές) της GPT (ALT) εξαρτώνται από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται και είναι:

4-36 U/L σε 37 °C      **Σχέση GOT/GPT (AST/ALT) = 1**



## ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Υπερβολικά αυξημένα επίπεδα της **GOT**, όπως 100 φορές μεγαλύτερα από τα φυσιολογικά, παρατηρούνται σε εκτεταμένη καταστροφή του **ηπατικού ιστού** και βαριά ηπατική νέκρωση, όπως συμβαίνει στα οξεία στάδια της κεραυνοβόλου ηπατίτιδας. Οι τιμές αυτές της GOT παρατηρούνται στα αρχικά στάδια της νόσου, συχνά πριν από την κλινική εμφάνιση του ικτέρου, και παραμένουν υψηλές για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από τις άλλες δοκιμασίες ελέγχου της ηπατικής λειτουργίας.

Σημαντικές αυξήσεις των επιπέδων της GOT στον ορό παρατηρούνται μέσα σε 6-12 ώρες ύστερα από ένα **έμφραγμα του μυοκαρδίου** και φθάνουν σε συγκεντρώσεις κορυφής 4-10 φορές μεγαλύτερες από τα φυσιολογικά επίπεδα μετά από 24-48 ώρες. Όταν οι αυξημένες τιμές της GOT επανέρχονται, χωρίς να υπάρχει βλάβη του ήπατος, τότε υποδηλώνουν νέες περιοχές νέκρωσης του μυοκαρδίου που προκύπτουν από ανεπάρκεια των στεφανιαίων ή από συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια.

Τα επίπεδα της **GPT** αυξάνουν στον ορό στα αρχικά στάδια **ηπατικών παθήσεων**, συχνά μερικές ημέρες πριν από την εμφάνιση του ικτέρου, και επανέρχονται στις φυσιολογικές τιμές περίπου σε 2-3 μήνες, εκτός αν παρουσιαστούν επιπλοκές. Παραμένουν αυξημένα για μικρότερο χρονικό διάστημα από τα επίπεδα της GOT και επίσης φθάνουν σε μεγαλύτερες αυξήσεις, συχνά μέχρι 4000 μονάδες, σε άτομα με ηπατίτιδα ή ηπατική νέκρωση που προκαλείται από φάρμακα και χημικές ουσίες. Έτσι η μέτρηση των επιπέδων της GPT βοηθά στη διάγνωση ηπατικής πάθησης, όταν δεν υπάρχει ίκτερος, επειδή επίπεδα σημαντικά μεγαλύτερα από 300 μονάδες είναι συχνά σε ηπατικές παθήσεις, ενώ επίπεδα κάτω από 300 μονάδες συνήθως προκύπτουν από καταστάσεις έξω από το ήπαρ (λιθίαση χοληφόρων οδών, καρκίνος περιοχής ληκύθου του Vater).

Η σύγκριση των επιπέδων της GPT και της GOT στον ορό μπορεί επίσης να δώσει πολύτιμες πληροφορίες σε άτομα με ύποπτο έμφραγμα μυοκαρδίου, επειδή τα επίπεδα της GOT αυξάνονται πάντοτε μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου, ενώ τα επίπεδα της GPT δεν αυξάνονται πάντοτε ανάλογα. Έτσι αυξημένα επίπεδα της GOT, που συνοδεύονται από φυσιολογικές τιμές της GPT, επιβεβαιώνουν περισσότερο μια διάγνωση καρδιακής πάθησης παρά ηπατική νέκρωση.

Η σχέση GOT/GPT αυξάνει τη διαγνωστική αξία και των δύο τρανσαμινασών και είναι πολύ χρήσιμη, όταν η ενεργότητα είναι 2 έως 10 φορές πάνω από τα ανώτερα φυσιολογικά όρια. Η σχέση έχει ωστόσο μικρή αξία, όταν οι ενεργότητες των ενζύμων είναι πολύ υψηλές (>500 μονάδες), επειδή στο σημείο αυτό η διάγνωση είναι προφανής. Μια σχέση μεγαλύτερη από 2 υποδηλώνει την πιθανότητα αλκοολικής ηπατίτιδας ή κίρρωσης, ενώ μια σχέση μικρότερη από 2 είναι σπάνια σε άλλους τύπους κίρρωσης και στην οξεία ή χρόνια ηπατίτιδα. Αν και ο λόγος για την αυξημένη σχέση είναι άγνωστος, η ενεργότητα της GPT είναι χαμηλότερη σε ασθενείς με αλκοολική πάθηση του ήπατος παρά σε φυσιολογικά άτομα και σε ασθενείς με οξεία ιογενή ηπατίτιδα.

## 5.4.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΑΝΣΑΜΙΝΑΣΩΝ

### ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ - ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Οι προσδιορισμοί της GOT (AST) και της GPT (ALT) πραγματοποιούνται στον ορό και απαιτούν 2 mL αίματος που συλλέγεται σε ένα σωληνάριο χωρίς αντιπηκτικά. Τα ένζυμα παραμένουν σταθερά σε δείγματα ορού επί τρεις ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου και επί μία εβδομάδα στο ψυγείο αλλά είναι ασταθή, όταν τα δείγματα τοποθετηθούν στην κατάψυξη, επειδή η ενεργότητα των ενζύμων μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της τήξης του δείγματος.



5.6 Δείγματα εξεταστέων ορών σε στατώ, με πιπέτες Pasteur

Για να εξασφαλίσουμε ακριβείς προσδιορισμούς, απαιτούνται:

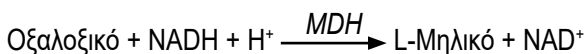
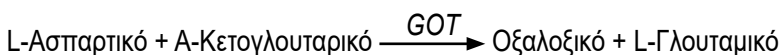
1. Δεν συλλέγουμε δείγματα αίματος, εάν ο ασθενής έχει πάρει οποιαδήποτε φάρμακα τις προηγούμενες 12 ώρες. Ψευδώς αυξημένα επίπεδα της GOT (AST) προκαλούνται από έναν αριθμό φαρμάκων και χημικών ουσιών. Δεν είναι βέβαιο εάν οι αυξήσεις αυτές των επιπέδων είναι τεχνητές (λόγω παρεμβολών στη μέτρηση) ή προκαλούνται από μικρή βλάβη του ήπατος. Για τους παραπάνω λόγους δίνουμε οδηγίες στον ασθενή να μην πάρει κανένα φάρμακο επί 12 ώρες πριν από τη συλλογή του δείγματος του αίματος. Εάν ο ασθενής πρέπει οπωσδήποτε να πάρει κάποιο φάρμακο, το γνωστοποιούμε στο εργαστήριο.
2. Συλλέγουμε το δείγμα του αίματος, χωρίς να προκαλέσουμε τραύμα ή αιμόλυση, η οποία μπορεί να παρέμβει στα αποτελέσματα της δοκιμασίας. Για το λόγο αυτό δεν στέλνουμε αιμολυμένα δείγματα αίματος στο εργαστήριο.
3. Σημειώνουμε το χρόνο συλλογής του αίματος και μετά την πήξη του αίματος τοποθετούμε το δείγμα του ορού στο ψυγείο, μέχρι να μεταφερθεί στο εργαστήριο.

## 5.4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ GOT ΣΤΟ ΑΙΜΑ

(Κινητική μέθοδος)

### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η διεθνώς χρησιμοποιούμενη μέθοδος προσδιορισμού της GOT βασίζεται στην αντίδραση:



(Όπου MDH=Μηλική Δεϋδρογονάση)

# Έλεγχος ηπατικής λειτουργίας **κεφ.5**

Το NADH έχει σημαντική απορρόφηση σε μήκος κύματος 340 nm στο φωτόμετρο, ενώ το NAD<sup>+</sup> δεν απορροφά καθόλου σ' αυτό το μήκος κύματος.

Μετρώντας την απορρόφηση του NADH στο φωτόμετρο σε διάφορες χρονικές στιγμές (τουλάχιστον δύο φορές) παρατηρούμε την εξέλιξη της αντίδρασης. Όσο εξελίσσεται η αντίδραση προς τα δεξιά, το NADH καταναλώνεται για να μετατραπεί σε NAD<sup>+</sup>. Η μέτρηση της ταχύτητας με την οποία μειώνεται η απορρόφηση του NADH (αφού αυτό μειώνεται λόγω της μετατροπής του) εκφράζει την ταχύτητα της αντίδρασης και είναι ανάλογη της δραστικότητας του ενζύμου GOT που την καταλύει. Η μέτρηση της ελάττωσης της απορρόφησης στα 340 nm, εξαιτίας της οξειδωσης του NADH, επιτρέπει τη μέτρηση της δραστικότητας της GOT, αφού τα προϊόντα της κύριας αντίδρασης μετριούνται πολύ δύσκολα.

## ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

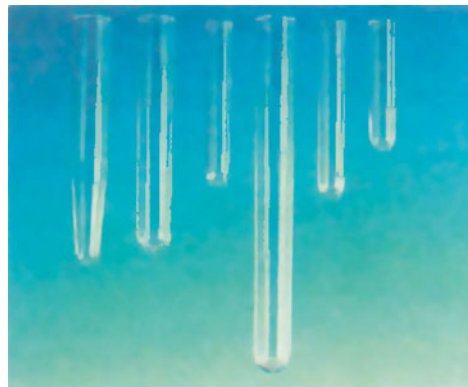
- ▶ Σωληνάρια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- ▶ Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληναρίων.
- ▶ Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- ▶ Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέττες.
- ▶ Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- ▶ Φωτόμετρο αυτόματο.
- ▶ Ανακινητής σωληναρίων (Vortex).
- ▶ Υδατόλουτρο.
- ▶ Χρονόμετρο χειρός.
- ▶ Parafilm.
- ▶ Γάντια και υαλογράφος.
- ▶ 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό της GOT.



5.7 Γάντια μιας χρήσης μη αποστειρωμένα.

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1) MDH, NADH σε σκόνη (λυοφιλοποιημένο).
- 2) Buffer (pH 7,8), α-κετογλουταρικό, ασπαρτικό.  
Το σετ των αντιδραστηρίων φυλάσσεται μέχρι την ημερομηνία λήξης του στο ψυγείο (σε θερμοκρασία 2-8 °C).
- 3) Απεσταγμένο νερό.



5.8 Δοκιμαστικοί σωλήνες διαφόρων μεγεθών

## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- **Ανασύσταση** αντιδραστηρίων:

Ανακατεύουμε μια ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα με το φιαλίδιο, στο οποίο βρίσκονται τα ένζυμα σε σκόνη, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του σετ. Σε ορισμένες περιπτώσεις τα ένζυμα είναι σε μορφή δισκίου, το οποίο διαλύουμε σε ορισμένη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος.

- **Μετά** την ανασύσταση των αντιδραστηρίων περιορίζεται ο χρόνος «ζωής» τους.

Συνήθως διατηρούνται για μια εβδομάδα στο ψυγείο (2-8 °C). Πάντα σύμφωνα με τις οδηγίες που δίνει το σετ.

## ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Πολύ σημαντικό ρόλο στη μέθοδο αυτή, αλλά και σε όλες τις ενζυμικές - κινητικές μεθόδους, παίζει η θερμοκρασία της αντίδρασης. Έτσι η μέθοδος αυτή μπορεί να γίνει σε δυο διαφορετικές θερμοκρασίες (30 °C, 37 °C) με τη βοήθεια του υδατόλουτρου. Σ' αυτό ρυθμίζουμε την επιθυμητή θερμοκρασία του νερού.

Όταν λοιπόν τα σωληνάρια της εξέτασης εμβαπτιστούν με το ανάλογο στατώ τους στο υδατόλουτρο, θα έχουμε και την επιθυμητή θερμοκρασία για την αντίδραση.

Η θερμοκρασία στην εξέταση είναι τόσο σημαντική, γιατί στις διάφορες θερμοκρασίες που αναφέραμε παραπάνω έχουμε και διαφορετικές φυσιολογικές τιμές.

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Ανάβουμε το υδατόλουτρο, αφού προηγουμένως το γεμίσουμε, μέχρι τη στάθμη που επιθυμούμε με απεσταγμένο νερό.
- Ρυθμίζουμε τη θερμοκρασία που θέλουμε.
- Όταν η θερμοκρασία φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο, εμβαπτίζουμε, χωριστά, το έτοιμο αντιδραστήριο και το δείγμα στο υδατόλουτρο, για να αποκτήσουν την απαιτούμενη θερμοκρασία της αντίδρασης.
- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:

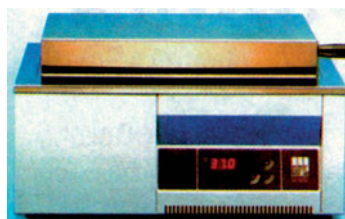
	<b>Ε</b>	<b>Τ</b>
<b>Αντιδραστήριο 1 +2</b>	3000 μL	-
<b>Νερό Απεσταγμένο</b>	-	3000 μL
<b>Ορός ή πλάσμα</b>	50 μL	-

όπου: Ε=εξεταστέο  
Τ=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάρια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινήτη.
- Επώαση για 2-3' στο υδατόλουτρο (στους 30 °C ή στους 37 °C).
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέττες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 340 nm. Μηδενίζουμε με το τυφλό.

## Έλεγχος ηπατικής λειτουργίας **κεφ.5**

- Σημειώνουμε την απορρόφηση  $A_1$  πατώντας και το χρονόμετρο.
- Ξανά επώαση για 5' στο υδατόλουτρο (στους 30 °C ή στους 37 °C).
- Σε 5' ξανά φωτομέτρηση. Σημειώνουμε την απορρόφηση ( $A_2$ ).
- Σημ.: ο μηδενισμός του φωτομέτρου μπορεί να γίνει και με κενή κυβέττα.



5.9 Υδατόλουτρο

*\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ.*

### ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αφαιρούμε τις δύο απορροφήσεις  $A_1$ - $A_2$  και πολλαπλασιάζουμε με έναν συντελεστή ο οποίος μας δίνεται από τον κατασκευαστή του σετ.

$(A_1 - A_2) \times \text{Συντελεστής} = \text{Τιμή εξεταστέου για τη GOT σε I.U./L}$

### ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)

Όπως γνωρίζουμε ήδη, οι φυσιολογικές τιμές μιας ουσίας εξαρτώνται και από τη μέθοδο που χρησιμοποιούμε στο εργαστήριο. Με κάποιες αποκλίσεις, ανάλογα με τη μέθοδο, οι φυσιολογικές τιμές για την GOT είναι:

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	30 °C	37 °C
ΜΟΝΑΔΕΣ GOT	<30 I.U./L	<46 I.U./L

### ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

Όταν η τιμή της απορρόφησης είναι μεγαλύτερη από τη γραμμικότητα της μεθόδου που αναφέρεται στο σετ, τότε αραιώνουμε τον ορό (1/10) με φυσιολογικό ορό, (δηλ. 9 μέρη φυσιολογικό ορό και 1 μέρος ορό-δείγμα), εκτελούμε την εξέταση και πολλαπλασιάζουμε το αποτέλεσμα x 10.

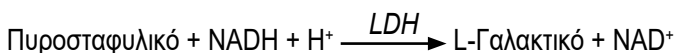
### ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Είναι προτιμότερο να φωτομετρούμε κάθε 1 λεπτό για 3 – 5 φορές το εξεταστέο σωληνάριο και να εξάγουμε το μέσο όρο της διαφοράς των απορροφήσεων. Το αποτέλεσμα τότε θα είναι ακριβέστερο.
- Όπως είπαμε, πολύ μεγάλη σημασία έχει η θερμοκρασία αντίδρασης. Κατά το χρόνο που βγάζουμε το σωληνάριο από το υδατόλουτρο μέχρι να φωτομετρηθεί, η θερμοκρασία υφίσταται αλλαγές. Συνιστάται η χρήση σ' όλους τους κινητικούς προσδιορισμούς ειδικής **θερμοστατούμενης** κυβέττας. Δηλ. κυβέττας, η οποία διατηρεί σταθερή τη θερμοκρασία αντίδρασης.

## 5.4.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ GPT ΣΤΟ ΑΙΜΑ (Κινητική μέθοδος)

### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η διεθνώς χρησιμοποιούμενη μέθοδος προσδιορισμού της GPT βασίζεται στην αντίδραση:



Το NADH έχει σημαντική απορρόφηση σε μήκος κύματος 340 nm στο φωτόμετρο, ενώ το NAD<sup>+</sup> δεν απορροφά καθόλου σε αυτό το μήκος κύματος.

Μετρώντας την απορρόφηση του NADH στο φωτόμετρο σε διάφορες χρονικές στιγμές (τουλάχιστον δύο φορές) παρατηρούμε την εξέλιξη της αντίδρασης. Όσο εξελίσσεται η αντίδραση προς τα δεξιά, το NADH καταναλώνεται για να μετατραπεί σε NAD<sup>+</sup>. Η μέτρηση της ταχύτητας με την οποία μειώνεται η απορρόφηση του NADH (αφού αυτό μειώνεται λόγω της μετατροπής του) εκφράζει την ταχύτητα της αντίδρασης και είναι ανάλογη της δραστηριότητας του ενζύμου GPT που την καταλύει. Η μέτρηση της ελάττωσης της απορρόφησης στα 340 nm, εξαιτίας της οξειδωσης του NADH, επιτρέπει τη μέτρηση της δραστηριότητας της GPT, αφού τα προϊόντα της κύριας αντίδρασης μετριοούνται πολύ δύσκολα.

### ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- ▶ Σωληνάρια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- ▶ Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληνάρων.
- ▶ Πιπέτες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- ▶ Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέτες.
- ▶ Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- ▶ Φωτόμετρο αυτόματο.
- ▶ Ανακινητής σωληναρίων (Vortex).
- ▶ Υδατόλουτρο.
- ▶ Χρονόμετρο χειρός.
- ▶ Parafilm.
- ▶ Γάντια και υαλογράφος.
- ▶ 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό της GPT.



5.10 Ρύθμιση όγκου σε αυτόματη πιπέτα.

### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1) LDH, NADH σε σκόνη (λυοφιλοποιημένο).
- 2) Buffer (pH 7,5), L-αλανίνη, α-κετογλουταρικό.  
Το σετ των αντιδραστηρίων φυλάσσεται μέχρι την ημερομηνία λήξης του στο ψυγείο (σε θερμοκρασία 2-8 °C).
- 3) Απεσταγμένο νερό.

### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- **Ανασύσταση** αντιδραστηρίων:

Ανακατεύουμε μια ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα με το φιαλίδιο, στο οποίο βρίσκονται τα ένζυμα σε σκόνη, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του σετ. Σε ορισμένες περιπτώσεις τα ένζυμα είναι σε μορφή δισκίου, το οποίο διαλύουμε σε ορισμένη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος.

- **Μετά** την ανασύσταση των αντιδραστηρίων περιορίζεται ο χρόνος «ζωής» τους.

Συνήθως διατηρούνται για μια εβδομάδα στο ψυγείο (2-8 °C). Πάντα σύμφωνα με τις οδηγίες που δίνει το σετ.

### ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Πολύ σημαντικό ρόλο στη μέθοδο αυτή, αλλά και σε όλες τις ενζυμικές - κινητικές μεθόδους, παίζει η θερμοκρασία της αντίδρασης. Έτσι η μέθοδος αυτή μπορεί να γίνει σε δυο διαφορετικές θερμοκρασίες (30 °C, 37 °C) με τη βοήθεια του υδατόλουτρου. Σ' αυτό ρυθμίζουμε την επιθυμητή θερμοκρασία του νερού.

Όταν λοιπόν τα σωληνάρια της εξέτασης εμβαπτιστούν με το ανάλογο στατώ τους στο υδατόλουτρο, θα έχουμε και την επιθυμητή θερμοκρασία για την αντίδραση.

Η θερμοκρασία στην εξέταση είναι τόσο σημαντική, γιατί στις διάφορες θερμοκρασίες που αναφέραμε παραπάνω έχουμε και διαφορετικές φυσιολογικές τιμές.

### ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Ανάβουμε το υδατόλουτρο, αφού προηγουμένως το γεμίσουμε, μέχρι τη στάθμη που επιθυμούμε με απεσταγμένο νερό.
- Ρυθμίζουμε τη θερμοκρασία που θέλουμε.
- Όταν η θερμοκρασία φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο, εμβαπτίζουμε, χωριστά, το έτοιμο αντιδραστήριο και το δείγμα στο υδατόλουτρο, για να αποκτήσουν την απαιτούμενη θερμοκρασία της αντίδρασης.
- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:



	E	T
<b>Αντιδραστήριο 1 +2</b>	3000 μL	-
<b>Νερό Απεσταγμένο</b>	-	3000 μL
<b>Ορός ή πλάσμα</b>	50 μL	-

όπου: E=εξεταστέο  
T=τυφλό

- Σκεπαζουμε τα σωληνάκια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινητή.
- Επώαση για 2- 3' στο υδατόλουτρο (στους 30 °C ή στους 37 °C).
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέττες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 340 nm. Μηδενίζουμε με το τυφλό.
- Σημειώνουμε την απορρόφηση  $A_1$  πατώντας και το χρονόμετρο.
- Ξανά επώαση για 5' στο υδατόλουτρο (στους 30 °C ή στους 37 °C).
- Σε 5' ξανά φωτομέτρηση. Σημειώνουμε την απορρόφηση  $A_2$ .
- Σημ.: ο μηδενισμός του φωτομέτρου μπορεί να γίνει και με κενή κυβέττα.



5.11 Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο.

\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ.

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αφαιρούμε τις δύο απορροφήσεις  $A_1$ - $A_2$  και πολλαπλασιάζουμε με έναν συντελεστή ο οποίος μας δίνεται από τον κατασκευαστή του σετ.

$$(A_1 - A_2) \times \text{Συντελεστής} = \text{Τιμή εξεταστέου για τη GPT σε I.U./L}$$

## ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)

Όπως γνωρίζουμε ήδη οι φυσιολογικές τιμές μιας ουσίας εξαρτώνται και από τη μέθοδο που χρησιμοποιούμε στο εργαστήριο. Με κάποιες αποκλίσεις, ανάλογα με τη μέθοδο, οι φυσιολογικές τιμές για την GPT είναι:

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	30 °C	37 °C
ΜΟΝΑΔΕΣ GPT	<35 I.U./L	<49 I.U./L

## ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

Όταν η τιμή της απορρόφησης είναι μεγαλύτερη από τη γραμμικότητα της μεθόδου που αναφέρεται στο σετ, τότε αραιώνουμε τον ορό (1/10) με φυσιολογικό ορό, εκτελούμε την εξέταση και πολλαπλασιάζουμε το αποτέλεσμα x 10.

## ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ισχύουν όσα αναφέρθηκαν και για την GOT.

## 5.5 γ-ΓΛΟΥΤΑΜΥΛΙΚΗ ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ (γ-GT)

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Το ένζυμο γ-γλουταμυλοτρανσφεράση (γGT, *γ-glutamyl transferase*) ή γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση (γ-GTP) καταλύει τη μεταφορά μιας ομάδας γ-γλουταμυλίου από ένα γ-γλουταμυλοπεπτιδίο σε ένα άλλο πεπτιδίο ή αμινοξύ. Η γ-GT βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στους νεφρούς, το ήπαρ και το πάγκρεας. Επειδή οι συγκεντρώσεις της γ-GT είναι πολύ αυξημένες σε αποφρακτική βλάβη του ήπατος, οι εργαστηριακοί προσδιορισμοί της χρησιμοποιούνται συχνά, σε συνδυασμό με μετρήσεις και άλλων ενζύμων, για να επιβεβαιώσουν και να αξιολογήσουν μια διάγνωση ηπατοχολικής νόσου. Επιπλέον οι τιμές της γ-GT παρέχουν ένα χρήσιμο εργαλείο ρουτίνας για την ανακάλυψη λανθάνοντος αλκοολισμού. Οι προσδιορισμοί της γ-GT έχουν επίσης σπουδαία ιατροδικαστική σημασία για τη διαπίστωση περιπτώσεων βιασμού, επειδή το σπερματικό υγρό περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις του ενζύμου αυτού.

Οι **τιμές αναφοράς** (φυσιολογικές τιμές) για τη γ-GT **εξαρτώνται από τη μέθοδο** που χρησιμοποιείται και είναι:

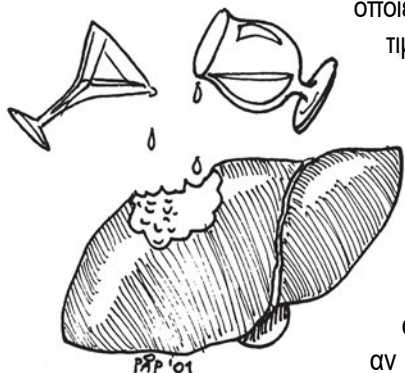
<b>Παιδιά (&lt;2 έτη)</b>	< 140	μονάδες
<b>Πρόωρα βρέφη</b>	< 250	μονάδες
<b>Ενήλικοι</b>	1 - 70	U/L
	5 - 40	IU/L
<b>Ανδρες</b>	9 - 50	U/L
	4 - 23	IU/L
<b>Γυναίκες</b>	8 - 40	U/L

### ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Αυξημένα επίπεδα της γ-GT στον ορό συνοδεύουν τις περισσότερες **παθήσεις του ήπατος** αλλά οι πιο μεγάλες αυξήσεις παρατηρούνται σε αποφρακτικές καταστάσεις, κατά τις οποίες οι τιμές της δοκιμασίας παρακολουθούν τις αυξημένες τιμές αλκαλικής φωσφατάσης και της 5'-νουκλεοτιδάσης.

Ανώμαles τιμές της γ-GT στον ορό είναι ένας αξιόπιστος δείκτης της έκτασης και της βαρύτητας των ηπατικών παθήσεων, επειδή παραμένουν αυξημένες επί μερικές εβδομάδες περισσότερο από τις αυξημένες τιμές άλλων ενζύμων του ήπατος, όπως είναι η LDH, η GOT, η GPT και η αλκαλική φωσφατάση.

Τα επίπεδα της γ-GT στον ορό μπορεί επίσης να αυξηθούν ύστερα από **έμφραγμα του μυοκαρδίου**, αν και οι συγκεντρώσεις παραμένουν φυσιολογικές τις



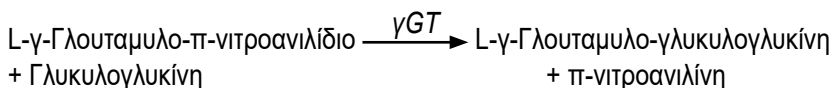
πρώτες 3-4 ημέρες και φτάνουν στη μέγιστη τιμή περίπου 10 ημέρες μετά από την εισβολή του εμφράγματος.

Οι προσδιορισμοί της γ-GT χρησιμοποιούνται στην αξιολόγηση και την παρακολούθηση ασθενών με χρόνιο αλκοολισμό, επειδή οι τιμές της δοκιμασίας ελαττώνονται, όταν διακόπτεται η λήψη αλκοόλης, και αυξάνονται πάλι, όταν επαναλαμβάνεται η λήψη. Η δοκιμασία της γ-GT χρησιμοποιείται σήμερα σε κέντρα θεραπείας αλκοολικών ως απόδειξη της επιτυχίας της θεραπείας και στην αναγνώριση ασθενών που υποτροπίασαν μετά από θεραπεία. Η δοκιμασία είναι χρήσιμη στην προληπτική ιατρική, επειδή προειδοποιεί έγκαιρα για βλάβη του ήπατος που σχετίζεται με την αλκοόλη και διευκολύνει τους αλκοολικούς ασθενείς να ζητήσουν βοήθεια πριν γίνει η κατάσταση οξεία.

## 5.5.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ γ-GT ΣΤΟ ΑΙΜΑ (Κινητική μέθοδος)

### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

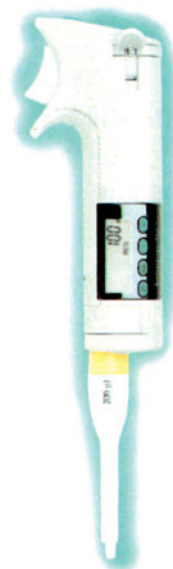
Η διεθνώς χρησιμοποιούμενη μέθοδος προσδιορισμού της γ-GT βασίζεται στην αντίδραση:



Η αύξηση της απορρόφησης στα 405 nm, εξαιτίας του σχηματισμού του π-νιτρο-ανιλιδίου, είναι ανάλογη με την ενεργότητα της γ-GT.

### ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- Σωληνάρια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληνάρων.
- Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέττες.
- Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- Φωτόμετρο αυτόματο.
- Ανακινητής σωληναρίων (Vortex).
- Υδατόλουτρο.
- Χρονόμετρο χειρός.
- Parafilm.
- Γάντια και υαλογράφος.
- 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό της γ-GT.



5.12 Αυτόματη ψηφιακή πιπέττα

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1) Γλυκυλογλυκίνη, 2-Αμινο-2-Μεθυλο-1-3-προπανεδιόλη (Ρυθμιστικό διάλυμα pH 8,1)
- 2) L-γ-Γλουταμυλο-π-νιτροανιλίδιο (λυοφιλοποιημένο)
- 3) Απεσταγμένο νερό.

## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Ανασύσταση αντιδραστηρίων:  
Ανακατεύουμε μια ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα (1) με το φιαλίδιο στο οποίο βρίσκεται το υπόστρωμα σε σκόνη (2), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του σετ. Σε ορισμένες περιπτώσεις το υπόστρωμα είναι σε μορφή δισκίου, το οποίο διαλύουμε σε ορισμένη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος.
- Μετά την ανασύσταση των αντιδραστηρίων περιορίζεται ο χρόνος «ζωής» τους. Συνήθως διατηρούνται για ένα μήνα στο ψυγείο (2-8 °C). Πάντα σύμφωνα με τις οδηγίες του σετ.

## ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Και η μέθοδος αυτή μπορεί να γίνει σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (στους 25 °C, 30 °C, 37 °C) με τη βοήθεια του υδατόλουτρου.

## ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ

Χρησιμοποιούμε συνήθως ορό. Το πλάσμα θα πρέπει ν' αποφεύγεται, γιατί το ένζυμο αυτό επηρεάζεται από τα αντιπηκτικά. Προσέχουμε να μην υπάρχει αιμόλυση στον ορό.

Η εξέταση πρέπει να γίνεται όσο το δυνατόν συντομότερα γιατί η δρατικότητα του ενζύμου φθίνει μετά από 7 ημέρες. Ο ορός διατηρείται στο ψυγείο (σε θερμοκρασία 2-8 °C) και όχι στην κατάψυξη.

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Ανάβουμε το υδατόλουτρο, αφού προηγουμένως το γεμίσουμε μέχρι τη στάθμη που επιθυμούμε με απεσταγμένο νερό.
- Ρυθμίζουμε τη θερμοκρασία που θέλουμε.
- Όταν η θερμοκρασία φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο, εμβαπτίζουμε, χωριστά, το έτοιμο αντιδραστήριο και το δείγμα στο υδατόλουτρο, για να λάβουν την απαιτούμενη θερμοκρασία της αντίδρασης.
- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:

	<b>E</b>	<b>T</b>
<b>Αντιδραστήριο 1 +2</b>	3000 μL	-
<b>Νερό Απεσταγμένο</b>	-	3000 μL
<b>Ορός ή πλάσμα</b>	50 μL	-

όπου: E=εξεταστέο  
T=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάκια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινήτη.
- Επώαση για 2- 3΄ στο υδατόλουτρο (στους 25 °C, στους 30 °C ή στους 37 °C).
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέττες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 405 nm. Μηδενίζουμε με το τυφλό. Σημειώνουμε την απορρόφηση πατώντας και το χρονόμετρο.
- Ξανά επώαση για 5΄ στο υδατόλουτρο (στους 25 °C, στους 30 °C ή στους 37 °C).
- Σε 5΄ ξανά φωτομέτρηση. Σημειώνουμε την απορρόφηση (A<sub>2</sub>).
- Σημ.: ο μηδενισμός του φωτομέτρου μπορεί να γίνει και με κενή κυβέττα.  
\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ.

### ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αφαιρούμε τις δύο απορροφήσεις και πολλαπλασιάζουμε με έναν συντελεστή ο οποίος μας δίνεται από τον κατασκευαστή του σετ.

$$(A_2 - A_1) \times \text{Συντελεστής} = \text{Τιμή εξεταστέου για τη } \gamma\text{-GT σε I.U./L}$$

### ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)

Όπως γνωρίζουμε ήδη οι φυσιολογικές τιμές μιας ουσίας εξαρτώνται και από τη μέθοδο που χρησιμοποιούμε στο εργαστήριο. Με κάποιες αποκλίσεις, ανάλογα με τη μέθοδο, οι φυσιολογικές τιμές για την  $\gamma$ -GT είναι:

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	25 °C	30 °C	37 °C
ΜΟΝΑΔΕΣ $\gamma$ -GT Άνδρες	5 - 29 I.U./L	7 - 40 I.U./L	9 - 52 I.U./L
Γυναίκες	3 - 18 I.U./L	4 - 25 I.U./L	5 - 32 I.U./L

### ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

Όταν η τιμή της απορρόφησης είναι μεγαλύτερη από τη γραμμικότητα της μεθόδου που αναφέρεται στο σετ, τότε αραιώνουμε τον ορό (1/10) με φυσιολογικό ορό, εκτελούμε την εξέταση και πολλαπλασιάζουμε το αποτέλεσμα x 10.

### ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Είναι προτιμότερο να φωτομετρούμε κάθε 1 λεπτό για 3 – 5 φορές το εξεταστέο σωληνάριο και να εξάγουμε το μέσο όρο της διαφοράς των απορροφήσεων. Το αποτέλεσμα τότε θα είναι ακριβέστερο.
- Όπως είπαμε, πολύ μεγάλη σημασία έχει εδώ η θερμοκρασία αντίδρασης. Κατά το χρόνο που βγάζουμε το σωληνάριο από το υδατόλουτρο μέχρι να φωτομετρηθεί, η θερμοκρασία υφίσταται αλλαγές. Συνιστάται η χρήση σ' όλους τους κινητικούς προσδιορισμούς ειδικής **θερμοστατούμενης** κυβέττας. Δηλ. κυβέττας, η οποία διατηρεί σταθερή τη θερμοκρασία αντίδρασης.

## 5.6 5'-ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΑΣΗ (5' -NU)

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η 5'-νουκλεοτιδάση είναι μία ειδική φωσφατάση που υδρολύει εκλεκτικά μονοφωσφορικούς εστέρες νουκλεοσιδίων και ιδιαίτερα εκείνους που η φωσφορική ομάδα είναι εστεροποιημένη στη θέση 5 της ριβόζης. Το ένζυμο αυτό κατανέμεται σε ολόκληρο τον οργανισμό και εμφανίζεται στο αίμα σχεδόν αποκλειστικά κατά τη διάρκεια ηπατικής πάθησης. Συγκεντρώσεις μέχρι έξι φορές πάνω από τα φυσιολογικά επίπεδα ανευρίσκονται συχνά σε ηπατοχολική απόφραξη.

Οι **τιμές αναφοράς** (φυσιολογικές τιμές) για την 5'-νουκλεοτιδάση εξαρτώνται από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται και είναι: 1-11 U/L σε 37 °C.

### ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Οι προσδιορισμοί της 5'-νουκλεοτιδάσης συχνά συνδυάζονται με μετρήσεις της αλκαλικής φωσφατάσης για να βοηθήσουν στη διάκριση ηπατικής νόσου από πάθηση των οστών, στην οποία υψηλά επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης συνοδεύονται από φυσιολογικά ή ελάχιστα αυξημένα επίπεδα 5'-νουκλεοτιδάσης. Οι εργαστηριακοί προσδιορισμοί των επιπέδων της είναι πολύ χρήσιμοι στη διαφορική διάγνωση ηπατοχολικών και σκελετικών ανωμαλιών κατά τη διάρκεια εξέτασης αυξημένων επιπέδων αλκαλικής φωσφατάσης και αποτελούν έναν ευαίσθητο δείκτη της αποφρακτικής πάθησης των χοληφόρων οδών. Οι υψηλότερες τιμές της 5'-νουκλεοτιδάσης παρατηρούνται σε ασθενείς με μεταηπατικό ίκτερο, ενδοηπατική χολόσταση και διηθητικές βλάβες του ήπατος. Μέτρια αυξημένα επίπεδα παρατηρούνται σε ασθενείς με ηπατοκυτταρική νόσο.

### 5.6.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ 5' -NU

#### Συλλογή δειγμάτων

Οι προσδιορισμοί της 5'-νουκλεοτιδάσης πραγματοποιούνται στον **ορό** και απαιτούν 2 mL αίματος που συλλέγεται χωρίς αντιπηκτικά σε χρονικά διαστήματα 24 έως 48 ωρών για την παρακολούθηση των μεταβολών που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της πορείας της θεραπείας. Η 5'-νουκλεοτιδάση παραμένει σταθερή στα δείγματα του ορού επί πέντε ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου, επί μία περίπου εβδομάδα σε θερμοκρασία ψυγείου και μέχρι ένα μήνα, όταν τα δείγματα διατηρηθούν στην κατάψυξη.

#### Αρχή της μεθόδου

Η μέτρησή της γίνεται όπως και της γ-GT. Ο προσδιορισμός της στηρίζεται στη διάσπαση της 5'-μονοφωσφορικής αδενοσίνης σε αδενοσίνη και φωσφορικό οξύ.

## 5.7 ΑΜΜΩΝΙΑ (NH<sub>3</sub>)

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η αμμωνία είναι ένα προϊόν του μεταβολισμού των αμινοξέων και επομένως του καταβολισμού των πρωτεϊνών. Σημαντικά ποσά αμμωνίας απορροφώνται επίσης από το γαστρεντερικό σωλήνα, όπου αυτή σχηματίζεται από βακτηριακή δράση σε πρωτεΐνες και αμινοξέα της τροφής. Ακόμα ένα ποσό αμμωνίας απορροφάται από τα αμμωνιακά άλατα της τροφής.

Η αμμωνία σχηματίζεται κυρίως στο ήπαρ κατά την οξειδωτική απαμίνωση των αμινοξέων. Μικρότερα ποσά αμμωνίας σχηματίζονται κατά τη μη οξειδωτική απαμίνωση των αμινοξέων και κατά την αερόβια οξείδωση διάφορων φυσιολογικών αμινών, όπως είναι η αδρεναλίνη και η ντοπαμίνη. Το ήπαρ απομακρύνει φυσιολογικά από την κυκλοφορία το μεγαλύτερο μέρος της αμμωνίας του αίματος. Στο ήπαρ η αμμωνία, η οποία είναι τοξική ένωση για τον οργανισμό, μετατρέπεται προς ουρία, η οποία δεν είναι τοξική ένωση και μπορεί να απεκκριθεί στα ούρα, επειδή είναι εξαιρετικά υδατοδιαλυτή. Οι συγκεντρώσεις της αμμωνίας του αίματος μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης της ηπατικής λειτουργίας, επειδή οποιαδήποτε βλάβη στα κύτταρα του ηπατικού παρεγχύματος μπορεί να ελαττώσει τη σύνθεση της ουρίας στο ήπαρ και να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων της αμμωνίας στο αίμα. Οι εργαστηριακοί προσδιορισμοί της αμμωνίας του αίματος είναι χρήσιμοι στην εκτίμηση βαρύτητας ηπατικής πάθησης, στη διάγνωση επικείμενου ή εγκαταστημένου ηπατικού κώματος, στην παρακολούθηση της προόδου της θεραπείας του και στην ανακάλυψη αιμορραγίας του γαστρεντερικού συστήματος, που οφείλεται σε κίρσους του οισοφάγου.

Τα φυσιολογικά επίπεδα της αμμωνίας στο αίμα εξαρτώνται από τη μέθοδο προσδιορισμού, που χρησιμοποιείται. Οι **τιμές αναφοράς** (φυσιολογικές τιμές) της αμμωνίας του αίματος είναι:

<b>Διάχυση</b>	<b>20 - 120</b>	<b>μg/dL</b>
<b>Μέθοδος ρητίνης</b>	<b>12 - 48</b>	<b>μg/dL</b>
<b>Ενζυμική μέθοδος</b>	<b>40 - 80</b>	<b>μg/dL</b>

### ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Αυξημένα επίπεδα αμμωνίας στο αίμα (υπεραμμωνιαιμία) προκαλούν την εμφάνιση τοξικών συμπτωμάτων στο κεντρικό νευρικό σύστημα, όπως είναι ο λήθαργος, ο τρόμος, οι επιληπτικές κρίσεις και το κώμα. Η οξεία υπεραμμωνιαιμία συχνά προκαλεί υπεραερισμό που οδηγεί σε αναπνευστική αλκάλωση, πιθανώς εξαιτίας της διέγερσης του αναπνευστικού κέντρου. Ωστόσο, το κύριο αποτέλεσμα της χρόνιας υπεραμμωνιαιμίας είναι η βλάβη της διανοητικής λειτουργίας. Μια ποικιλία νευρολογικών συμπτωμάτων, όπως είναι το κώμα, μπορεί να προκύψουν από τα υψηλά επίπεδα αμμωνίας στο αίμα, τα οποία συνοδεύουν μερικές φορές τις ηπατικές παθήσεις, όπως είναι η οξεία ηπατίτιδα, η κίρρωση προχωρημένου βαθμού και το σύνδρομο Reye.



Συγκεντρώσεις αμμωνίας στο αίμα 3-4 φορές πάνω από το ανώτερο φυσιολογικό όριο μπορεί να είναι υπεύθυνες για μερικά τοξικά συμπτώματα ηπατικού κώματος, τα οποία προκύπτουν από υψηλά επίπεδα αμμωνίας στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Η αιμορραγία από κίρσους του οισοφάγου ή οποιαδήποτε άλλη πηγή του γαστρεντερικού συστήματος σε ασθενείς με κίρρωση συνοδεύεται γενικά από αυξημένα επίπεδα αμμωνίας. Οι συγκεντρώσεις της αμμωνίας του αίματος σε άτομα χωρίς κίρρωση και με αιμορραγία στο γαστρεντερικό σύστημα είναι συνήθως φυσιολογικές.

Τα επίπεδα της αμμωνίας του αίματος σε ασθενείς με βλάβη της ηπατικής λειτουργίας μπορεί να είναι ελαττωμένα μερικές φορές, όταν ελέγχεται η πρόσληψη πρωτεϊνών με τις τροφές και χορηγούνται αντιβιοτικά, που ελαττώνουν τη δράση των μικροβίων του εντέρου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### ΝΑ ΜΗΝ ΞΕΧΝΩ:

- Το **ήπαρ** είναι το μεγαλύτερο όργανο του σώματος και εκτελεί πολλές σημαντικές βιοχημικές λειτουργίες. Πολλές εργαστηριακές δοκιμασίες χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση της ηπατικής λειτουργίας, όπως οι προσδιορισμοί της χολερυθρίνης, των τρανσαμινασών, της γ-GT, της 5'-νουκλεοτιδάσης, της αμμωνίας κ.α.
- Η **χολερυθρίνη** αποτελεί προϊόν του καταβολισμού της αίμης της αιμοσφαιρίνης, της μυοσφαιρίνης και ορισμένων ενζύμων που περιέχουν αίμη (κυτοχρώματα). Ίκτερος είναι η κίτρινη χρώση του δέρματος, των επιπεφυκότων και των βλεννογόνων που οφείλεται σε εναπόθεση χολερυθρίνης στους ιστούς, όταν τα επίπεδά της στο αίμα έχουν αυξηθεί υπερβολικά.
- Οι **τρανσαμινάσες** είναι ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις τρανσαμίνωσης και χρησιμοποιούν ως συνένζυμο φωσφορική πυριδοξάλη. Πολύ μεγάλο ενδιαφέρον στην κλινική ιατρική έχει ο προσδιορισμός στον ορό των τρανσαμινασών: οξαλοξική τρανσαμινάση (GOT) και πυρουβική τρανσαμινάση (GPT).
- Το ένζυμο **γ-GT** καταλύει τη μεταφορά μιας ομάδας γ-γλουταμυλίου από ένα γ-γλουταμυλοπεπτιδίο σε ένα άλλο πεπτιδίο ή αμινοξύ.
- Η **5'-νουκλεοτιδάση** είναι μία ειδική φωσφατάση που υδρολύει εκλεκτικά μονοφωσφορικούς εστέρες νουκλεοσιδίων και ιδιαίτερα εκείνους που η φωσφορική ομάδα είναι εστεροποιημένη στη θέση 5 της ριβόζης.
- Η **αμμωνία** είναι ένα προϊόν του μεταβολισμού των αμινοξέων και επομένως του καταβολισμού των πρωτεϊνών.
- Οι προσδιορισμοί των ενζύμων γίνονται με **κινητικές μεθόδους**, με τις οποίες μετριέται η δραστηριότητά τους. Στις μεθόδους αυτές πολύ σημαντική είναι η θερμοκρασία της αντίδρασης. Ο προσδιορισμός της χολερυθρίνης γίνεται με χρωματομετρική μέθοδο, η οποία επηρεάζεται από το ηλιακό φως.

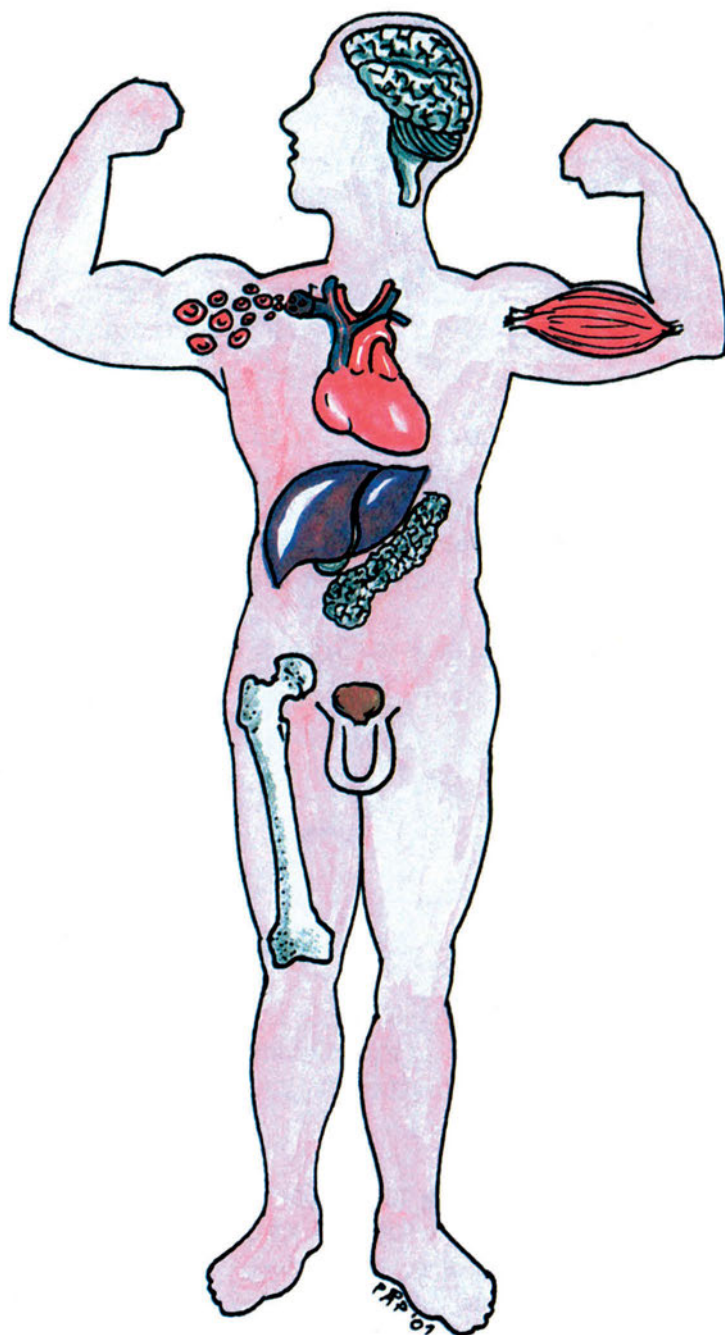
**ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ****ΘΕΩΡΙΑ**

1. Ποιες οι κυριότερες λειτουργίες του ήπατος;
2. Πώς διακρίνεται η χολερυθρίνη;
3. Τι είναι ο ίκτερος; Πώς διακρίνεται;
4. Αν μετρήσουμε τη χολερυθρίνη του ορού, μπορούμε να κάνουμε διαφορική διάγνωση ενός ίκτερου;
5. Τι είναι η τρανσαμίνωση;
6. Ποιες τρανσαμινάσες έχουν μεγάλο ενδιαφέρον στην κλινική ιατρική και γιατί;
7. Τι είναι η  $\gamma$ -GT και σε ποιες περιπτώσεις μας ενδιαφέρει ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής της στον ορό;
8. Τι είναι η 5'-νουκλεοτιδάση και πού χρησιμεύουν οι προσδιορισμοί των επιπέδων της στον ορό;
9. Πού χρησιμεύουν οι εργαστηριακοί προσδιορισμοί της αμμωνίας;
10. Τι είναι η υπεραμμωναιμία και τι συμπτώματα προκαλεί;

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

1. Ποια η αρχή προσδιορισμού της χολερυθρίνης; (ολικής και άμεσης)
2. Σημεία προσοχής στους προσδιορισμούς της χολερυθρίνης.
3. Ποια η αρχή προσδιορισμού της κινητικής μεθόδου για τον προσδιορισμό της SGOT;
4. Ποια η αρχή προσδιορισμού της κινητικής μεθόδου για τον προσδιορισμό της SGPT;
5. Ποιες είναι οι συνθήκες που πρέπει να τηρούνται στους προσδιορισμούς τρανσαμινασών ορού;
6. Τι είναι η θερμοστατούμενη κυβέττα και πού χρησιμοποιείται;

# Ένζυμα στο αίμα **κεφ.6**



## 6.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΟΛΗ

### ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ

Τα ένζυμα είναι **πρωτεΐνες με καταλυτικές ιδιότητες**. Είναι απαραίτητα στον οργανισμό μας. Χωρίς τα ένζυμα, καμία χημική αντίδραση (εκτός ελάχιστων εξαιρέσεων, όπως η διάσπαση των ηλεκτρολυτών) δεν μπορεί να γίνει.

### ΠΟΙΑ Η ΑΠΟΣΤΟΛΗ ΤΟΥΣ

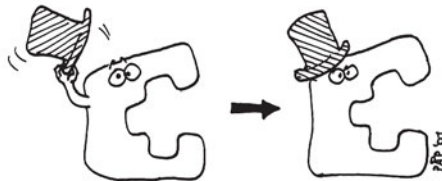
**Μεταβάλλουν την ταχύτητα των αντιδράσεων** που συμβαίνουν στον οργανισμό, χωρίς αυτά να μεταβάλλονται και χωρίς να συμμετέχουν στα τελικά προϊόντα.

### ΣΥΣΤΑΣΗ

Κάθε ένζυμο έχει **εξειδικευμένη δράση**, δηλ. καταλύει μια συγκεκριμένη αντίδραση. Έχουν ειδικές περιοχές στο μόριό τους που δεσμεύουν εκλεκτικά μια συγκεκριμένη ουσία ή μια μικρή ομάδα ουσιών. Οι περιοχές αυτές του ενζύμου λέγονται **ενεργά κέντρα ή ενεργές περιοχές**. Οι ουσίες που δεσμεύονται εκλεκτικά σ' αυτά, λέγονται **υποστρώματα**.

Κάθε ένζυμο αποτελείται από μια πρωτεΐνη (αποένζυμο) και μια προσθετική ομάδα (συνένζυμο).

**Αποένζυμο + συνένζυμο = ολοένζυμο**



### ΠΟΥ ΒΡΙΣΚΟΝΤΑΙ

Τα ένζυμα βρίσκονται σε όλους τους ιστούς και τα κύτταρα του ανθρώπου και των ζώων. Στα κύτταρα βρίσκονται καταναμεμημένα μέσα στα κυτταρικά οργανίδια, (π.χ. στον πυρήνα, στα μιτοχόνδρια, στα ριβοσώματα, στα λυσοσώματα κλπ).

### ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Κάθε ένζυμο παίρνει το όνομά του από *το είδος της αντίδρασης που καταλύει* π.χ. οξειδάσες, τρανσφεράσες, υδρολάσες, λυάσες κ.λπ. και από *το υπόστρωμα στο οποίο δρα* π.χ. οξειδάση της γλυκόζης, τρανσαμινάσες, φωσφατάσες, αφυδρογονάσες, κ.λπ. Προστίθεται δε στις περισσότερες περιπτώσεις η *κατάληξη -άση*.

Η συστηματική ταξινόμηση των ενζύμων διεθνώς τα διακρίνει σε 6 κατηγορίες:

1. Οξειδοαναγωγάσες (καταλύουν αντιδράσεις οξειδοαναγωγής)
2. Τρανσφεράσες (μεταφέρουν ομάδες σε αντιδράσεις)
3. Υδρολάσες (υδρολύουν δεσμούς σε αντιδράσεις)
4. Λυάσες (αφαιρούν ή προσθέτουν ομάδες σε διπλούς δεσμούς)
5. Ισομεράσες (ανακατατάσσουν ομάδες ενδομοριακά)
6. Λιγκάσες (συνθέτουν μόρια με ενέργεια από το ATP)

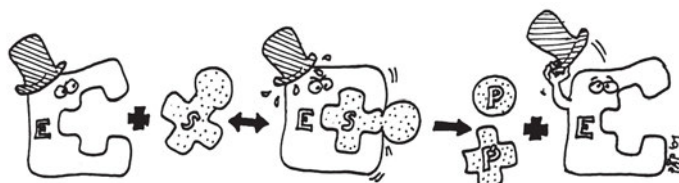
## ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ

Ο μηχανισμός της ενζυμικής αντίδρασης φαίνεται παρακάτω :



Το ένζυμο (E) συνδέεται χαλαρά και αντιστρεπτά με το υποστρώμα (S) και σχηματίζει ένα σύμπλοκο (ES). Στο τέλος της αντίδρασης το σύμπλοκο αυτό διασπάται σχηματίζοντας τα προϊόντα (P), ενώ το ένζυμο (E) παραμένει ανέπαφο. Παρατηρούμε δηλαδή ότι το ένζυμο αναπαράγεται με το τέλος της αντίδρασης.

Το πόσο γρήγορα παράγονται τα προϊόντα στην αντίδραση αυτή, είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση του συμπλέγματος ενζύμου – υποστρώματος.



## ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ

Ισοένζυμα ονομάζονται **ελαφρά διαφοροποιημένες μορφές** του ίδιου ενζύμου, στη μοριακή τους δομή, γενετικά καθορισμένες.

Τα ισοένζυμα ενός ενζύμου έχουν ίδια βιολογική δραστηριότητα με αυτό. Καταλύουν δηλ. την ίδια αντίδραση.

## Η ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΤΟ ΑΙΜΑ

Τα κυτταρικά ένζυμα συντίθενται στα κύτταρα και η παρουσία τους στο αίμα είναι περιορισμένη. Άλλα ένζυμα εκκρίνονται από τον εντερικό σωλήνα και μικρές ποσότητες καταλήγουν στην κυκλοφορία. Επίσης υπάρχουν και τα ειδικά ένζυμα του πλάσματος, όπως αυτά που συμβάλλουν στην πήξη του αίματος.

Η αύξηση της ποσότητας των ενζύμων στον ορό ή το πλάσμα οφείλεται σε παθολογικές καταστάσεις, όπου είτε υπάρχει **αυξημένη διαρροή ενζύμων** από τα κύτταρα, είτε **αυξημένη παραγωγή** τους από ιστό που πάσχει. Αύξηση επίσης παρατηρείται, όταν έχουμε **υπερπαραγωγή των κυττάρων** (π.χ. νεοπλασίες).

## ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

Τα ένζυμα δεν μπορούμε να τα προσδιορίσουμε ποσοτικά. Γι' αυτό μετρούμε την **ενζυμική τους δραστικότητα (ενεργότητα)**, αφήνοντάς τα να επιδράσουν επάνω σε ένα υπόστρωμα που περιέχει την ουσία την οποία διασπά το συγκεκριμένο ένζυμο. Μετά την επίδραση του ενζύμου, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου, μετρούμε τη δραστικότητά του με διάφορους τρόπους:

- α) μετρούμε το ποσό της ουσίας που **καταναλώθηκε** από το υπόστρωμα,
- β) μετρούμε το ποσό του προϊόντος, που **απελευθερώθηκε** από τη διάσπαση του υποστρώματος,
- γ) σε ένζυμα που η δραστικότητά τους προκαλεί την οξειδωση του **συνενζύμου** NADH σε NAD<sup>+</sup>, ή του NADPH σε NADP<sup>+</sup>, μετρούμε το ποσό του NADH ή του NADPH που οξειδώνεται κάθε 1 min, μετρώντας τη μείωση της απορρόφησης του NADH ή του NADPH.

## ΜΟΝΑΔΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΝΖΥΜΩΝ

Η δραστικότητα των ενζύμων εκφράζεται σε διεθνείς μονάδες (**International Unit = I.U. ή U**). Μια I.U. είναι το ποσό του ενζύμου που καταλύει τη διάσπαση ενός μολ του υποστρώματος σε 1 min κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και πικνότητας του υποστρώματος.

$$1 \text{ I.U.} = 1 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$$

Συνηθισμένες εκφράσεις, μονάδες ανά όγκο αίματος είναι: I.U./L ή U/L ή mU/mL. Αναφέρεται επίσης και η θερμοκρασία στην οποία γίνεται η αντίδραση. Γενικά έχει υιοθετηθεί η θερμοκρασία των 37 °C.

## ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

Είναι γνωστό ότι η **ταχύτητα μιας αντίδρασης είναι ανάλογη με την ποσότητα του ενζύμου που την καταλύει**. Στους προσδιορισμούς των ενζύμων μετράμε την εξέλιξη της αντίδρασης (δηλ. το πόσο γρήγορα προχωρά) και τις ονομάζουμε **κινητικές αντιδράσεις**. Είναι βέβαια συγχρόνως φωτομετρικές - χρωματομετρικές, εφόσον μετράμε την απορρόφηση χρώματος των διαφόρων ουσιών στο φωτόμετρο. Σε αυτές δηλ. μετράμε την απορρόφηση στο φωτόμετρο σε διάφορες χρονικές στιγμές κατά την εξέλιξη της αντίδρασης.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενζύμων γίνεται με συγκεντρώσεις υποστρώματος που ξεπερνούν το επίπεδο κορεσμού του ενζύμου. Κάτω από τις συνθήκες αυτές περιόσεως υποστρώματος η ταχύτητα της παραγωγής του προϊόντος αυξάνεται ανάλογα με τη συγκέντρωση του ενζύμου.

## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

Την ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων επηρεάζουν οι παρακάτω παράγοντες:

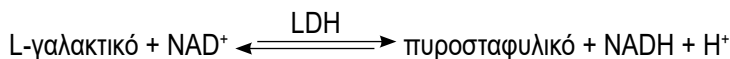
- **Το pH:** Τα περισσότερα ένζυμα εμφανίζουν μέγιστη δραστικότητα σε pH 7-8.
- **Η θερμοκρασία:** Η άριστη θερμοκρασία είναι μεταξύ 30-37 °C. Αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει τη δραστικότητα του ενζύμου.
- **Ενεργοποιητές και αναστολείς:** Είναι διάφορες ουσίες που αυξάνουν (ενεργοποιητές) ή ελαττώνουν (αναστολείς) τη δραστικότητα ενός ενζύμου. Συνήθεις ενεργοποιητές είναι ιόντα μετάλλων.
- **Συνένζυμα και προσθετικές ομάδες:** Τα διάφορα συνένζυμα και οι προσθετικές ομάδες συμβάλλουν στη δραστικότητα του ενζύμου.

## 6.2 ΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ ή ΔΕΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ

(Lactic Dehydrogenase – LD ή LDH)

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η Γαλακτική Αφυδρογονάση ή Δεϋδρογονάση (LDH) ανήκει στην κατηγορία των **οξειδοαναγωγασών** και καταλύει την αντιστρεπτή αντίδραση της οξειδωσης του L-γαλακτικού οξέος σε πυροσταφυλικό (ή πυρουβικό), με τη βοήθεια του συνενζύμου NAD<sup>+</sup>.



Η LDH δεν αποτελεί λειτουργικό συστατικό του πλάσματος. Είναι προϊόν του ενδοκυττάρου μεταβολισμού διαφόρων ιστών του οργανισμού μας. Υπάρχει **σε όλα τα κύτταρα** του σώματος μέσα στο κυτταρόπλασμά τους. Μεγαλύτερες ποσότητες της LDH βρίσκονται στην **καρδιά**, στο **ήπαρ**, στον **εγκέφαλο**, στους **σκελετικούς μύες**, στους **νεφρούς** και στα **ερυθρά αιμοσφαίρια**.

### ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΚΑΙ ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ

Το μόριο της Γαλακτικής Αφυδρογονάσης (LDH) αποτελείται από 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Αποτελείται από υπομονάδες **H** (Heart=καρδιά) που απομονώθηκαν στην καρδιά και από υπομονάδες **M** (Muscle=μυς) που απομονώθηκαν στους σκελετικούς μυς.

Από το συνδυασμό των υπομονάδων προκύπτουν τα 5 διαφορετικά **ισοένζυμα** της LDH: LDH1 (H<sub>4</sub>), LDH2 (H<sub>3</sub>M), LDH3 (H<sub>2</sub>M<sub>2</sub>), LDH4 (HM<sub>3</sub>), LDH5 (M<sub>4</sub>).

Οι συντελεστές μετά τον τύπο της αλυσίδας μας δείχνουν τον αριθμό των αλυσίδων σε κάθε μόριο ενζύμου.

Τα ισοένζυμα αυτά έχουν διαφορετικές φυσικές ιδιότητες όπως ευαισθησία στη θερμοκρασία και σε διάφορους αναστολείς, καθώς και διαφορετική ηλεκτροφορητική συμπεριφορά.

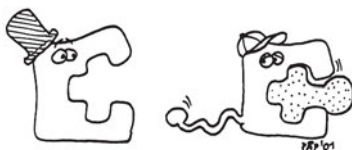


Τα ισοένζυμα παρατηρούνται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στους διάφορους ιστούς. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τους κατανέμονται ως εξής:

LDH1, LDH2: καρδιά, ερυθρά αιμοσφαίρια, εγκέφαλος, νεφροί.

LDH3: πάγκρεας, λεμφοκύτταρα.

LDH4, LDH5: ήπαρ, σκελετικοί μύες, πνεύμονες.



## ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Η απελευθέρωση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) στην κυκλοφορία του αίματος από έναν ιστό που πάσχει προκαλεί βεβαίως και αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου αυτού στον ορό ή το πλάσμα του αίματος. Επειδή όμως η γαλακτική αφυδρογονάση υπάρχει σε όλους τους ιστούς του σώματος, ο προσδιορισμός της στο αίμα **δεν είναι ειδικός**, δηλ. δεν μας δίνει στοιχεία για κάποια συγκεκριμένη πάθηση. Γι' αυτό το λόγο έχει περιορισμένη κλινική σημασία.

Αντίθετα σημαντικές πληροφορίες για παθολογικές καταστάσεις του οργανισμού μας δίνουν οι προσδιορισμοί των **ισοενζύμων** της, σε συνδυασμό βέβαια με την ολική LDH, αλλά και προσδιορισμούς άλλων ενζύμων του αίματος. Τα ισοένζυμα της LDH διαχωρίζονται με τη μέθοδο της **ηλεκτροφόρησης** του ορού.

Έτσι οι προσδιορισμοί της LDH και των ισοενζύμων της μας δίνουν πληροφορίες για τις παρακάτω ασθένειες:

**Έμφραγμα του μυοκαρδίου:** μικρές καταστροφές του καρδιακού μυός δίνουν αύξηση της ολικής LDH και του ισοενζύμου LDH1 και LDH2.

**Μεγαλοβλαστική αναιμία:** παρατηρείται αύξηση της ολικής LDH και των ισοενζύμων LDH1 και LDH2.

**Ηπατικές παθήσεις:** παρατηρούνται υψηλές συγκεντρώσεις των ισοενζύμων LDH4 και LDH5.

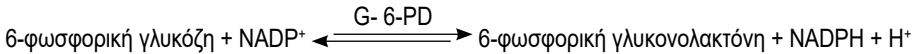
**Κακοήθη νεοπλάσματα:** παρατηρείται αύξηση της δραστηριότητας της LDH. Πολύ υψηλές τιμές έχουμε στο λέμφωμα Hodgkin καθώς και σε όγκους κοιλίας και πνεύμονα. Στους καρκινοπαθείς παρατηρούνται επίσης παθολογικές μορφές της LDH.

Διαγνωστικό ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης ο προσδιορισμός της LDH σε άλλα βιολογικά υγρά, όπως στα **ούρα** (για διαταραχές νεφρών) και στο **ΕΝΥ** (για διαταραχές του ΚΝΣ).

## 6.2.1 ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ G-6-PD ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ

### ΔΡΑΣΗ

Το ένζυμο Δεϋδρογονάση της 6-Φωσφορικής Γλυκόζης (G-6-PD) καταλύει την πρώτη αντίδραση του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών μετατρέποντας την 6-Φωσφορική Γλυκόζη σε 6-Φωσφορική Γλυκονολακτόνη.



### ΠΟΥ ΒΡΙΣΚΕΤΑΙ

Βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα του σώματος. Βρίσκεται δε σε μεγάλες ποσότητες στα ερυθρά αιμοσφαίρια και σ' αυτό οφείλεται η μεγάλη κλινική σημασία του.

### ΠΟΙΟΣ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ

Επειδή τα ερυθρά αιμοσφαίρια δεν έχουν μιτοχόνδρια για να παράγουν την **απαραίτητη ενέργεια** που χρειάζονται, αντλούν τις ενεργειακές τους ανάγκες από τις αντιδράσεις της γλυκόλυσης στις οποίες συμμετέχει το ένζυμο G-6-PD. Το ένζυμο αυτό είναι σημαντικό γιατί **προστατεύει τη μεμβράνη του ερυθρού αιμοσφαιρίου** από τις βλάβες (οξειδωση) και το ίδιο το κύτταρο από την καταστροφή του (αιμόλυση).

### ΕΛΛΕΙΨΗ ΤΟΥ G-6-PD

Στις περιπτώσεις έλλειψής του, κάτω από την επίδραση κάποιων **ουσιών ή φαρμάκων** παρουσιάζεται **αιμολυτική αναιμία** και ίκτερος. Η παρουσία ή η απουσία του ενζύμου G-6-PD ελέγχεται από ένα **γονίδιο**, το οποίο είναι υπολειπόμενο, φυλοσύνδετο και βρίσκεται στο X χρωμόσωμα. Η έλλειψή του είναι μια από τις πιο συχνά παρουσιαζόμενες και σημαντικές κλινικά γενετικές ανωμαλίες στον άνθρωπο.

### ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ

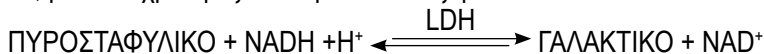
Σημαντικές ασθένειες συνδέονται με την έλλειψη του ενζύμου G-6-PD. Η έλλειψή του είναι η βασική αιτία του **κυαμισμού** (βαριά αιμόλυση που προκαλείται μετά από την κατάλυση κουκιών).

Βαριά **αιμόλυση** μπορεί να προκληθεί από τη χρήση ορισμένων **φαρμάκων** (π.χ. ασπιρίνη, αντιπυρίνη, κινίνη, χλωραμφενικόλη κ.α.), χημικών ουσιών (όπως ναφθαλίνης), σε περιπτώσεις διαβητικής οξέωσης, σπληαιμίας και σε λοιμώξεις.

## 6.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ LDH ΑΙΜΑΤΟΣ (Κινητική μέθοδος)

### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η LDH καταλύει την αντίδραση της μετατροπής του πυροσταφυλικού (ή πυρουβικού) σε γαλακτικό, με ταυτόχρονη οξειδωση του συνενζύμου NADH σε NAD<sup>+</sup> και αντίστροφα.



Το NADH έχει σημαντική απορρόφηση σε μήκος κύματος 340 nm στο φωτόμετρο, ενώ το NAD<sup>+</sup> δεν απορροφά καθόλου σ' αυτό το μήκος κύματος.

Μετρώντας την απορρόφηση του NADH στο φωτόμετρο σε διάφορες χρονικές στιγμές (τουλάχιστον δύο φορές) παρατηρούμε την εξέλιξη της αντίδρασης. Όσο εξελίσσεται η αντίδραση προς τα δεξιά, το NADH καταναλώνεται για να μετατραπεί σε NAD<sup>+</sup>. Η μέτρηση της ταχύτητας με την οποία μειώνεται η απορρόφηση του NADH (αφού αυτό μειώνεται λόγω της μετατροπής του) εκφράζει την ταχύτητα της αντίδρασης και είναι ανάλογη της δραστηριότητας του ενζύμου LDH που την καταλύει.

### ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- Σωληνάρια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληνάριων.
- Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέττες.
- Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- Φωτόμετρο αυτόματο.
- Ανακινήτης σωληναρίων (Vortex).
- Υδατόλουτρο.
- Χρονόμετρο χειρός.
- Parafilm.
- Γάντια και υαλογράφος.
- 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό της LDH.



6.1 Αυτόματες πιπέττες σε ειδικά στατώ

### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1) Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) pH 7,2 και το ανάλογο υπόστρωμα (πυροσταφυλικό).
- 2) Το συνένζυμο NADH σε σκόνη (λυοφιλοποιημένο).  
Το σετ των αντιδραστηρίων φυλάσσεται μέχρι την ημερομηνία λήξης του στο ψυγείο (σε θερμοκρασία 2 – 8 °C).
- 3) Απεσταγμένο νερό.

## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- **Ανασύσταση** αντιδραστηρίων:  
Ανακατεύουμε μια ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα με το φιαλίδιο, στο οποίο βρίσκεται το συνένζυμο σε σκόνη, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του σετ. Σε ορισμένες περιπτώσεις το συνένζυμο NADH είναι σε μορφή δισκίου, το οποίο διαλύουμε σε ορισμένη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος.
- **Μετά** την ανασύσταση των αντιδραστηρίων περιορίζεται ο χρόνος «ζωής» τους. Συνήθως διατηρούνται για μια εβδομάδα στο ψυγείο (2 – 8 °C). Πάντα σύμφωνα με τις οδηγίες που δίνει το σετ.

## ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ

Χρησιμοποιούμε συνήθως **ορό** ή **πλάσμα**. Το αίμα στην περίπτωση του πλάσματος πρέπει να έχει ληφθεί με αντιπηκτικό EDTA ή ηπαρίνη και όχι οξαλικά, γιατί μπορεί να δώσει ψευδή αποτελέσματα.

Προσέχουμε να μην υπάρχει αιμόλυση στον ορό, γιατί όπως αναφέραμε στα ερυθρά αιμοσφαίρια υπάρχει μεγάλη συγκέντρωση του ενζύμου η οποία θα επηρεάσει το αποτέλεσμα, δίνοντας ψευδώς αυξημένη τιμή.

Η μεταφορά του δείγματος στο εργαστήριο πρέπει να γίνεται αμέσως μετά τη λήψη του.

Η εξέταση πρέπει να γίνεται όσο το δυνατόν συντομότερα γιατί η δραστικότητα του ενζύμου φθίνει μετά από 3 ημέρες. Ο ορός διατηρείται στο ψυγείο (2-8 °C) και όχι στην κατάψυξη.

## ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

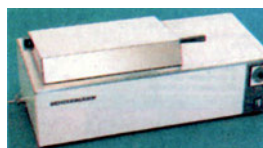
Πολύ σημαντικό ρόλο στη μέθοδο αυτή, αλλά και σε όλες τις ενζυμικές - κινητικές μεθόδους, παίζει η θερμοκρασία της αντίδρασης. Έτσι η μέθοδος αυτή μπορεί να γίνει σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (25 °C, 30 °C, 37 °C) με τη βοήθεια του υδατόλουτρου. Σ' αυτό ρυθμίζουμε την επιθυμητή θερμοκρασία του νερού.

Όταν λοιπόν τα σωληνάρια της εξέτασης εμβαπτιστούν με το ανάλογο στατό τους στο υδατόλουτρο, θα έχουμε και την επιθυμητή θερμοκρασία για την αντίδραση.

Η θερμοκρασία στην εξέταση είναι τόσο σημαντική, γιατί στις διάφορες θερμοκρασίες που αναφέραμε παραπάνω έχουμε και διαφορετικές φυσιολογικές τιμές.



6.2 Φωτόμετρο



6.3 Υδατόλουτρο

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Ανάβουμε το υδατόλουτρο, αφού προηγουμένως το γεμίσουμε, μέχρι τη στάθμη που επιθυμούμε με απεσταγμένο νερό.
- Ρυθμίζουμε τη θερμοκρασία που θέλουμε.
- Όταν η θερμοκρασία φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο, εμβαπτίζουμε, χωριστά, το έτοιμο αντιδραστήριο και το δείγμα στο υδατόλουτρο για να αποκτήσουν την απαιτούμενη θερμοκρασία της αντίδρασης.
- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:

	E	T
<b>Αντιδραστήριο 1+2</b>	3000 $\mu$ L	-
<b>Νερό Απεσταγμένο</b>	-	3000 $\mu$ L
<b>Ορός ή πλάσμα</b>	50 $\mu$ L	-

όπου: E=εξεταστέο  
T=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάρια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινητή.
- Επώαση για 2- 3΄ στο υδατόλουτρο (στους 25 °C, στους 30 °C ή στους 37 °C).
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέτες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 340 nm. Μηδενίζουμε με το τυφλό. Σημειώνουμε την απορρόφηση  $A_1$  πατώντας και το χρονόμετρο.
- Ξανά επώαση για 5΄ στο υδατόλουτρο (στους 25 °C, στους 30 °C ή στους 37 °C).
- Σε 5΄ ξανά φωτομέτρηση. Σημειώνουμε την απορρόφηση  $A_2$ .
- Σημ.: ο μηδενισμός του φωτομέτρου μπορεί να γίνει και με κενή κυβέττα.

\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ.

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αφαιρούμε τις δύο απορροφήσεις  $A_1$ - $A_2$  και πολλαπλασιάζουμε με έναν συντελεστή ο οποίος μας δίνεται από τον κατασκευαστή του σετ.

$(A_1 - A_2) \times \text{Συντελεστής} = \text{Τιμή εξεταστέου για τη LDH σε I.U./L}$

## ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)

Όπως γνωρίζουμε ήδη οι φυσιολογικές τιμές μιας μεθόδου εξαρτώνται και από τη μέθοδο που χρησιμοποιούμε στο εργαστήριο. Με κάποιες αποκλίσεις λοιπόν οι φυσιολογικές τιμές για την LDH είναι:

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	25 °C	30 °C	37 °C
ΜΟΝΑΔΕΣ LDH	<255 I.U./L	<320 I.U./L	<475 I.U./L

## ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

Όταν η τιμή της απορρόφησης είναι μεγαλύτερη από τη γραμμικότητα της μεθόδου που αναφέρεται στο σετ, τότε αραιώνουμε τον ορό (1/10), εκτελούμε την εξέταση και πολλαπλασιάζουμε το αποτέλεσμα x 10.

## ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Σε ορισμένα σετ η μέθοδος στηρίζεται στην αντίθετη φορά της αντίδρασης που αναφέραμε στην αρχή της μεθόδου. Εκτελείται όμως με ίδια τεχνική.
- Είναι προτιμότερο να φωτομετρούμε κάθε 1 λεπτό για 3 – 5 φορές το εξεταστέο σωληνάριο και να εξάγουμε το μέσο όρο της διαφοράς των απορροφήσεων. Το αποτέλεσμα τότε θα είναι ακριβέστερο.
- Όπως είπαμε, πολύ μεγάλη σημασία έχει εδώ η θερμοκρασία αντίδρασης. Από το χρόνο που βγάζουμε το σωληνάριο από το υδατόλουτρο και μέχρι να φωτομετρηθεί, η θερμοκρασία υφίσταται αλλαγές. Συνιστάται η χρήση σ' όλους τους κινητικούς προσδιορισμούς ειδικής **θερμοστατούμενης** κυβέτας. Δηλαδή, κυβέτας, η οποία διατηρεί σταθερή τη θερμοκρασία αντίδρασης.

## 6.2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ LDH

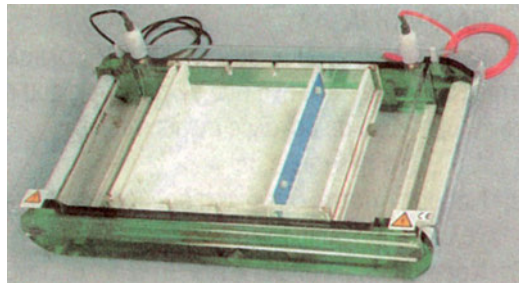
Ο προσδιορισμός των ισοενζύμων της LDH γίνεται με την ηλεκτροφορητική μέθοδο. Τα ισοένζυμα της LDH διαχωρίζονται σύμφωνα με την ηλεκτροφορητική τους συμπεριφορά όταν εκτελούμε την ηλεκτροφόρηση σε πλάκες αγαρόζης.

Για κάθε όργανο που έχει υποστεί βλάβη, η ηλεκτροφόρηση του ορού δίνει ένα ευδιάκριτο και χαρακτηριστικό ηλεκτροφορητικό διάγραμμα των ισοενζύμων της LDH.

Μετά το διαχωρισμό τους τα ισοένζυμα ανιχνεύονται χρωματομετρικά. Τα ισοένζυμα αυτά εμφανίζονται ως 5 μπλε συμμετρικές ζώνες των οποίων η ένταση του χρώματος φωτομετρείται σε ειδικά φωτόμετρα.

Οι φυσιολογικές τιμές των ισοενζύμων της LDH είναι:

LDH1	16 – 36%
LDH2	33 – 41%
LDH3	17 – 29%
LDH4	5,2 – 13%
LDH5	3,4 – 14%



6.4 Συσκευή ηλεκτροφόρησης

### 6.3 ΦΩΣΦΑΤΑΣΕΣ

Οι φωσφατάσες ανήκουν στα εκκριτικά ένζυμα. Εκκριτικά ονομάζονται τα ένζυμα τα οποία προέρχονται από εξωκρινείς αδένες (πάγκρεας, ήπαρ, προστάτης κ.α.). Τα ένζυμα αυτά λοιπόν, αποτελούν λειτουργικά συστατικά των εκκρίσεων. Στις φωσφατάσες ανήκει ένας μεγάλος αριθμός ενζύμων τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό. Υδρολύουν τη διάσπαση των φωσφορικών εστέρων κατά την οποία απελευθερώνεται φωσφορικό οξύ.

Διακρίνονται σε **αλκαλικές** και **όξιμες** ανάλογα με το βέλτιστο pH μέσα στο οποίο αυτές δρουν.

#### 6.3.1 ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ (Alkaline Phosphatase-ALP)

##### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Καταλύει σε αλκαλικό περιβάλλον (σε pH 9-14) την υδρόλυση των φωσφορικών εστέρων. Βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα **οστά**, στο **ήπαρ**, στο **έντερο**, στους **νεφρούς** και στον **πλακούντα**.

Φυσιολογικά το ένζυμο αυτό στον ορό βρίσκεται σε μικρές ποσότητες. Τα επίπεδα της αλκαλικής φωσφατάσης στον ορό είναι διαφορετικά αναλόγως της ηλικίας. Έτσι παρουσιάζονται υψηλά κατά τη γέννηση και παρά την πτώση τους με την αύξηση της ηλικίας, παραμένουν σε διπλάσια ή και τριπλάσια επίπεδα στα παιδιά από αυτά των ενηλίκων. Αυξάνονται δε πάλι αρκετά κατά την περίοδο της εφηβείας.

Φυσιολογική αύξηση του ενζύμου αυτού έχουμε κατά την εγκυμοσύνη και κυρίως το τελευταίο τρίμηνο.

Η αλκαλική φωσφατάση αποτελείται από **5** διαφορετικά **ισοένζυμα** τα οποία και προέρχονται από τους ιστούς των παραπάνω 5 διαφορετικών οργάνων του ανθρώπινου σώματος, στα οποία αυτή βρίσκεται. Ο διαχωρισμός τους στο εργαστήριο γίνεται με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης και με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων.

##### ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Γενικά όταν έχουμε αυξημένες τιμές αλκαλικής φωσφατάσης στον ορό του αίματος, στρέφουμε την προσοχή μας σε παθήσεις του ήπατος και των οστών, αφού εκεί βρίσκεται το ένζυμο αυτό σε μεγάλες συγκεντρώσεις.

Αύξησή έχουμε σε:

- α) Νόσους **ήπατος** όπως: ίκτερος (αποφρακτικός, ενδοηπατικός, εξωηπατικός), καρκίνος, χολολιθίαση, λοιμώδης ηπατίτιδα, κίρρωση, λοιμώδης μονοπυρήνωση κ.λ.π.
- β) Νόσους **οστών** όπως: κακοήγη νεοπλασμάτα, παραμορφωτική οστίτιδα, ραχίτιδα, νόσο Paget, υπερπαραθυρεοειδισμός, υποθυρεοειδισμός κ.λ.π.



Ελάττωση παρατηρείται σε χρόνια νεφρίτιδα, ανεπάρκεια βιταμίνης C, σε πλημμελή διατροφή κ.ά.

## 6.3.2 ΟΞΙΝΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ (Acid Phosphatase-ACP)

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η όξινη φωσφατάση είναι ένζυμο που καταλύει την ίδια αντίδραση με την αλκαλική φωσφατάση, αλλά σε όξινο περιβάλλον (ιδανικό pH 4,8-5). Βρίσκεται κύρια στον **προστάτη** και τα **ερυθρά** αιμοσφαίρια. Επίσης στα οστά, τους νεφρούς, το σπλήνα, το ήπαρ και στα αιμοπετάλια. Φυσιολογικά και αυτό το ένζυμο βρίσκεται στον ορό σε μικρές ποσότητες. Υπάρχουν διαφορές στα επίπεδα δραστηριότητας της ACP στον ορό, ανάλογα με το φύλο (μεγαλύτερα στους άνδρες από τις γυναίκες) και ανάλογα με την ηλικία (μεγαλύτερα στα παιδιά από τους ενήλικες).

Έχουν διαχωρισθεί **4 ισoenzymά της**, ένα από τα οποία (το σημαντικότερο) είναι η **προστατική όξινη φωσφατάση (Prostatic Acid Phosphatase - PAP)**, που βρίσκεται στον προστάτη και αποτελεί σοβαρό διαγνωστικό μέσο για τις παθήσεις του.

### ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

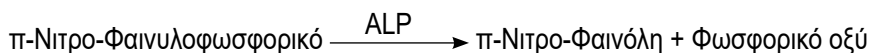
Αύξησή της έχουμε σε:

- α) **καρκίνο του προστάτη** και **προστατίτιδα** (αυξάνεται η προστατική όξινη φωσφατάση). Μεγάλη αύξηση της PAP παρουσιάζεται σε περιπτώσεις μεταστάσεων (στον καρκίνο του προστάτη) όπου χρησιμοποιείται ως καρκινικός δείκτης. Σήμερα η αξία του προσδιορισμού της PAP ως καρκινικού δείκτη έχει μειωθεί λόγω του προσδιορισμού του PSA (προστατικό καρκινικό αντιγόνο) και των απεικονιστικών μεθόδων.
- β) **καρκίνο του μαστού**, με μεταστάσεις σε οστά και ήπαρ.
- γ) νόσο του **Paget**, **υπερπαραθυρεοειδισμό**, **οστεοπόρωση**, **λευχαιμία**, κ.λ.π.  
Ελάττωση παραδοική παρατηρείται σε εμπύρετες καταστάσεις.

## 6.3.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΚΑΛΙΚΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ (ALP) (Κινητική μέθοδος)

### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

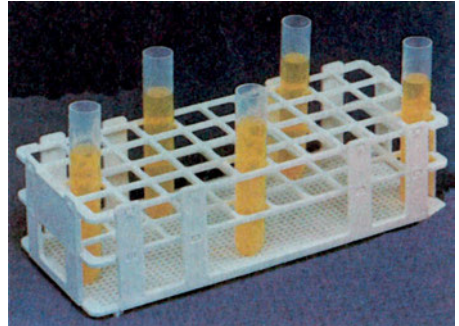
Το ένζυμο αυτό καταλύει σε αλκαλικό περιβάλλον (pH 10) τη διάσπαση του π-Νιτροφαινολφωσφορικού σε π-Νιτροφαινόλη και φωσφορικό οξύ.



Η φαινόλη που σχηματίζεται είναι ανάλογη της ενζυμικής ενεργότητας της ALP στο δείγμα και την μετράμε χρωματομετρικά (κίτρινο χρώμα).

## ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- Σωληνάρια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληναρίων.
- Πιπέτες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- Ρύγξη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέτες.
- Κυβέτες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- Φωτόμετρο αυτόματο.
- Ανακινητής σωληναρίων (Vortex).
- Υδατόλουτρο.
- Χρονόμετρο χειρός.
- Parafilm.
- Γάντια και υαλογράφος.
- 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό της ALP.



6.5 Σωληνάρια σε στατώ

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1) Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) με pH 9,8.
- 2) Το υπόστρωμα (π-Νιτροφαινολφοσφορικό) σε σκόνη (λυοφιλοποιημένο). Το σετ των αντιδραστηρίων φυλάσσεται μέχρι την ημερομηνία λήξης του στο ψυγείο (σε θερμοκρασία 2-8 °C).
- 3) Απεσταγμένο νερό.

## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- **Ανασύσταση** αντιδραστηρίων:  
Ανακατεύουμε μια ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα με το φιαλίδιο στο οποίο βρίσκεται το υπόστρωμα σε σκόνη, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του σετ. Σε ορισμένες περιπτώσεις το υπόστρωμα είναι σε μορφή δισκίου, το οποίο διαλύουμε σε ορισμένη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος.
- **Μετά** την ανασύσταση των αντιδραστηρίων περιορίζεται ο χρόνος «ζωής» τους. Συνήθως διατηρούνται για έναν μήνα στο ψυγείο (2-8 °C). Πάντα σύμφωνα με τις οδηγίες του σετ.

## ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ

Χρησιμοποιούμε συνήθως **ορό** ή **πλάσμα**. Το αίμα στην περίπτωση του πλάσματος πρέπει να έχει ληφθεί με αντιπηκτικό ηπαρίνη.

Προσέχουμε να μην υπάρχει αιμόλυση στον ορό γιατί όπως αναφέραμε στα ερυθρά αιμοσφαίρια υπάρχει μεγάλη συγκέντρωση του ενζύμου η οποία θα επηρεάσει το αποτέλεσμα.

## Ένζυμα στο αίμα **κεφ.6**

Η εξέταση πρέπει να γίνεται όσο το δυνατόν συντομότερα γιατί η δραστικότητα του ενζύμου φθίνει μετά από 7 ημέρες. Ο ορός διατηρείται στο ψυγείο (σε θερμοκρασία 2-8 °C) και όχι στην κατάψυξη.

### ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Και η μέθοδος αυτή μπορεί να γίνει σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (στους 25 °C, 30 °C, 37 °C) με τη βοήθεια του υδατόλουτρου.

### ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Ανάβουμε το υδατόλουτρο, αφού προηγουμένως το γεμίσουμε μέχρι τη στάθμη που επιθυμούμε με απεσταγμένο νερό.
- Ρυθμίζουμε τη θερμοκρασία που θέλουμε.
- Όταν η θερμοκρασία φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο, εμβαπτίζουμε, χωριστά, το έτοιμο αντιδραστήριο και το δείγμα στο υδατόλουτρο για να λάβουν την απαιτούμενη θερμοκρασία της αντίδρασης.
- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:

	<b>E</b>	<b>T</b>
<b>Αντιδραστήριο 1+2</b>	3000 $\mu$ L	-
<b>Νερό Απεσταγμένο</b>	-	3000 $\mu$ L
<b>Ορός ή πλάσμα</b>	50 $\mu$ L	-

όπου: E=εξεταστέο  
T=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάρια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινήτη.
- Επώαση για 2-3' στο υδατόλουτρο (στους 25 °C, στους 30 °C ή στους 37 °C).
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέττες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 405 nm. Μηδενίζουμε με το τυφλό. Σημειώνουμε την απορρόφηση  $A_1$  πατώντας και το χρονόμετρο.
- Ξανά επώαση για 5' στο υδατόλουτρο (στους 25 °C, στους 30 °C ή στους 37 °C).
- Σε 5' ξανά φωτομέτρηση. Σημειώνουμε την απορρόφηση  $A_2$ .
- Σημ.: ο μηδενισμός του φωτομέτρου μπορεί να γίνει και με κενή κυβέττα.

*\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ.*

### ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αφαιρούμε τις δύο απορροφήσεις  $A_2-A_1$  και πολλαπλασιάζουμε με έναν συντελεστή ο οποίος μας δίνεται από τον κατασκευαστή του σετ.

$(A_2-A_1) \times$  Συντελεστής= Τιμή εξεταστέου για την ALP σε I.U./L

## ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)

Όπως γνωρίζετε ήδη οι φυσιολογικές τιμές μιας μεθόδου εξαρτώνται και από τη μέθοδο που χρησιμοποιούμε στο εργαστήριο. Με κάποιες αποκλίσεις λοιπόν οι φυσιολογικές τιμές για την ALP είναι:

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	25 °C	30 °C	37 °C
ΜΟΝΑΔΕΣ ALP	60-170 I.U./L	73-207 I.U./L	98-279 I.U./L

## ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

Όταν η τιμή της απορρόφησης είναι μεγαλύτερη από τη γραμμικότητα της μεθόδου που αναφέρεται στο σετ, τότε αραιώνουμε τον ορό (1/10), εκτελούμε την εξέταση και πολλαπλασιάζουμε το αποτέλεσμα x 10.

## ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Είναι προτιμότερο να φωτομετρούμε κάθε 1 λεπτό για 3 – 5 φορές το εξεταστέο σωληνάριο και να εξάγουμε το μέσο όρο της διαφοράς των απορροφήσεων. Το αποτέλεσμα τότε θα είναι ακριβέστερο.

Όπως είπαμε, πολύ μεγάλη σημασία έχει εδώ η θερμοκρασία αντίδρασης. Κατά το χρόνο που βγάζουμε το σωληνάριο από το υδατόλουτρο μέχρι να φωτομετρηθεί, η θερμοκρασία υφίσταται αλλαγές. Συνίσταται η χρήση σ' όλους τους κινητικούς προσδιορισμούς ειδικής **θερμοστατούμενης** κυβέτας. Δηλ. κυβέτας, η οποία διατηρεί σταθερή τη θερμοκρασία αντίδρασης.

## 6.3.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΞΙΝΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ (ACP)

(Κινητική μέθοδος)

### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

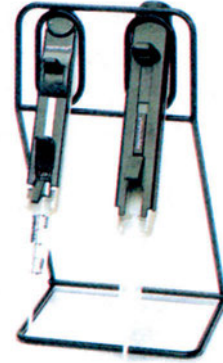
Η όξινη φωσφατάση καταλύει την ίδια αντίδραση με την αλκαλική με τη διαφορά ότι η αντίδραση για να γίνει χρειάζεται όξινο περιβάλλον (pH = 4,9). Για να διαχωρίσουμε το ισοένζυμο προστατική όξινη φωσφατάση (PAP), χρησιμοποιούμε τρυγικό το οποίο αναστέλλει τη δραστηριότητα μόνο της προστατικής και όχι των άλλων ισοενζύμων.

### ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- Σωληνάρια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληνάρων.
- Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.

## Ένζυμα στο αίμα **κεφ.6**

- Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέτες.
- Κυβέτες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- Φωτόμετρο αυτόματο.
- Ανακινήτης σωληναρίων (Vortex).
- Υδατόλουτρο.
- Χρονόμετρο χειρός.
- Parafilm.
- Γάντια και υαλογράφος.
- 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό της ACP.



6.6 Επαναληπτικές αυτόματες πιπέτες σε ειδικό στατώ

### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1) Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) με pH 4,8.
- 2) Το υπόστρωμα (π-Νιτροφαινολοφωσφορικό) σε σκόνη (λυοφιλοποιημένο).
- 3) Διάλυμα τρυγικού άλατος  
Το σετ των αντιδραστηρίων φυλάσσεται μέχρι την ημερομηνία λήξης του στο ψυγείο (σε θερμοκρασία 2-8 °C).
- 4) Απεσταγμένο νερό.

### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- **Ανασύσταση** αντιδραστηρίων:

Ανακατεύουμε μια ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα με το φιαλίδιο στο οποίο βρίσκεται το υπόστρωμα σε σκόνη, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του σετ. Σε ορισμένες περιπτώσεις το υπόστρωμα είναι σε μορφή δισκίου, το οποίο διαλύουμε σε ορισμένη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος.

- **Μετά** την ανασύσταση των αντιδραστηρίων περιορίζεται ο χρόνος «ζωής» τους.

Συνήθως διατηρούνται για μια εβδομάδα στο ψυγείο (2-8 °C). Πάντα σύμφωνα με τις οδηγίες που δίνει ο κατασκευαστής του σετ.

### ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ

Χρησιμοποιούμε μόνο **ορό** μη αιμολυμένο.

Ο ορός πρέπει να ληφθεί άμεσα μετά την πήξη του αίματος. Η εξέταση πρέπει να γίνεται όσο το δυνατόν συντομότερα γιατί η δραστικότητα του ενζύμου παραμένει σταθερή μόνο 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και μέχρι μια εβδομάδα όταν ο ορός διατηρείται στο ψυγείο (2-8 °C) ή στην κατάψυξη (-20 °C). Για να διατηρηθεί όμως ο ορός πρέπει να προσθέσουμε 10 μL οξικού οξέος 20 % ανά mL ορού.

## ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Και η μέθοδος αυτή μπορεί να γίνει σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες (στους 30 °C και στους 37 °C) με τη βοήθεια του υδατόλουτρου.

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Ανάβουμε το υδατόλουτρο, αφού προηγουμένως το γεμίσουμε μέχρι τη στάθμη που επιθυμούμε με απεσταγμένο νερό.
- Ρυθμίζουμε τη θερμοκρασία που θέλουμε.
- Όταν η θερμοκρασία φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο, εμβαπτίζουμε, χωριστά, το έτοιμο αντιδραστήριο και το δείγμα στο υδατόλουτρο, για να λάβουν την απαιτούμενη θερμοκρασία της αντίδρασης.
- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάκια\*:



6.7 Υδατόλουτρο

	για ΟΛΙΚΗ	για μη ΠΡΟΣΤΑΤΙΚΗ	Τ
	Ε	Ε	
Αντιδραστήριο 1+2	2000 μL	2000 μL	-
Νερό Απεσταγμένο	-	-	2200 μL
Τρυγικό άλας	-	20 μL	-
Ορός ή πλάσμα	200 μL	200 μL	-

όπου: Ε=εξεταστέο  
Τ=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάκια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινήτη.
- Επώαση για 2-3' στο υδατόλουτρο (στους 30 °C ή στους 37 °C).
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέτες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 405 nm. Μηδενίζουμε με το τυφλό που περιέχει απεσταγμένο νερό ή με κενή κυβέττα. Σημειώνουμε την απορρόφηση  $A_1$  για την ολική και  $A_2$  για την μη προστατική, πατώντας και το χρονόμετρο.
- Ξανά επώαση για 5' στο υδατόλουτρο (στους 30 °C ή στους 37 °C).
- Σε 5' ξανά φωτομέτρηση. Σημειώνουμε τις απορροφήσεις  $A_1$  και  $A_2$ '.

\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ.

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αφαιρούμε τις δύο απορροφήσεις και πολλαπλασιάζουμε με έναν συντελεστή ο οποίος μας δίνεται στο σετ.

$(A_1' - A_1) \times \text{Συντελεστής} = \text{Τιμή εξεταστέου για την ολική ACP σε I.U./L}$

$[(A_1' - A_1) - (A_2' - A_2)] \times \text{Συντελεστής} = \text{Τιμή εξεταστέου για την PAP (προστατική) σε I.U./L.}$

$A_1$  και  $A_1'$  εκφράζουν την ολική ACP, ενώ  $A_2$  και  $A_2'$  τη μη προστατική. Άρα η διαφορά τους εκφράζει την PAP)

## Ένζυμα στο αίμα **κεφ.6**

### ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)

Όπως γνωρίζετε ήδη οι φυσιολογικές τιμές μιας μεθόδου εξαρτώνται και από τη μέθοδο που χρησιμοποιούμε στο εργαστήριο. Με κάποιες αποκλίσεις λοιπόν οι φυσιολογικές τιμές για την Ολική και την Προστατική όξινη φωσφατάση είναι:

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ		30 °C	37 °C
ΜΟΝΑΔΕΣ Ολικής ACP	(άνδρες)	<4,3 I.U./L	<5,4 I.U./L
	(γυναίκες)	<3,1 I.U./L	<4,2 I.U./L
ΜΟΝΑΔΕΣ	PAP	<1,5 I.U./L	<1,7 I.U./L

### ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

Όταν η τιμή της απορρόφησης είναι μεγαλύτερη από τη γραμμικότητα της μεθόδου που αναφέρεται στο σετ, τότε αραιώνουμε τον ορό (1/10), εκτελούμε την εξέταση και πολλαπλασιάζουμε το αποτέλεσμα x 10.

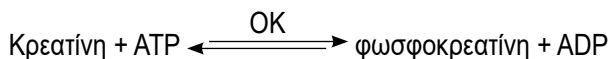
### ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ίδιες παρατηρήσεις με την αλκαλική φωσφατάση.

## 6.4 ΚΙΝΑΣΗ ΤΗΣ ΚΡΕΑΤΙΝΗΣ (Creatine Kinase -CK)

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Το ένζυμο κινάση της κρεατίνης (CK) γνωστό και ως φωσφοκινάση της κρεατίνης ή κρεατινοφωσφοκινάση (CPK), καταλύει την φωσφορυλίωση της κρεατίνης από το ATP και με τη μετατροπή της σε φωσφοκρεατίνη, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.



Η CK βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στους **γραμμωτούς σκελετικούς μυς**, στο **μυοκάρδιο** και στον **εγκέφαλο**. Στους άλλους μυς βρίσκεται σε μικρές ποσότητες. Στα ερυθρά αιμοσφαίρια και στο ήπαρ δεν απαντάται καθόλου. Αποτελεί ενεργειακή εφεδρεία για τους μυς.

Σε περιπτώσεις έντονης σωματικής άσκησης αυξάνεται φυσιολογικά στο αίμα. Φυσιολογικά αυξημένη βρίσκεται επίσης στο αίμα τους πρώτους μήνες της ζωής των νεογνών.



## ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ

Η CK αποτελείται από **3 ισοένζυμα** τα οποία διαχωρίζονται με ηλεκτροφορητικές μεθόδους. Αυτά είναι: CK1, CK2, CK3.

Το μόριο της CK είναι διμερές. Αποτελείται από 2 πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Αυτές είναι τύπου M (Muscle=μυς) ή τύπου B (Brain=εγκέφαλος).

Έτσι η CK1 συμβολίζεται και CK1-BB γιατί έχει 2 αλυσίδες τύπου B. Η CK2 συμβολίζεται και CK2-MB γιατί έχει 1 αλυσίδα τύπου M και 1 τύπου B. Η CK3 συμβολίζεται και CK3-MM γιατί έχει 2 αλυσίδες τύπου M.

Το ισοένζυμο CK1-BB βρίσκεται κυρίως στον εγκέφαλο και στο νευρικό ιστό.

Το ισοένζυμο CK2-MB βρίσκεται κυρίως στο μυοκάρδιο και ελάχιστο ποσό στους μυς.

Το ισοένζυμο CK3-MM βρίσκεται κυρίως στους σκελετικούς μυς.

## ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Είναι φανερό, ότι, ο προσδιορισμός του ενζύμου αυτού δίνει πληροφορίες, σχετικές με τα όργανα, στα οποία βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Ο δε προσδιορισμός των ισοενζύμων δίνει πληροφορίες για την ακριβή πηγή – δηλαδή το όργανο από το οποίο προέρχονται τα αυξημένα επίπεδα του ενζύμου αυτού στο αίμα.

Έτσι υψηλές τιμές CK, θα έχουμε σε ασθένειες όπως:

1. **Έμφραγμα** του μυοκαρδίου, με ιδιαίτερη αύξηση του ισοενζύμου CK2-MB, ο προσδιορισμός του οποίου δίνει σαφείς πληροφορίες για το έμφραγμα, αφού όπως αναφέραμε παραπάνω αυτό το ισοένζυμο βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση στο μυοκάρδιο. Οι μέγιστες τιμές ενεργότητας της CK ανιχνεύονται 24-36 ώρες μετά το έμφραγμα και μπορεί να φθάσουν το 10πλάσιο και πλέον των φυσιολογικών.
2. **Νόσους του κεντρικού νευρικού** συστήματος, όπως εγκεφαλική ισχαιμία, τραύματα της κεφαλής κ.ά.
3. **Μυϊκή δυστροφία διαφόρων τύπων**, με ιδιαίτερη αύξηση του ισοενζύμου CK1-MM. Υπάρχουν περιπτώσεις που η αύξηση της CK φθάνει τις 300-400 φορές παραπάνω από το φυσιολογικό.
4. **Άλλες νόσους** όπως υποθυρεοειδισμός, καρκίνος κ.ά.

### 6.4.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ CK ΑΙΜΑΤΟΣ

(Κινητική μέθοδος)

#### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η φωσφοκρεατίνη αντιδρά με το ADP παρουσία του ενζύμου CK και παράγεται κρεατίνη και ATP. Η γλυκόζη με το ATP δίνει G-6-P και ADP. Το G-6-P με NAD<sup>+</sup> μετατρέπεται σε 6-γλυκονικό οξύ και NADH. Ο ρυθμός παραγωγής του NADH είναι ανάλογος της δραστηριότητας της CK στο εξεταστέο δείγμα.

## ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- Σωληνάκια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληναρίων.
- Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέττες.
- Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- Φωτόμετρο αυτόματο.
- Ανακινήτης σωληναρίων (Vortex).
- Υδατόλουτρο.
- Χρονόμετρο χειρός.
- Parafilm.
- Γάντια και υαλογράφος.
- 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό της CK.

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1) Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) με pH 6,7 και υπόστρωμα.
- 2) Το υπόστρωμα και τα ένζυμα σε σκόνη (λυοφιλοποιημένο).  
Το σετ των αντιδραστηρίων φυλάσσεται μέχρι την ημερομηνία λήξης του στο ψυγείο (σε θερμοκρασία 2-8 °C).
- 3) Απεσταγμένο νερό.

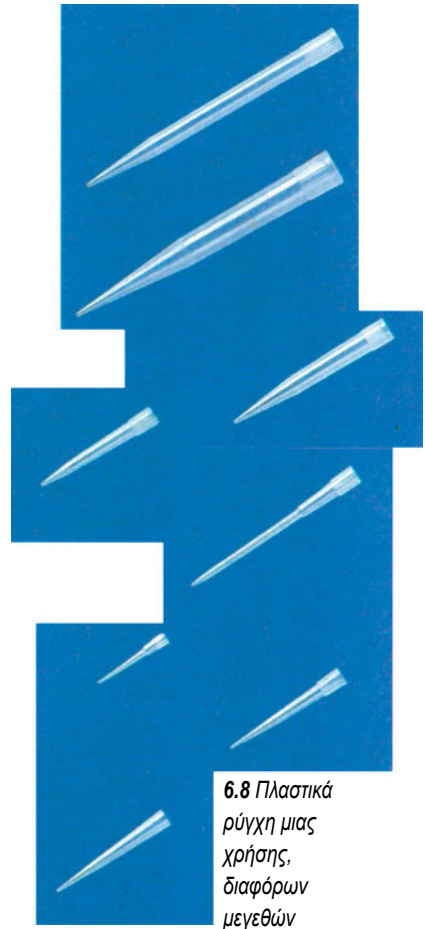
## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- **Ανασύσταση** αντιδραστηρίων:  
Ανακατεύουμε μια ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα με το φιαλίδιο στο οποίο βρίσκεται το υπόστρωμα σε σκόνη, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του σετ. Σε ορισμένες περιπτώσεις το υπόστρωμα είναι σε μορφή δισκίου, το οποίο διαλύουμε σε ορισμένη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος.
- **Μετά** την ανασύσταση των αντιδραστηρίων περιορίζεται ο χρόνος «ζωής» τους. Συνήθως διατηρούνται για μια εβδομάδα στο ψυγείο (2-8 °C). Πάντα σύμφωνα με τις οδηγίες που δίνει το σετ.

## ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ

Χρησιμοποιούμε **ορό** ή **πλάσμα**. Δεν επηρεάζει ο αιμολυμένος ορός με όριο αιμοσφαιρίνης 200 mg/dL.

Ο ορός πρέπει να ληφθεί άμεσα μετά την πήξη του αίματος. Η εξέταση πρέπει να γίνεται



6.8 Πλαστικά  
ρύγχη μιας  
χρήσης,  
διαφόρων  
μεγεθών

όσο το δυνατόν συντομότερα γιατί η δραστηκότητα του ενζύμου παραμένει σταθερή μόνο 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και μέχρι μια εβδομάδα όταν ο ορός διατηρείται στο ψυγείο (2-8 °C). Ακατάλληλα θεωρούνται τα δείγματα όταν διατηρηθούν στην κατάψυξη (-20 °C).

### ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Και η μέθοδος αυτή μπορεί να γίνει σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (στους 25 °C, 30 °C, 37 °C) με τη βοήθεια του υδατόλουτρου.

### ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Ανάβουμε το υδατόλουτρο, αφού προηγουμένως το γεμίσουμε μέχρι τη στάθμη που επιθυμούμε με απεσταγμένο νερό.
- Ρυθμίζουμε τη θερμοκρασία που θέλουμε.
- Όταν η θερμοκρασία φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο, εμβαπτίζουμε, χωριστά, το έτοιμο αντιδραστήριο και το δείγμα στο υδατόλουτρο, για να λάβουν την απαιτούμενη θερμοκρασία της αντίδρασης.
- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάκια\*:

	E	T
<b>Αντιδραστήριο 1 +2</b>	3000 μL	-
<b>Νερό Απεσταγμένο</b>	-	3000 μL
<b>Ορός ή πλάσμα</b>	50 μL	-

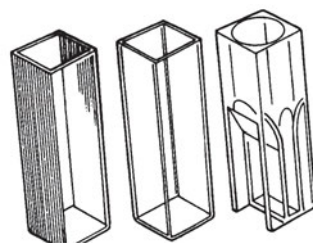
όπου: E=εξεταστέο  
T=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάκια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινήτη.
- Επώαση για 2-3' στο υδατόλουτρο (στους 25 °C, στους 30 °C ή στους 37 °C).
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέτες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 340 nm. Μηδενίζουμε με το τυφλό. Σημειώνουμε την απορρόφηση  $A_1$  πατώντας και το χρονόμετρο.
- Ξανά επώαση για 5' στο υδατόλουτρο (στους 25 °C, στους 30 °C ή στους 37 °C).
- Σε 5' ξανά φωτομέτρηση. Σημειώνουμε την απορρόφηση  $A_2$ .
- Σημ.: ο μηδενισμός του φωτομέτρου μπορεί να γίνει και με κενή κυβέττα.

\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ.

### ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αφαιρούμε τις δύο απορροφήσεις  $A_2-A_1$  και πολλαπλασιάζουμε με έναν συντελεστή ο οποίος αναφέρεται στο σετ.  $(A_2-A_1) \times \text{Συντελεστής} = \text{Τιμή εξεταστέου για την CK σε I.U./L}$



6.9 Πλαστικές κυβέτες φωτομέτρου

## ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)

Όπως γνωρίζετε ήδη οι φυσιολογικές τιμές μιας μεθόδου εξαρτώνται και από τη μέθοδο που χρησιμοποιούμε στο εργαστήριο. Με κάποιες αποκλίσεις λοιπόν οι φυσιολογικές τιμές για την κινάση της κρεατίνης είναι:

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ		25 °C	30 °C	37 °C
ΜΟΝΑΔΕΣ CK	(άνδρες)	<80 I.U./L	<130 I.U./L	<195 I.U./L
	(γυναίκες)	<70 I.U./L	<110 I.U./L	<170 I.U./L

## ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

Όταν η τιμή της απορρόφησης είναι μεγαλύτερη από τη γραμμικότητα της μεθόδου που αναφέρεται στο σετ, τότε αραιώνουμε τον ορό (1/10), εκτελούμε την εξέταση και πολλαπλασιάζουμε το αποτέλεσμα x 10.

## ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ίδιες παρατηρήσεις με την αλκαλική φωσφατάση.

## 6.5 ΑΜΥΛΑΣΗ (Amylase - AML)

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Το πεπτικό ένζυμο Αμυλάση (α-αμυλάση) ανήκει στην κατηγορία των **υδρολασών** και δρα λυτικά (δηλ. τα διασπά) στο **άμυλο** και στο **γλυκογόνο**.

Η αμυλάση βρίσκεται κυρίως στο πάγκρεας και στους σιελογόνους αδένες. Ο προσδιορισμός της στο αίμα και στα ούρα, στα οποία βιολογικά υγρά βρίσκεται σε ποσότητες που μπορεί να ανιχνευθεί, έχει διαγνωστική αξία για ορισμένες νόσους. Η αμυλάση του αίματος αποβάλλεται σταθερά από τα ούρα. Το ένζυμο αυτό δεν υπάρχει στο αίμα του νεογνού, αλλά εμφανίζεται σιγά-σιγά και μέχρι το τέλος του 1<sup>ου</sup> έτους βρίσκεται στα επίπεδα των ενηλίκων.

### ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Η αμυλάση **αυξάνεται** στο αίμα στις παρακάτω νόσους:

- σε **οξεία παγκρεατίτιδα** (για μικρό χρονικό διάστημα μετά την έναρξη της νόσου), όπως και σε άλλες νόσους του παγκρέατος (διαβητικό κώμα, απόφραξη παγκρεατικού πόρου και εντέρου, διάτρηση γαστρικού έλκους κ.ά.).
- σε διάφορες **παρωτίτιδες**.
- σε νόσους νεφρών, δηλητηριάσεις, χρόνια αλκοολισμό κ.ά.

**Ελάττωση** της αμυλάσης στον ορό του αίματος μπορεί να παρατηρηθεί σε περιπτώσεις καρκίνου ήπατος, χρόνιας παγκρεατίτιδας, ηπατίτιδας, κίρρωσης ήπατος, κ.ά.

**Η ΑΜΥΛΑΣΗ ΣΤΑ ΟΥΡΑ**

Αύξηση της αμυλάσης στα ούρα παρατηρείται σε κάθε περίπτωση όπου αυτή αυξάνεται στο αίμα, εφόσον βέβαια λειτουργούν σωστά οι νεφροί. Ο προσδιορισμός της αμυλάσης στα ούρα έχει διαγνωστική κυρίως αξία στην οξεία παγκρεατίτιδα, γιατί σε αντίθεση με το αίμα, το ένζυμο παραμένει σε υψηλές τιμές για 7-10 ημέρες από την έναρξη της νόσου. Η εξέταση γίνεται συνήθως σε ούρα 24ώρου.

**6.5.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΥΛΑΣΗΣ (AML)  
(Κινητική μέθοδος)****ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ**

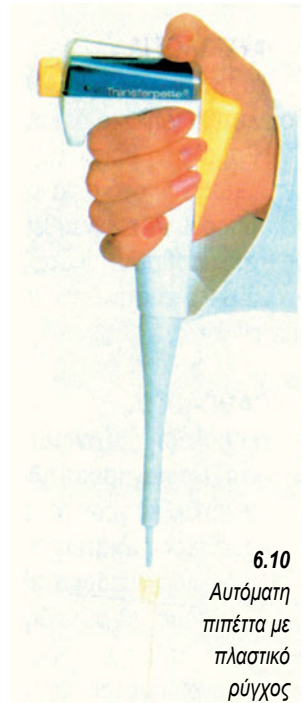
Η αμυλάση καταλύει την αντίδραση του π-Νιτροφαινυλ-μαλτοεπτοξειδίου και παράγει πολυμερή της γλυκόζης και ολιγοσακχαρίτες της π-νιτροφαινόλης. Αυτά υδρολύονται με τη γλυκοαμυλάση και την α-γλυκοσιδάση και παράγουν π-νιτροφαινόλη. Η π-νιτροφαινόλη που παράγεται, είναι ανάλογη της ενεργότητας της αμυλάσης στο εξεταστέο δείγμα.

**ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ**

- ▶ Σωληνάρια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- ▶ Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληνάριων.
- ▶ Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- ▶ Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέττες.
- ▶ Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- ▶ Φωτόμετρο αυτόματο.
- ▶ Ανακινήτης σωληναρίων (Vortex).
- ▶ Υδατόλουτρο.
- ▶ Χρονόμετρο χειρός.
- ▶ Parafilm.
- ▶ Γάντια και υαλογράφος.
- ▶ 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό της αμυλάσης.

**ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ**

- 1) Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) με pH 6,9 και υπόστρωμα.
- 2) Το υπόστρωμα και τα ένζυμα σε σκόνη (λυοφιλοποιημένο). Το σετ των αντιδραστηρίων φυλάσσεται μέχρι την ημερομηνία λήξης του στο ψυγείο (σε θερμοκρασία 2-8 °C).
- 3) Απεσταγμένο νερό.



**6.10**  
Αυτόματη  
πιπέτα με  
πλαστικό  
ρύγχος

## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- **Ανασύσταση** αντιδραστηρίων:  
Ανακατεύουμε μια ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα, με το φιαλίδιο στο οποίο βρίσκεται το υπόστρωμα σε σκόνη, σύμφωνα με τις οδηγίες του σετ. Σε ορισμένες περιπτώσεις το υπόστρωμα είναι σε μορφή δισκίου, το οποίο διαλύουμε σε ορισμένη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος.
- **Μετά** την ανασύσταση των αντιδραστηρίων περιορίζεται ο χρόνος «ζωής» τους. Συνήθως διατηρούνται για μια εβδομάδα στο ψυγείο (2-8 °C). Πάντα σύμφωνα με τις οδηγίες που δίνει ο κατασκευαστής του σετ.

## ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ

Χρησιμοποιούμε **ορό** ή **πλάσμα** από αίμα που ελήφθη με ηπαρίνη. Επίσης χρησιμοποιούμε και **ούρα 24ώρου** αραιωμένα κατά το 1/3 με απεσταγμένο νερό.

Ο ορός για τον προσδιορισμό της αμυλάσης διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για μια εβδομάδα. Επίσης στο ψυγείο (2-8 °C) και στην κατάψυξη (-20 °C) μπορεί να διατηρηθεί για μήνες, αν τοποθετηθεί αμέσως μετά τη συλλογή του.

## ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Και η μέθοδος αυτή μπορεί να γίνει σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (στους 25 °C, 30 °C, 37 °C) με τη βοήθεια του υδατόλουτρου.

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Ανάβουμε το υδατόλουτρο, αφού προηγουμένως το γεμίσουμε μέχρι τη στάθμη που επιθυμούμε με απεσταγμένο νερό.
- Ρυθμίζουμε τη θερμοκρασία που θέλουμε.
- Όταν η θερμοκρασία φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο, εμβαπτίζουμε, χωριστά, το έτοιμο αντιδραστήριο και το δείγμα στο υδατόλουτρο, για να αποκτήσουν την απαιτούμενη θερμοκρασία της αντίδρασης.
- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια \*:

	<b>E</b>	<b>T</b>
<b>Αντιδραστήριο 1 +2</b>	3000 μL	-
<b>Νερό Απεσταγμένο</b>	-	3000 μL
<b>Ορός ή πλάσμα</b>	50 μL	-

όπου: E=εξεταστέο  
T=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάκια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινήτη.
- Επώαση για 2-3' στο υδατόλουτρο (στους 25 °C, στους 30 °C ή στους 37 °C).
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέττες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 405 nm. Μηδενίζουμε με το τυφλό. Σημειώνουμε την απορρόφηση  $A_1$  πατώντας ταυτόχρονα και το χρονόμετρο.
- Ξανά επώαση για 5' στο υδατόλουτρο (στους 25 °C, στους 30 °C ή στους 37 °C).
- Σε 5 ξανά φωτομέτρηση. Σημειώνουμε την απορρόφηση  $A_2$ .
- Σημ.: ο μηδενισμός του φωτομέτρου μπορεί να γίνει και με κενή κυβέττα.  
\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ.

### ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αφαιρούμε τις δύο απορροφήσεις  $A_2-A_1$  και πολλαπλασιάζουμε με έναν συντελεστή ο οποίος μας δίνεται από το σετ.

$(A_2-A_1) \times \text{Συντελεστής} = \text{Τιμή εξεταστέου για την AML σε I.U./L}$

### ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)

Όπως γνωρίζετε ήδη οι φυσιολογικές τιμές μιας μεθόδου εξαρτώνται και από τη μέθοδο που χρησιμοποιούμε στο εργαστήριο. Με κάποιες αποκλίσεις λοιπόν οι φυσιολογικές τιμές για την αμυλάση είναι:

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	25 °C	30 °C	37 °C
ΜΟΝΑΔΕΣ AML (αίμα)	<40 I.U./L	<55 I.U./L	<90 I.U./L
(ούρα 24ωρου)	<110 I.U./24ωρο	<170 I.U./24ωρο	<450 I.U./24ώρο

### ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

Όταν η τιμή της απορρόφησης είναι μεγαλύτερη από τη γραμμικότητα της μεθόδου που αναφέρεται στο σετ, τότε αραιώνουμε τον ορό (1/6), εκτελούμε την εξέταση και πολλαπλασιάζουμε το αποτέλεσμα x 6.

### ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ίδιες παρατηρήσεις με την αλκαλική φωσφατάση.

## 6.6 ΨΕΥΔΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗ (Cholinesterase - ChE)

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Οι χολινεστεράσες είναι ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση των εστέρων της χολίνης. Υπάρχουν δυο είδη χολινεστερασών. Η πρώτη ονομάζεται **πραγματική χολινε-**



**στεράση** (αληθής ή γνήσια) και βρίσκεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια, στα νεύρα, στους πνεύμονες, στο σπλήνα και στη φαιά ουσία του εγκεφάλου. Η δεύτερη ονομάζεται **ψευδοχολινεστεράση ή χολινεστεράση του ορού** και βρίσκεται στον ορό του αίματος, στο ήπαρ, στο πάγκρεας, στην καρδιά και στη λευκή ουσία του εγκεφάλου.

### **ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ**

Ο προσδιορισμός της ψευδοχολινεστεράσης αποκτά ιδιαίτερη σημασία στους ασθενείς που κάνουν προληπτικά εξετάσεις προκειμένου να υποβληθούν σε μεγάλες εγχειρήσεις. Το ένζυμο αυτό **διασπά ένα μυοχαλαρωτικό φάρμακο** (σουκινυλοχολίνη) που χορηγείται σε αυτές τις περιπτώσεις. Έτσι όταν υπάρχει χαμηλή συγκέντρωση του ενζύμου αυτού στον άνθρωπο που έχει χειρουργηθεί και ναρκωθεί, παρατείνεται η επένεργεια του φαρμάκου και έτσι παραλύει η αναπνοή του για μερικές ώρες μετά τη χορήγηση του φαρμάκου και γενικότερα παρατηρείται μια περίοδος γενικής χαλάρωσης των μυών. Επίσης ο προσδιορισμός της έχει διαγνωστική αξία σε περιπτώσεις δηλητηριάσεων με ζιζανιοκτόνα ή εντομοκτόνα φάρμακα.

### **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΨΕΥΔΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ**

Ο προσδιορισμός της ψευδοχολινεστεράσης στο αίμα ακολουθεί την τεχνική των προηγούμενων κινητικών μεθόδων που έχουν περιγραφεί στο κεφάλαιο αυτό.

### **Αρχή της μεθόδου**

Η ψευδοχολινεστεράση καταλύει την αντίδραση της διάσπασης της βουτυρυλ -θειοχολίνης και με τη βοήθεια ειδικών αντιδραστηρίων παράγεται χρωματιστή ουσία που είναι ανάλογη της δραστηριότητας του ενζύμου στο εξεταστέο δείγμα.

### **Δείγμα**

Χρησιμοποιούμε **ορό** ή **πλάσμα** από αίμα που ελήφθη με ηπαρίνη.

### **Τιμές αναφοράς (Φυσιολογικές τιμές)**

Στον ορό ή το πλάσμα είναι 3000-9300 I.U./L (25 °C) ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### ΝΑ ΜΗΝ ΞΕΧΝΩ

- Τα **ένζυμα** είναι πρωτεΐνες με καταλυτικές ιδιότητες. Μεταβάλλουν την ταχύτητα των αντιδράσεων, χωρίς να μεταβάλλονται και χωρίς να συμμετέχουν στα τελικά προϊόντα.
- Κάθε ένζυμο καταλύει μια συγκεκριμένη αντίδραση, παίρνει δε το **όνομά** του από το είδος της αντίδρασης που καταλύει και από το υπόστρωμα στο οποίο δρα. Τα ένζυμα έχουν συνήθως την κατάληξη **-άση**.
- **Ισοένζυμα** ονομάζονται ελαφρά διαφοροποιημένες μορφές του ίδιου ενζύμου. Καταλύουν όμως την ίδια αντίδραση.
- Στους προσδιορισμούς ενζύμων μετράμε τη **δραστικότητα** τους που εκφράζεται σε διεθνείς μονάδες (International Unit = I.U.). Μεγάλη σημασία έχει η θερμοκρασία στην οποία γίνεται η αντίδραση (συνήθως 37 °C).
- Η ταχύτητα μιας αντίδρασης είναι ανάλογη με την ποσότητα του ενζύμου που την καταλύει. Στους προσδιορισμούς των ενζύμων μετράμε την εξέλιξη της αντίδρασης (**κινητικές μέθοδοι**).
- Η **LDH** βρίσκεται κυρίως στην καρδιά, στο ήπαρ, στον εγκέφαλο, στους σκελετικούς μύες, στους νεφρούς και στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Οι προσδιορισμοί των 5 ισοενζύμων της μας δίνουν πληροφορίες για ορισμένες ασθένειες.
- Στις περιπτώσεις έλλειψης του **G-6-PD**, κάτω από την επίδραση κάποιων ουσιών ή φαρμάκων παρουσιάζεται αιμολυτική αναιμία και ίκτερος.
- Η **αλκαλική φωσφατάση** αυξάνεται σε νόσους του ήπατος και των οστών.
- Η **όξινη φωσφατάση** και κυρίως το σημαντικότερο ισοένζυμό της, η προστατική, αυξάνεται σε καρκίνο του προστάτη και προστατίτιδα.
- Η **κίνηση της κρεατίνης** βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στους γραμμωτούς σκελετικούς μύες, στο μυοκάρδιο και στον εγκέφαλο. Έχει 3 ισοένζυμα. Υψηλές τιμές της έχουμε στο έμφραγμα του μυοκαρδίου.
- Η **αμυλάση** διασπά το άμυλο και το γλυκογόνο. Αυξάνεται κυρίως στην οξεία παγκρεατίτιδα.
- Η **ψευδοχολινεστεράση** διασπά ένα μυοχαλαρωτικό φάρμακο που χορηγείται σε μεγάλες εγχειρήσεις.

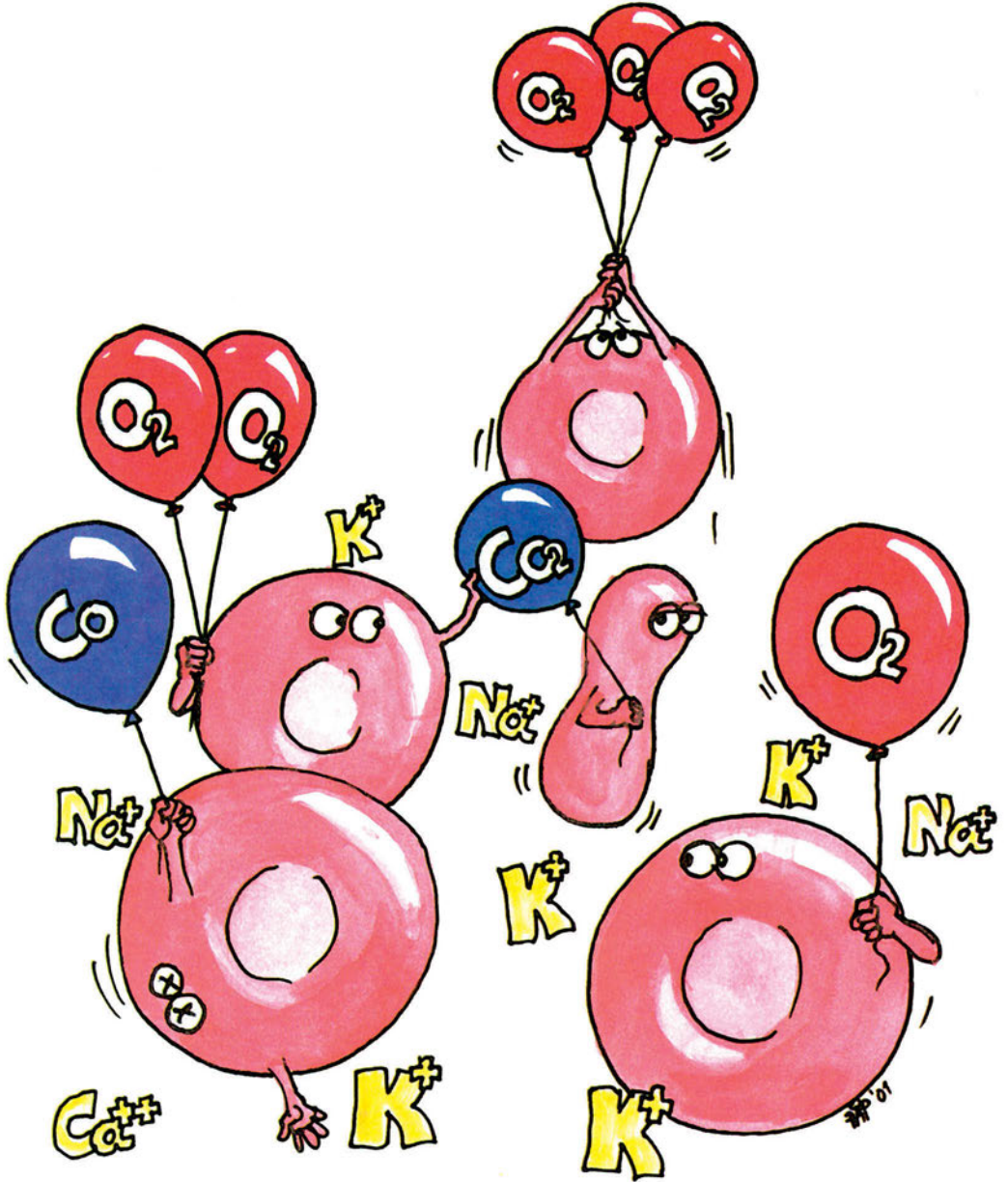
## **ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ**

### **ΘΕΩΡΙΑ**

1. Τι είναι τα ένζυμα και ποια η αποστολή τους;
2. Πώς παίρνουν το όνομά τους τα ένζυμα;
3. Τι είναι τα ισoenζυμα;
4. Τι ονομάζουμε κινητικές αντιδράσεις;
5. Ποιοι παράγοντες επηρεάζουν την ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων;
6. Πού βρίσκεται η LDH στον οργανισμό μας;
7. Σε ποιες ασθένειες τα ισoenζυμα της LDH μας δίνουν σαφή παθολογική εικόνα;
8. Ποιος είναι ο ρόλος του ενζύμου G-6-PD και σε τι παθολογική κατάσταση οδηγεί η έλλειψή του;
9. Φωσφατάσες: Πού βρίσκονται και για ποιες ασθένειες η αύξησή τους έχει καθοριστική σημασία;
10. Κινάση της κρεατίνης: Πού βρίσκονται τα ισoenζυμά της και για ποιες ασθένειες η αύξησή τους έχει καθοριστική σημασία;
11. Ποια η κλινική σημασία του προσδιορισμού της ψευδοχολινεστεράσης;

### **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

1. Ποιες συνθήκες απαιτείται να τηρούνται στο εργαστήριο κατά την πραγματοποίηση των προσδιορισμών ενζύμων;
2. Εξηγήστε γιατί στις κινητικές μεθόδους προσδιορισμού των ενζύμων μετράμε στο φωτόμετρο 2 ή περισσότερες φορές την απορρόφηση. Πώς υπολογίζουμε το αποτέλεσμα;
3. Ποια η αρχή προσδιορισμού της κινητικής μεθόδου για τον προσδιορισμό της Αλκαλικής φωσφατάσης;
4. Ποια η αρχή προσδιορισμού της κινητικής μεθόδου για τον προσδιορισμό της όξινης φωσφατάσης;
5. Ποια η αρχή προσδιορισμού της κινητικής μεθόδου για τον προσδιορισμό της κινάσης της κρεατίνης;
6. Ποια η αρχή προσδιορισμού της κινητικής μεθόδου για τον προσδιορισμό της LDH;



## 7.1 ΓΕΝΙΚΑ

Μέσα στο πλάσμα του αίματος βρίσκονται διαλυμένοι ηλεκτρολύτες, όπως κάλιο ( $K^+$ ), νάτριο ( $Na^+$ ), χλώριο ( $Cl^-$ ), ασβέστιο ( $Ca^{2+}$ ), μαγνήσιο ( $Mg^{2+}$ ), φώσφορος ( $PO_4^{3-}$ ) κ.ά.

Βρίσκονται υπό μορφή **ιόντων** (κατιόντων και ανιόντων). Ο φώσφορος και άλλα αμέταλλα στοιχεία βρίσκονται σε μορφή πολυατομικών ανιόντων, όπως φωσφορικά ( $PO_4^{3-}$ ).

### ΜΟΝΑΔΕΣ:

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους στο αίμα, επειδή βρίσκονται σε ιοντισμό σ' αυτό, χρησιμοποιείται η έκφραση mEq/L (χιλιοστοϊσοδύναμα ανά λίτρο).

$$\text{Σχέση με mg/dL: mEq/L} = \frac{\text{mg/dL} \times 10 \times \text{Σθένος}}{\text{A.B.}}$$

Όπου A.B.=Ατομικό Βάρος του στοιχείου.

Σήμερα τείνουν να επικρατήσουν οι μονάδες του διεθνούς συστήματος, που είναι το mmol/L (χιλιοστομόλ ανά λίτρο). Όμως ακόμα αρκετά εργαστήρια στην Ελλάδα δίνουν τα αποτελέσματά τους για τους ηλεκτρολύτες, κυρίως για το κάλιο και το νάτριο, σε mEq/L.

$$\text{Σχέση με mmol/L : mEq/L} = \text{mmol/L} \times \text{Σθένος}$$

## 7.2 ΝΑΤΡΙΟ

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Το νάτριο σε μορφή **κατιόντος** ( $Na^+$ ), είναι το κυριότερο ιόν του **πλάσματος** (εξωκυττάριο). Το νάτριο προσλαμβάνεται από τις τροφές, κυρίως από το αλάτι ( $NaCl$ ).

Απορροφάται στο έντερο από τις τροφές και βρίσκεται κυρίως στο αίμα και το εξωκυττάριο υγρό σε ενεργό μορφή. Αποβάλλεται καθημερινά με τα ούρα, τα κόπρανα και τον ιδρώτα.

Η κύρια αποστολή του στον οργανισμό είναι η συμβολή στη διατήρηση της **ωσμωτικής πίεσης** ανάμεσα σε εξωκυττάριο και ενδοκυττάριο υγρό. Η διακίνηση του νατρίου είναι στενά συνδεδεμένη με τη διακίνηση του νερού, συμβάλλοντας στη σωστή κατανομή του στο σώμα μας. Συμβάλλει στην **οξεοβασική ισορροπία** του οργανισμού και στις νευρομυϊκές διεγέρσεις.

### ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Αύξηση (**υπερνατριαιμία**) συμβαίνει σε περιπτώσεις αφυδάτωσης, άποιου διαβήτη, τραυματισμού στο κεφάλι ιδιαίτερα στην περιοχή του υποθαλάμου κ.λπ.

Ελάττωση (**υπονατριαιμία**) συμβαίνει όταν έχουμε απώλεια νατρίου από το νεφρό (νόσο ADDISON), το γαστρεντερικό (εμετούς, διάρροιες), εφίδρωση, ορμονικές διαταραχές. Η βαριά υπονατριαιμία μπορεί να προκαλέσει ακόμη και το θάνατο.

## 7.3 ΚΑΛΙΟ

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Είναι το **κατίον** των **κυττάρων**. Μικρές ποσότητες του βρίσκονται και στον εξωκυττάριο χώρο.

Βρίσκεται στις περισσότερες τροφές από τις οποίες και προσλαμβάνεται. Αποβάλλεται από τα ούρα και λιγότερο από τα κόπρανα και τον ιδρώτα.

Η κύρια λειτουργία του είναι να παίρνει μέρος στη διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας, στη διακίνηση του νερού, της γλυκόζης, των φαρμάκων κ.λ.π. μεταξύ ενδοκυττάρου και εξωκυττάρου χώρου.

Συμβάλλει στις νευρομυϊκές διεγέρσεις. Ιδιαίτερη σημασία έχει για τον καρδιακό μυ.

### ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Αύξηση καλίου (**υπερκαλιαιμία**) έχουμε σε ανεπάρκεια απέκκρισής του από το νεφρό (νεφρική ανεπάρκεια), όταν παρατηρούνται καταστροφές κυττάρων (σε αιμολυτικές νόσους) κ.λπ.

Ελάττωση καλίου (**υποκαλιαιμία**) παρατηρείται σε απώλειά του είτε από το νεφρό είτε από το γαστρεντερικό (με εμετούς, διάρροιες) κ.λπ.

## 7.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΑΤΡΙΟΥ-ΚΑΛΙΟΥ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ

### ΓΕΝΙΚΑ

Παλαιότερα ως κυριότερη μέθοδος για τον προσδιορισμό τους, αναφέρονταν η φλογοφωτομετρική, με τη χρήση του φλογοφωτομέτρου. Τα τελευταία όμως χρόνια προτιμάται ο προσδιορισμός τους με ειδικούς αυτόματους αναλυτές, που χρησιμοποιούν ιοντοεπιλεκτικά ηλεκτρόδια, ενώ το φλογοφωτόμετρο έχει εγκαταλειφθεί.



### ΑΡΧΗ ΦΛΟΓΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η διέγερση ενός χημικού στοιχείου σε φλόγα έχει σαν αποτέλεσμα την εκπομπή φάσματος φωτός, που είναι χαρακτηριστικό για το στοιχείο.

Αν σε μια ισχυρή άχρωμη φλόγα ψεκάσουμε ένα διάλυμα μιας ουσίας (π.χ. ορό που περιέχει  $K^+$  και  $Na^+$ ) με τη μορφή λεπτότατου νέφους σταγονιδίων, διεγείρεται και εκπέμπεται έγχρωμη φλόγα. Η ένταση του χρώμα-



## Ηλεκτρολύτες και αέρια αίματος **κεφ.7**

τος της φλόγας είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα που ψεκάσθηκε. Το χρώμα της φλόγας που παράγεται από το νάτριο, είναι διαφορετικό από το χρώμα που παράγεται από το κάλιο. Χρησιμοποιώντας διαφορετικά φίλτρα, διαχωρίζουμε τη συγκέντρωση των δυο ιόντων στο ίδιο δείγμα.

Το χρώμα της φλόγας μετριέται με ένα γαλβανόμετρο σε οπτική πυκνότητα (αφού μετατραπεί η φωτεινή σε ηλεκτρική ενέργεια με ένα φωτοκύτταρο).

### ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΙΟΝΤΟΕΠΙΛΕΚΤΙΚΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ

Είναι μέθοδος για τον προσδιορισμό ιόντων ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  κ.λπ.) με τη χρήση ιοντοεπιλεκτικών ηλεκτροδίων. Η αρχή της λειτουργίας τους στηρίζεται στην ιδιότητα ορισμένων μεμβρανών, που βρίσκονται στα ηλεκτρόδια αυτά, να είναι επιλεκτικά διαπερατές προς μια κατεύθυνση για συγκεκριμένα ιόντα. Η δίοδος όμως των ιόντων δημιουργεί ανισοκατανομή τους από τις δύο μεριές της μεμβράνης και άρα διαφορά δυναμικού. Η **διαφορά δυναμικού** μπορεί να μετρηθεί και είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ιόντος στο εξεταστέο δείγμα.

Χρησιμοποιούμε μικρούς αναλυτές που βασίζονται σε αυτή την αρχή. Οι αναλυτές με ιοντοεπιλεκτικά ηλεκτρόδια ονομάζονται και **αναλυτές ISE** (από τα αρχικά των λέξεων Ion-Selective Electrode, που σημαίνουν ιοντοεπιλεκτικό ηλεκτρόδιο).

Τα ηλεκτρόδια μπορεί: α) να είναι γυάλινα, από διοξείδιο του πυριτίου με πρόσμιξη διαφόρων μετάλλων, β) να αποτελούνται από αντιβιοτικά ή άλατα και γ) να αποτελούνται από κάποιο κρύσταλλο. Η σύσταση του ηλεκτροδίου εξαρτάται από το είδος των ιόντων που θέλουμε να ανιχνεύσουμε.

Συνιστάται ο τακτικός έλεγχος (βαθμονόμηση) του οργάνου καθώς και ο έλεγχος ποιότητας με ορούς ελέγχου που προσφέρουν οι κατασκευαστές των οργάνων.

### ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ

Χρησιμοποιούμε **ορό** αίματος. Τα δείγματα του ορού για τον προσδιορισμό νατρίου και καλίου είναι σταθερά τουλάχιστον για 2 εβδομάδες σε θερμοκρασία δωματίου ή στο ψυγείο ( $4^\circ\text{C}$ ).

Η μέτρηση σε μικρούς αναλυτές με ιοντοεπιλεκτικά ηλεκτρόδια μπορεί να γίνει και στο **ολικό αίμα**.

Σε περίπτωση που στον εξεταζόμενο χορηγούνται ενδοφλέβια ηλε-



7.1 Αναλυτής ISE για τον προσδιορισμό ιόντων



7.2 Ιοντοεπιλεκτικά ηλεκτρόδια



κτρολύτες (φυσιολογικός ορός κ.λπ.), η λήψη του αίματος γίνεται από φλέβα η οποία βρίσκεται μακριά από τη φλέβα της χορήγησης (συνήθως στο άλλο χέρι).

Ειδικά για τον προσδιορισμό του καλίου, προσέχουμε **να μην προκληθεί αιμόλυση**, γιατί το κάλιο βρίσκεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια σε 20πλάσια συγκέντρωση από ότι στον ορό ή το πλάσμα. Είναι κατανοητό λοιπόν ότι η αιμόλυση θα δώσει ψευδώς αυξημένο ποσό για το κάλιο του ορού.

Τα δείγματα αίματος πρέπει **να μεταφερθούν αμέσως** μετά τη συλλογή τους στο εργαστήριο. Θα πρέπει δε (ειδικά για το κάλιο) να φροντίσουμε για τον άμεσο διαχωρισμό του ορού.

## ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)

Νάτριο: 136 - 148 mEq/L ή mmol/L

Κάλιο : 3,5 - 5,6 mEq/L ή mmol/L

## 7.5 ΧΛΩΡΙΟ

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Το χλώριο ως ανιόν ( $Cl^-$ ) παραλαμβάνεται με τις τροφές μαζί με το νάτριο και ακολουθεί το μεταβολισμό του. Είναι το αφθονότερο **ανιόν** στον εξωκυττάριο χώρο και στο πλάσμα του αίματος. Αφθονο είναι επίσης και στο γαστρικό υγρό. Αποβάλλεται από το νεφρό, από τα κόπρανα και τον ιδρώτα.

### ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Αύξηση χλωρίου (**υπερχλωραιμία**) συμβαίνει σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις υπερνατριαιμίας.

Ελάττωση χλωρίου (**υποχλωραιμία**) παρατηρείται σε απώλεια γαστρικού υγρού, μεγάλης ποσότητας ιδρώτα κ.λπ.



### 7.5.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΛΩΡΙΟΥ

#### (Χρωματομετρική μέθοδος)

Το χλώριο εκτός από τον προσδιορισμό του με τα ιοντοεπιλεκτικά ηλεκτρόδια, μπορεί να προσδιορισθεί και με τις χρωματομετρικές μεθόδους στο φωτόμετρο.

### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα ιόντα χλωρίου σχηματίζουν ένα έγχρωμο σύμπλοκο με διάλυμα νιτρικού υδραργύρου. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των ιόντων χλωρίου.

# Ηλεκτρολύτες και αέρια αίματος **κεφ.7**

## ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- Σωληνάρια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληναρίων.
- Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέττες.
- Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- Φωτόμετρο αυτόματο.
- Ανακινήτης σωληναρίων (Vortex).
- Parafilm.
- Γάντια και υαλογράφος.
- 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό χλωρίου.



7.3 Αυτόματες πιπέττες σε ειδικό στατώ

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1) Νιτρικός Υδράργυρος (έτοιμο διάλυμα)
- 2) Πρότυπο διάλυμα χλωρίου (περιέχει ποσότητα 100 mEq/L ή mmol/L)

## ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Χρησιμοποιούμε **ορό** αίματος. Ισχύουν οι γενικότερες παρατηρήσεις που αναφέραμε για το κάλιο και το νάτριο όσον αφορά τη λήψη και τη συντήρηση του δείγματος.

Στα **ούρα 24ώρου**: ελέγχουμε με χάρτινο δείκτη αν είναι αλκαλικά και προσθέτουμε μερικά mL διαλύματος  $H_2SO_4$ , ούτως ώστε να έχουν pH περίπου 3. Το δείγμα των ούρων αραιώνεται κατά 1/2 με απεσταγμένο νερό (δηλ. 1 mL απεσταγμένο νερό και 1 mL ούρα 24ώρου).



7.4 Σωληνάρια με δείγματα ορών προς εξέταση σε στατώ

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:

	E	St	T
<b>Αντιδραστήριο 1</b>	2000 $\mu$ L	2000 $\mu$ L	2000 $\mu$ L
<b>Πρότυπο διάλυμα</b>	-	20 $\mu$ L	-
<b>Ορός ή πλάσμα</b>	20 $\mu$ L	-	-

όπου: E=εξεταστέο  
St=standard  
T=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάρια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινήτη.
- Παραμονή για 5' στους 20 – 25 °C (θερμοκρασία δωματίου).

- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέτες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 480 nm. Το χρώμα παραμένει σταθερό 1 ώρα.  
\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

Η συγκέντρωση του χλωρίου του εξεταζόμενου δείγματος υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$C \text{ χλωρίου ορού σε mEq/L ή mmol/L} = C_{st} \times \frac{A_{(E)}}{A_{(st)}}$$

**ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)** 98-107 mEq/L ή mmol/L  
**ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ** έως 130 mEq/L ή mmol/L

## 7.6 ΟΞΕΟΒΑΣΙΚΗ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Οι ηλεκτρολύτες του πλάσματος χωρίζονται σε θετικά φορτισμένα ιόντα τα οποία ονομάζονται **κατιόντα** και σε αρνητικά φορτισμένα ιόντα τα οποία ονομάζονται **ανιόντα**.

Κατιόντα είναι το νάτριο ( $\text{Na}^+$ ), το κάλιο ( $\text{K}^+$ ), το ασβέστιο ( $\text{Ca}^{2+}$ ), και το μαγνήσιο ( $\text{Mg}^{2+}$ ). Ανιόντα είναι το χλώριο ( $\text{Cl}^-$ ), τα διπτανθρακικά ( $\text{HCO}_3^-$ ), τα φωσφορικά ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ), τα θειικά ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), το λεύκωμα κ.α

**Το pH του πλάσματος είναι μεταξύ 7,35 – 7,42.** Παραμένει σταθερό χάρις στο μηχανισμό των ρυθμιστικών συστημάτων που αυτό περιέχει. Διακυμάνσεις του pH πέρα από τα παραπάνω όρια δεν συμβιβάζονται με τη συνέχιση της λειτουργίας των κυττάρων και επομένως με τη διατήρηση της ζωής.

Τα **ρυθμιστικά συστήματα** είναι τέσσερα:

- Τα διπτανθρακικά:  
 $\text{H}_2\text{CO}_3$  (Ανθρακικό οξύ)  $\leftrightarrow$   $\text{H}^+$  +  $\text{HCO}_3^-$  (Όξινο Ανθρακικό οξύ)
- Τα φωσφορικά:  
 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (δισόξινο φωσφορικό οξύ)  $\leftrightarrow$   $\text{H}^+$  +  $\text{HPO}_4^{2-}$  (Όξινο φωσφορικό οξύ)
- Της αμμωνίας:  
 $\text{NH}_4^+$  (αμμώνιο)  $\leftrightarrow$   $\text{H}^+$  +  $\text{NH}_3$  (αμμωνία)
- Των λευκωμάτων:  
 $\text{ΛΕΥΚΩΜΑ} \leftrightarrow \text{H}^+$  +  $\text{ΛΕΥΚΩΜΑ}^-$  (ανιόν λευκώματος)

Με το μηχανισμό αυτό λοιπόν, παραμένει σταθερό το pH του πλάσματος, ανεξάρτητα από την παραγωγή οξέων που προέρχονται από το μεταβολισμό των διαφόρων ουσιών

## Ηλεκτρολύτες και αέρια αίματος **κεφ.7**

του αίματος. Το πλάσμα αποτελεί ουσιαστικά ένα ρυθμιστικό διάλυμα (ή σύστημα), οπότε η είσοδος μικρής ποσότητας ισχυρού οξέος μετατρέπεται σε ασθενές οξύ ( $H_2CO_3$ ,  $H_2PO_4^-$ ,  $NH_4^+$ ) και δεν μεταβάλλεται το pH του.

Το πιο σημαντικό ρόλο παίζει το ρυθμιστικό σύστημα των διττανθρακικών.

**Η διατήρηση μιας αριθμητικής ισότητας ανάμεσα στα ανιόντα και τα κατιόντα του πλάσματος ονομάζεται οξεοβασική ισορροπία. Με άλλα λόγια οξεοβασική ισορροπία είναι η διατήρηση σταθερού pH.**

Η διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας οφείλεται:

- α) στους **πνεύμονες**, οι οποίοι συμβάλλουν με τις αναπνευστικές τους λειτουργίες και
- β) στους **νεφρούς**, οι οποίοι συμβάλλουν με τις απεκκριτικές τους λειτουργίες.



### ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Οι διαταραχές στην οξεοβασική ισορροπία ονομάζονται **οξέωση** (όταν υπερτερούν τα θετικά ιόντα) και **αλκάλωση** (όταν υπερτερούν τα αρνητικά ιόντα). Αυτές δε οι διαταραχές διακρίνονται σε **μεταβολικές** και **αναπνευστικές** ανάλογα την αιτία από την οποία προκλήθηκαν. Έτσι έχουμε τις παρακάτω διαταραχές της οξεοβασικής ισορροπίας:

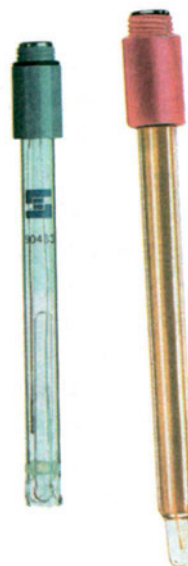
- Οξέωση μεταβολική (π.χ. στο διαβήτη)
- Οξέωση αναπνευστική (π.χ. στο άσθμα, στην πνευμονία)
- Αλκάλωση μεταβολική (π.χ. σε εμετούς)
- Αλκάλωση αναπνευστική (π.χ. σε αποβολή πολύ  $CO_2$  με την αναπνοή)

### ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Για να εκτιμήσουμε την πιθανή διαταραχή της οξεοβασικής ισορροπίας προσδιορίζουμε:

- τους ηλεκτρολύτες ορού ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cl^-$ ).
- το pH του πλάσματος.
- τα αέρια αίματος δηλ. τη μερική πίεση του οξυγόνου ( $O_2$ ) και του διοξειδίου του άνθρακα ( $CO_2$ ).
- τα διττανθρακικά.

7.5 Είδη ηλεκτροδίων για προσδιορισμό pH κ.λπ.

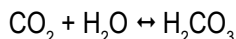


## 7.7 ΑΕΡΙΑ ΑΙΜΑΤΟΣ

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Το οξυγόνο ( $O_2$ ) και το διοξείδιο του άνθρακα ( $CO_2$ ) είναι τα δυο αέρια του αίματος που έχουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας.

Υπάρχουν στο αίμα ελεύθερα και ενωμένα. Το μεν  $O_2$  βρίσκεται ενωμένο με την αιμοσφαιρίνη. Το δε  $CO_2$  βρίσκεται ενωμένο με λευκώματα και με την αιμοσφαιρίνη. Το  $CO_2$  ενυδατώνεται σε ανθρακικό οξύ.



Στο εργαστήριο μετράμε τη μερική πίεση αυτών των δυο αερίων στο αίμα. Η μερική πίεση του  $O_2$  ( $pO_2$ ) και του  $CO_2$  ( $pCO_2$ ) είναι η πίεση που ασκείται από το διαλυμένο αέριο στο αίμα.

Η διατήρηση της  $pO_2$  σταθερής εξαρτάται από την ικανότητα των πνευμόνων να παρέχουν τόσο οξυγόνο στο αίμα, όσο αφαιρούν από αυτό τα κύτταρα για τις λειτουργίες τους.

Η διατήρηση της  $pCO_2$  σταθερής εξαρτάται από το ισοζύγιο μεταξύ του  $CO_2$  που παράγεται από το μεταβολισμό με αυτό που χάνεται από τον πνεύμονα.

### ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Η  $pO_2$  μειώνεται σε περιπτώσεις ελαττωμένης πρόσληψης του  $O_2$  από τους πνεύμονες, σε διάφορες πνευμονικές παθήσεις κ.ά.

Η  $pCO_2$  αυξάνει σε νόσους των πνευμόνων ή σε ανωμαλίες της αναπνοής, λόγω της ελαττωμένης αποβολής  $CO_2$ , σε παθήσεις των νεφρών, σε εμετούς κ.ά.

Μειώνεται δε σε πυρετούς, διαβητική οξέωση, μεγάλο υψόμετρο κ.ά.

**Αποτελέσματα** των διαταραχών αυτών των πιέσεων των αερίων του αίματος μπορεί να είναι ζάλη, πονοκέφαλος, παραισθήσεις, μυϊκοί σπασμοί, αγγειοδιαστολή, τρέμουλο κλπ.

### 7.7.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΑΕΡΙΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ

#### ΕΙΔΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Χρησιμοποιούμε κατά προτίμηση **αρτηριακό αίμα**.
- Το δείγμα μας είναι **ολικό** αίμα.

#### ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Η λήψη του αίματος γίνεται σε αναερόβιες συνθήκες για να αποφευχθεί η ανταλλαγή αερίων με τον ατμοσφαιρικό αέρα.

#### **Αναερόβιες συνθήκες εξασφαλίζονται:**

1. Όταν χρησιμοποιούμε ειδικά σωληνάρια με κενό αέρος (Vacutainer tube). Εναλλακτικά μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την κοινή σύριγγα.

2. Γεμίζουμε με αίμα το σωληνάριο ή τη σύριγγα.
3. Χρησιμοποιούμε αντιπηκτικό (ηπαρίνη) μέσα στο ειδικό σωληνάριο ή μέσα στη σύριγγα κατά τη λήψη του αίματος.
4. Ανακατεύουμε με απλές περιστροφικές κινήσεις στην παλάμη μας το ειδικό σωληνάριο ή τη σύριγγα, για να ανακατευτεί το αίμα με το αντιπηκτικό.
5. Το δείγμα πρέπει να έρχεται στο εργαστήριο αμέσως, αν η λήψη δεν γίνει στο εργαστήριο.
6. Δεν βγάζουμε το πώμα του ειδικού σωληναρίου αν η λήψη του αίματος γίνει σ' αυτό. Αν η λήψη γίνει με σύριγγα, δε βγάζουμε τη βελόνα και επανατοποθετούμε το προστατευτικό της κάλυμμα. Με αυτόν τον τρόπο μεταφέρεται το δείγμα στο εργαστήριο.
7. Μεταφέρουμε το δείγμα μέσα σε δοχείο με πάγο για να περιορισθεί ο ρυθμός του μεταβολισμού των έμμορφων συστατικών του αίματος.
8. Η εξέταση πρέπει να γίνει αμέσως. Το δείγμα διατηρείται στο ψυγείο όχι περισσότερο από μια ώρα.

### ΑΝΑΛΥΤΕΣ ΑΕΡΙΩΝ

Οι εξετάσεις για τον προσδιορισμό της μερικής πίεσης των αερίων του αίματος, γίνεται με **ειδικούς αναλυτές αερίων**, οι οποίοι έχουν επιλεκτικά ηλεκτρόδια συνδεδεμένοι με ηλεκτρονικό υπολογιστή στον οποίο καταγράφονται όλα τα στοιχεία του εξεταζόμενου και του προς εξέταση δείγματος. Εκεί εμφανίζονται και οι τιμές των ζητούμενων μερικών πιέσεων των αερίων και του pH του κάθε δείγματος.

Το δείγμα μεταφέρεται απευθείας από το ειδικό σωληνάριο ή τη σύριγγα στο ειδικό στόμιο του αναλυτή. Συνήθως χρειαζόμαστε λίγο όγκο αίματος (περίπου 0,2 mL).

Απαιτείται ο συνεχής έλεγχος (βαθμονόμηση) του οργάνου από το χειριστή του με ειδικά πρότυπα που προμηθευόμαστε από το εμπόριο.

Οι αναλυτές αερίων συνήθως βρίσκονται σε ειδικά εργαστήρια και όχι στο εργαστήριο της κλινικής χημείας (βιοχημικό).

### ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)

pO<sub>2</sub>: 75-100 mm Hg

pCO<sub>2</sub>: 35-45 mm Hg



7.6 Αναλυτής αερίων αίματος

## 7.8 ΑΣΒΕΣΤΙΟ - ΦΩΣΦΟΡΟΣ - ΜΑΓΝΗΣΙΟ

Ο λόγος που το ασβέστιο, ο φώσφορος και το μαγνήσιο παρουσιάζονται σε μια ενότητα, είναι ότι και τα τρία αυτά στοιχεία έχουν ένα σημαντικό ρόλο στο **μεταβολισμό των οστών**. Ο δε μεταβολισμός αυτών των στοιχείων ακολουθεί παράλληλους δρόμους.

## 7.9 ΑΣΒΕΣΤΙΟ

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

#### ΠΟΥ ΒΡΙΣΚΕΤΑΙ

Είναι το αφθονότερο μεταλλικό στοιχείο (εξωκυττάριο) του οργανισμού. Το σώμα ενός υγιούς ατόμου περιέχει περίπου 1 kg ασβεστίου. Το 99% αυτού βρίσκεται στα **οστά** των οποίων και αποτελεί δομικό συστατικό. Το ασβέστιο των οστών λειτουργεί και ως αποθήκη για τις ανάγκες του οργανισμού. Το υπόλοιπο βρίσκεται στο αίμα και στο εξωκυττάριο υγρό. Στο αίμα βρίσκεται με τρεις μορφές: ενωμένο με πρωτεΐνη (46%), ως σύμπλοκο με κιτρικό και φωσφορικό (7%) και περίπου το 47% ως ελεύθερο ιόν, το οποίο είναι και το βιολογικά δραστικό ασβέστιο.

Κυριότερη πηγή ασβεστίου για τον οργανισμό μας είναι το **γάλα** και τα προϊόντα του, όπως τυρί, γιαούρτι, ξυνόγαλα. Οι ημερήσιες ανάγκες του οργανισμού μας είναι περίπου 20 mg ανά kg βάρους σώματος και καλύπτονται με 2-3 ποτήρια γάλα. (Το γάλα περιέχει 800-900 mg ασβέστιο σε κάθε λίτρο). Από το ποσό του ασβεστίου που προσλαμβάνει ο οργανισμός μας, απορροφάται από το έντερο μόνο το 25-30 %, με τη βοήθεια της βιταμίνης D, ενώ το υπόλοιπο αποβάλλεται με τα κόπρανα.

#### ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

Το ασβέστιο επιτελεί κύρια τις παρακάτω λειτουργίες:

- α) ελέγχει τη μυϊκή συστολή,
- β) ελέγχει τη μετάδοση των νευρικών ώσεων,
- γ) ρυθμίζει τη διαβατότητα των κυτταρικών μεμβρανών,
- δ) ενισχύει τη δραστικότητα πολλών ενζύμων,
- ε) έχει σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό πήξης του αίματος.

#### ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΙΑ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ

Το ολικό ποσό του ασβεστίου στο αίμα διατηρείται σταθερό, χάρις στο μηχανισμό ομοιοστάσης (σταθερότητας) που ρυθμίζεται:



- α) από την ορμόνη παραθορμόνη (PTH), η οποία εκκρίνεται από τον παραθυρεοειδή αδένα,
- β) το υδροξυλιωμένο παράγωγο της βιταμίνης D που εκκρίνεται από τον νεφρό και
- γ) την ορμόνη καλσιτονίνη (CT), η οποία παράγεται από τα παραθυλακίωδη κύτταρα του θυρεοειδή αδένα.



## ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Α ύ ξ η σ η (υπερασβεσταιμία) έχουμε σε υπερθυρεοειδισμό, υπερπαραθυρεοειδισμό, υπερβιταμίνωση D, νόσους των οστών, νεοπλάσματα κλπ.

Ε λ ά τ τ ω σ η (υπασβεσταιμία) έχουμε σε υποπαραθυρεοειδισμό, ανεπάρκεια βιταμίνης D, νεφρική ανεπάρκεια, κύηση (τελευταίοι μήνες) κ.λπ.

### 7.9.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ ΣΤΟ ΑΙΜΑ (Χρωματομετρική Μέθοδος)

#### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το ασβέστιο εκτός από τον προσδιορισμό του με τα ιοντοεπιλεκτικά ηλεκτρόδια, μπορεί να προσδιορισθεί επίσης με: φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης αλλά και με τις χρωματομετρικές μεθόδους στο φωτόμετρο. Το ασβέστιο με το κυανού της μεθυλθυμόλης δίνουν μπλε χρώμα. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με το ποσό του ασβεστίου στον ορό ή το πλάσμα. Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται όλο το ασβέστιο του ορού και όχι μόνο αυτό το οποίο βρίσκεται με τη μορφή ιόντων.

#### ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- ▶ Σωληνάριο πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- ▶ Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληναρίων.
- ▶ Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- ▶ Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέττες.
- ▶ Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- ▶ Φωτόμετρο αυτόματο.
- ▶ Ανακινητής σωληναρίων (Vortex).
- ▶ Parafilm.
- ▶ Γάντια και υαλογράφος.
- ▶ 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό ασβεστίου.

#### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1) Μπλε μεθυλ-θυμόλης.
- 2) Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) pH 12.
- 3) Πρότυπο διάλυμα ασβεστίου 10 mg/dL.

Το αντιδραστήριο εργασίας παρασκευάζεται από την ανάμειξη του αντιδραστηρίου 1 και 2. Σε ορισμένα σετ το αντιδραστήριο εργασίας είναι ήδη έτοιμο.



7.7 Ανακινητής σωληναρίων

## ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Χρησιμοποιούμε **ορό** ή **πλάσμα** αίματος. Στη δεύτερη περίπτωση το αίμα θα πρέπει να ληφθεί με αντιπηκτικό που δεν έχει ασβέστιο ή δεν αντιδρά με αυτό. Γι' αυτό χρησιμοποιούμε ηπαρίνη. Τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν έως 8 ημέρες στο ψυγείο (στους 2 – 8 °C).

Στα **ούρα 24ώρου** προσθέτουμε μερικά mL διαλύματος HCl M/10 ή HNO<sub>3</sub> για την αποφυγή σχηματισμού αλάτων ασβεστίου. Επίσης αραιώνουμε το δείγμα ούρων κατά το 1/2 ή το 1/3 με απεσταγμένο νερό.

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:

	E	St	T
<b>Αντιδραστήριο 1+2</b>	2000 μL	2000 μL	2000 μL
<b>Πρότυπο διάλυμα</b>	-	20 μL	-
<b>Ορός ή πλάσμα</b>	20 μL	-	-

όπου: E=εξεταστέο  
St=standard  
T=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάρια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινήτη.
- Παραμονή για 1-3' στους 20-25 °C (θερμοκρασία δωματίου).
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέτες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 610 nm. Το χρώμα παραμένει σταθερό 1 ώρα.

*\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ*

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

$$C \text{ φωσφόρου ορού} = C_{st} \times \frac{A_{(E)}}{A_{(st)}}$$

## ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)

Στον ορό ή το πλάσμα: 8,8 – 10,2 mg/dL ή 2,2 – 2,6 mmol/L

Παιδιά στο στάδιο της ανάπτυξης 12 mg/dL.

Στα ούρα: 100 – 400 mg/24h ή 2,5 – 10 mmol/24h

**ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ** έως 16 mg/dL ή 4 mmol/L

## 7.10 ΦΩΣΦΟΡΟΣ

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Αποτελεί και αυτός μαζί με το ασβέστιο **βασικό συστατικό των οστών**. Σε αυτά βρίσκεται το μεγαλύτερο ποσό του φωσφόρου (περίπου 85%). Ο ενδοκυττάριος φώσφορος βρίσκεται μέσα σε οργανικές ενώσεις όπως φωσφολιπίδια και νουκλεϊνικά οξέα.

Συμμετέχει στα ενδιάμεσα προϊόντα του μεταβολισμού, σχηματίζοντας δεσμούς ενέρ-

γεια  $\text{ATP}$ ,  $\text{ADP}$ ,  $\text{AMP}$ . Συνδέεται με το μεταβολισμό του ασβεστίου και επηρεάζεται από τις ίδιες ορμόνες. Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι υπάρχει συνεχής αμφίδρομη ισορροπία ασβεστίου και φωσφόρου στον οργανισμό.

Ο φώσφορος του πλάσματος βρίσκεται κυρίως με τη μορφή των φωσφορικών ιόντων ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) ως ανόργανος, ενώ μικρές ποσότητές του είναι συνδεδεμένες με πρωτεΐνες.

Υπάρχει σε αφθονία στις περισσότερες τροφές. Απορροφάται από το έντερο και το μεγαλύτερο ποσό του αποβάλλεται κυρίως με τα ούρα. Ο δε μηχανισμός απορρόφησής του είναι παρόμοιος με του ασβεστίου.

### ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Αύξηση (**υπερφωσφοραιμία**) έχουμε σε υποπαραθυρεοειδισμό υπερβιταμίνωση D, νόσους των οστών, νεοπλασμάτα, νεφρική ανεπάρκεια κ.λπ.

Ελάττωση (**υποφωσφοραιμία**) έχουμε σε υπερπαραθυρεοειδισμό, ανεπάρκεια βιταμίνης D ή ανωμαλία στο μεταβολισμό της, μειωμένη απορρόφηση φωσφορικών ή ανεπαρκή πρόσληψή τους, σακχαρώδη διαβήτη κ.λπ.

### 7.10.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΩΣΦΟΡΟΥ ΣΤΟ ΑΙΜΑ (Χρωματομετρική Μέθοδος)

#### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο ανόργανος φώσφορος αντιδρά με άλας του μολυβδαινίου και θειικό οξύ και παράγεται ένα έγχρωμο σύμπλοκο. Η ένταση του χρώματος του συμπλόκου αυτού είναι ανάλογη με το ποσό του φωσφόρου στον ορό ή το πλάσμα.

#### ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- Σωληνάκια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληναρίων.
- Πιπέτες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέτες.
- Κυβέτες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- Φωτόμετρο αυτόματο.
- Ανακινητής σωληναρίων (Vortex).
- Parafilm.
- Γάντια και υαλογράφος.
- 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό φωσφόρου.



7.8 Φωτόμετρο αυτόματο

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1) Μολυβδαινικό αμμώνιο και θειϊκό οξύ. Το αντιδραστήριο είναι έτοιμο.
- 2) Πρότυπο διάλυμα φωσφόρου 5 mg/dL ή 1,6 mmol/L.

## ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Χρησιμοποιούμε **ορό** ή **πλάσμα** αίματος το οποίο έχει ληφθεί με αντιπηκτικό ηπαρίνη. Ο διαχωρισμός τους από το αίμα πρέπει να γίνεται αμέσως και ν' αποφεύγεται η αιμόλυση, γιατί τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν 7 φορές περισσότερο φώσφορο από το πλάσμα και τον ορό. Τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν έως 8 ημέρες στο ψυγείο (στους 2 – 8 °C).

Στα **ούρα 24ώρου** προσθέτουμε μερικά mL διαλύματος HCl για την αποφυγή σχηματισμού αλάτων φωσφόρου. Επίσης αραιώνουμε το δείγμα ούρων 1/10 με απεσταγμένο νερό.

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:

	<b>E</b>	<b>St</b>	<b>T</b>
<b>Αντιδραστήριο 1</b>	2000 μL	2000 μL	2000 μL
<b>Πρότυπο διάλυμα</b>	-	20 μL	-
<b>Ορός ή πλάσμα</b>	20 μL	-	-

όπου: E=εξεταστέο  
St=standard  
T=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάρια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινήτη.
- Παραμονή για 5´ στους 20-25 °C (θερμοκρασία δωματίου).
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέττες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 340 nm. Το χρώμα παραμένει σταθερό 1 ώρα.

*\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σει*

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

$$C \text{ φωσφόρου ορού} = C_{st} \times \frac{A_{(E)}}{A_{(st)}}$$

## ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)

Στον ορό ή το πλάσμα: 2,4 – 4,8 mg/dL ή 0,8 – 1,6 mmol/L

Στα ούρα: 250 – 1300 mg/24h ή 80,7 – 420 mmol/24h

**ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ** έως 20 mg/dL ή 6,46 mmol/L

## ΣΗΜΕΙΩΣΗ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ

Όταν ο ορός ή το πλάσμα είναι λιπαιμικό (δηλ. θολό από μεγάλη ποσότητα λιπιδίων), τότε χρησιμοποιούμε και τυφλό σωληνάριο για το δείγμα (τυφλό εξεταστέου – ΤΕ). Αφού το φωτομετρήσουμε αφαιρούμε την τιμή απορρόφησης του από την τιμή του εξεταστέου:  
 $A_{(T)} - A_{(TE)}$

## 7.11 ΜΑΓΝΗΣΙΟ

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

#### ΠΟΥ ΒΡΙΣΚΕΤΑΙ

Στο σώμα ενός υγιούς ανθρώπου υπάρχουν περίπου 360 mg μαγνησίου ανά kg σωματικού βάρους. Το 60% από αυτό βρίσκεται στα **οστά** μαζί με το ασβέστιο και 20% στους **μυς**. Πολύ μαγνήσιο υπάρχει και στο **ήπαρ**.

Το μαγνήσιο είναι κυρίως ενδοκυτταρικό ιόν, το δεύτερο σε ποσότητα μετά το κάλιο. Ελάχιστη ποσότητά του (περίπου 1%) βρίσκεται στο εξωκυτταρίο υγρό. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν τριπλάσια ποσότητα μαγνησίου από το πλάσμα. Στο πλάσμα ένα ποσοστό του είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνες. Το υπόλοιπο απαντάται με τη μορφή ελεύθερων ιόντων.

#### ΔΡΑΣΗ

Το μαγνήσιο επιδρά στη νευρομυϊκή διεγερσιμότητα, δραστηριοποιεί πολλά βασικά ένζυμα και συμμετέχει στο μεταβολισμό των ουσιών. Η συγκέντρωσή του στο πλάσμα ρυθμίζεται από τις ορμόνες αλδοστερόνη και παραθορμόνη. Απορροφάται από το έντερο και αποβάλλεται από τα ούρα και τα κόπρανα.

### ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

**Αύξηση (υπερμαγνησαιμία)** έχουμε σε νεφρική ανεπάρκεια, υποθυρεοειδισμό, νόσο Addison κ.λπ. Σπάνια έχουμε σημαντική αύξηση μαγνησίου.

**Ελάττωση (υπομαγνησαιμία)** έχουμε σε νόσους του γαστρεντερικού (δυσαπορρόφηση από το έντερο, παρατεταμένη διάρροια κ.ά.), αλκοολισμό, κίρρωση ήπατος κ.λπ.

#### 7.11.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΑΓΝΗΣΙΟΥ ΣΤΟ ΑΙΜΑ

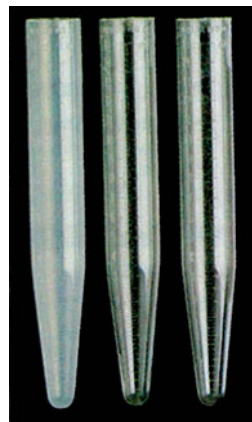
(Χρωματομετρική Μέθοδος)

#### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Μέσα σε αλκαλικό περιβάλλον, τα ιόντα μαγνησίου αντιδρούν με μια ειδική ουσία (xylydyl blue) ή το δείκτη καλμαγίτη και παράγεται ένα έγχρωμο σύμπλοκο. Η ένταση του χρώματος του συμπλόκου αυτού είναι ανάλογη με το ποσό του μαγνησίου στον ορό ή το πλάσμα.

## ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- ▶ Σωληνάρια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα.
- ▶ Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληναρίων.
- ▶ Πιπέττες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- ▶ Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέττες.
- ▶ Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- ▶ Φωτόμετρο αυτόματο.
- ▶ Ανακινήτης σωληναρίων (Vortex).
- ▶ Γάντια και υαλογράφος.
- ▶ Parafilm.
- ▶ 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό μαγνησίου.



7.9 Είδη κωνικών σωληναρίων

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1 Buffer pH 12, xylydyl blue ή καλμαγίτη, EDTA. Το αντιδραστήριο είναι έτοιμο. Σε ορισμένα σετ τα διάφορα αντιδραστήρια είναι σε χωριστά διαλύματα. Τότε το αντιδραστήριο εργασίας παρασκευάζεται με την ανάμιξή τους σύμφωνα με τις οδηγίες του σετ.
- 2) Πρότυπο διάλυμα μαγνησίου 4 mg/dL ή 1,6 mmol/L.

## ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Χρησιμοποιούμε **ορό** ή **πλάσμα** αίματος το οποίο έχει ληφθεί με αντιπηκτικό ηπαρίνη. Ο διαχωρισμός τους από το αίμα πρέπει να γίνεται αμέσως και ν' αποφεύγεται η αιμόλυση, γιατί τα ερυθρά αιθμοσφαίρια έχουν 3 φορές περισσότερο μαγνήσιο από το πλάσμα και τον ορό. Τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν έως 7 ημέρες στους 15-25 °C.

Στα **ούρα 24ώρου** προσθέτουμε μερικά mL διαλύματος HCl για την αποφυγή σχηματισμού αλάτων μαγνησίου. Επίσης αραιώνουμε το δείγμα ούρων 1/10 με απεσταγμένο νερό.

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:

	E	St	T
<b>Αντιδραστήριο 1</b>	2000 µL	2000 µL	2000 µL
<b>Πρότυπο διάλυμα</b>	-	20 µL	-
<b>Ορός ή πλάσμα</b>	20 µL	-	-

όπου: E=εξεταστέο  
St=standard  
T=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάρια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινήτη.
- Παραμονή για 5' στους 20-25 °C (θερμοκρασία δωματίου).

## Ηλεκτρολύτες και αέρια αίματος **κεφ.7**

- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέτες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 510-520 nm. Το χρώμα παραμένει σταθερό 1 ώρα.  
\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

$$C \text{ μαγνησίου ορού} = C_{st} \times \frac{A_{(E)}}{A_{(st)}}$$

### ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ )

Στον ορό ή το πλάσμα: 1,6 – 2,5 mg/dL ή 0,65 – 1,0 mmol/L

Στα ούρα: 50 – 150 mg/24h ή 2,0 – 6,2 mmol/24h

**ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ** έως 5 mg/dL ή 2,05 mmol/L

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

#### ΝΑ ΜΗΝ ΞΕΧΝΩ

- ➔ Μέσα στο πλάσμα του αίματος βρίσκονται διαλυμένοι **ηλεκτρολύτες**, (ως ιόντα) όπως κάλιο ( $K^+$ ), νάτριο ( $Na^+$ ), χλώριο ( $Cl^-$ ), ασβέστιο ( $Ca^{2+}$ ), μαγνήσιο ( $Mg^{2+}$ ), φώσφορος ( $PO_4^{3-}$ ) κ.α.
- ➔ Μονάδες μέτρησης είναι: mEq/L ή mmol/L.
- ➔ Κύρια **αποστολή**  $Na^+ - K^+$  και  $Cl^-$  είναι η διατήρηση σταθερής της οσμωτικής πίεσης ανάμεσα σε εξωκυττάριο και ενδοκυττάριο υγρό καθώς και της οξεοβασικής ισορροπίας του πλάσματος.
- ➔ Μέθοδος επιλογής στο εργαστήριο είναι ο προσδιορισμός τους με **ιοντοεπιλεκτικά ηλεκτρόδια**.
- ➔ Το **pH** του πλάσματος είναι μεταξύ 7,35-7,42. Παραμένει σταθερό χάρις στο μηχανισμό των ρυθμιστικών συστημάτων του, με σπουδαιότερο τα διττανθρακικά.
- ➔ **Οξεοβασική ισορροπία** είναι η διατήρηση σταθερού pH.
- ➔ Τα **αέρια** του αίματος είναι το  $O_2$  και το  $CO_2$ . Σε ειδικούς αναλυτές μετράμε τη μερική πίεσή τους.
- ➔ Το **ασβέστιο**, ο φώσφορος και το μαγνήσιο παίζουν σημαντικό ρόλο στο **μεταβολισμό των οστών**. Βρίσκονται σ'αυτά κατά 99%, 85% και 60% αντίστοιχα. Οι προσδιορισμοί τους στον ορό ή το πλάσμα, γίνονται και με φωτομετρικές μεθόδους.



**ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ****ΘΕΩΡΙΑ**

1. Ποιοι είναι οι ηλεκτρολύτες;
2. Ποιες μονάδες χρησιμοποιούμε για τον προσδιορισμό των ηλεκτρολυτών και γιατί;
3. Ποια η κύρια αποστολή του  $\text{Na}^+$  και του  $\text{K}^+$  στον οργανισμό; Αναφέρετε περιπτώσεις αύξησής τους.
4. Με ποιο μηχανισμό ρυθμίζεται η οξεοβασική ισορροπία του πλάσματος;
5. Πού βρίσκεται και τι λειτουργίες επιτελεί το ασβέστιο;
6. Με ποιο μηχανισμό διατηρείται σταθερό το ποσό του ασβεστίου στο αίμα;
7. Σε ποιες περιπτώσεις έχουμε αυξομειώσεις του ποσού του φωσφόρου στο αίμα;
8. Ποια η δράση του μαγνησίου;

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

1. Ποια η αρχή λειτουργίας των αναλυτών ιόντων με ιοντοεπιλεκτικά ηλεκτρόδια;
2. Πώς εξασφαλίζονται οι ανερόβιες συνθήκες λήψης αίματος στους προσδιορισμούς αερίων;
3. Τι ενέργειες κάνουμε στο εργαστήριο όταν στον προσδιορισμό φωσφόρου στον ορό, το δείγμα είναι λιπαιμικό;
4. Τι προετοιμασία κάνουμε στο δείγμα ούρων για τον προσδιορισμό ηλεκτρολυτών;
5. Ποια η αρχή μεθόδου φωτομετρικού προσδιορισμού του ασβεστίου;
6. Ποια η αρχή μεθόδου φωτομετρικού προσδιορισμού του φωσφόρου;
7. Ποια η αρχή μεθόδου φωτομετρικού προσδιορισμού του μαγνησίου;



## 8.1 ΣΙΔΗΡΟΣ

### 8.1.1. ΠΟΣΟ ΣΙΔΗΡΟΥ – ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Ο σίδηρος (Fe) είναι ένα πολύ **σημαντικό στοιχείο** (μέταλλο) που βρίσκεται σε αφθονία στον ανθρώπινο οργανισμό. Είναι απαραίτητο στοιχείο γιατί συμμετέχει σε πολλές ζωτικές λειτουργίες του οργανισμού μας.

Φυσιολογικά στο σώμα ενός ενήλικα ανθρώπου υπάρχουν περίπου **4 g** σιδήρου. Τα 2,5 g περίπου από αυτά βρίσκονται ενωμένα με την αίμη μέσα στην αιμοσφαιρίνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Το υπόλοιπο ποσό βρίσκεται αποθηκευμένο στις λεγόμενες **«αποθήκες σιδήρου»**. Ως «αποθήκες σιδήρου» λειτουργούν ο μυελός των οστών, το ήπαρ, ο σπλήνας, διάφορα κυτταρικά ένζυμα.

Τέλος στο πλάσμα βρίσκεται ένα πολύ μικρό ποσό, περίπου 3-7 mg ή ποσοστό 0,1 - 0,2 %.

ΠΙΝΑΚΑΣ: ΚΑΤΑΝΟΜΗ Fe ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΝΗΛΙΚΑ ΑΝΔΡΑ 75Kg

ΕΙΔΟΣ ΕΝΩΣΗΣ	ΠΡΩΤΕΪΝΗ	ΠΟΣΟ Fe σε mg	% Fe	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ	2600	65	Μεταφορά O <sub>2</sub> στους ιστούς
	ΜΥΟΣΦΑΙΡΙΝΗ	130	6	Αποθήκευση O <sub>2</sub> στους ιστούς
	ΚΑΤΑΛΑΣΗ	4	0,1	Μεταβολισμός H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	ΚΥΤΤΑΡΟΧΡΩΜΑ	4	0,1	Τελική οξείδωση
	ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ	20	0,5	Μεταβολισμός H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
ΜΕΤΑΦΟΡΙΚΗ ΕΝΩΣΗ	ΤΡΑΝΣΦΕΡΡΙΝΗ	7	0,2	Μεταφορά Fe στο πλάσμα
ΑΠΟΘΕΜΑΤΙΚΟΣ ΣΙΔΗΡΟΣ	ΦΕΡΡΙΤΙΝΗ	520	13	Αποθήκη Fe στα κύτταρα
	ΑΙΜΟΣΙΔΗΡΙΝΗ	480	12	Αποθήκη Fe στα κύτταρα

(Από το βιβλίο ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ των Ν.Ι.ΒΟΡΓΙΑ και Ν.Π.ΛΑΟΥΤΑΡΗ, Αθήνα 1990-91)

### 8.1.2. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Ο σίδηρος στη φύση συναντάται με την ιοντική του μορφή ως σίδηρος (III) - (Fe<sup>3+</sup>). Για να απορροφηθεί όμως από τον ανθρώπινο οργανισμό, πρέπει να αναχθεί και να μετατραπεί σε σίδηρο (II) - (Fe<sup>2+</sup>).

Η ενσωμάτωση λοιπόν του σιδήρου στον οργανισμό είναι αρκετά δύσκολη υπόθεση και γι' αυτό ο οργανισμός μας δεν διαθέτει μια σημαντική οδό αποβολής του. Πρακτικά, σε

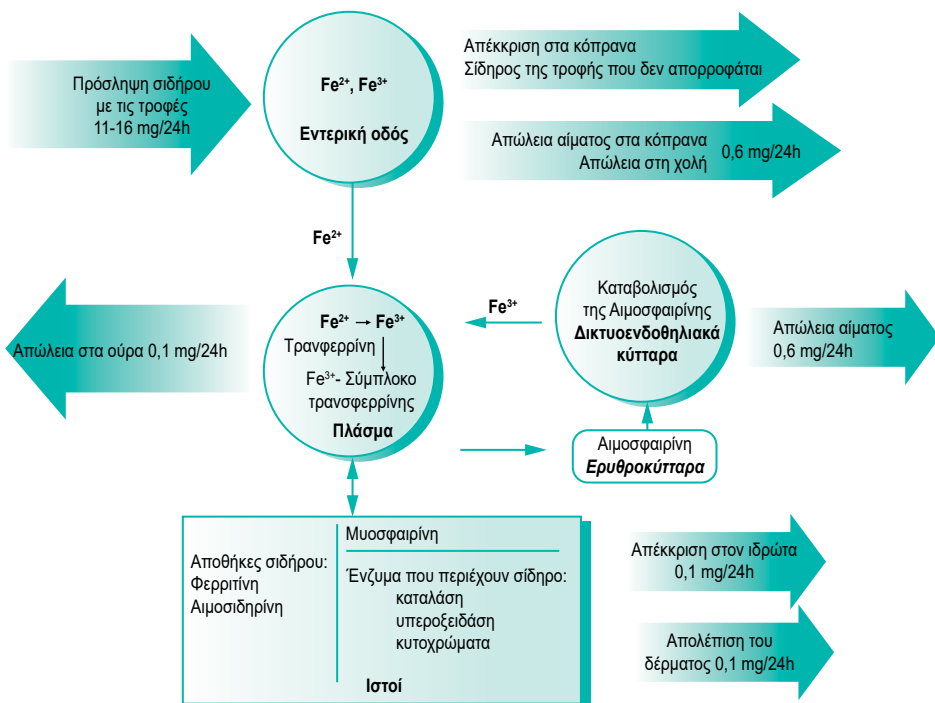
## Ειδικές εξετάσεις **κεφ.8**

φυσιολογικές περιπτώσεις, ελάχιστο ποσό σιδήρου αποβάλλεται με τα ούρα, τα κόπρανα και τον ιδρώτα.

Η ρύθμιση του σταθερού ποσού του σιδήρου στον οργανισμό (η ομοιοστασία του δηλαδή), **ρυθμίζεται κύρια από την απορρόφησή του** και όχι με την απέκκρισή του. Δηλ. ανεξάρτητα από το πόσο σίδηρο προσλαμβάνει ο οργανισμός μας με τις τροφές, απορροφάται από το έντερο τόσος σίδηρος όσος είναι απαραίτητος για τις ανάγκες του.

Ένα ελάχιστο λοιπόν ποσό του σιδήρου των τροφών απορροφάται από το λεπτό έντερο. Ο μηχανισμός απορρόφησης του σιδήρου ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Το μεγαλύτερο μέρος του σιδήρου που απορροφάται, συνδέεται στο πλάσμα με μια πρωτεΐνη, την αποτρανσφερρίνη και παράγεται η **τρανσφερρίνη ή σιδηροφυλλίνη**, η οποία είναι η πρωτεΐνη μεταφοράς του σιδήρου.

Στο κύτταρο ο σίδηρος συνδέεται με την πρωτεΐνη αποφερριτίνη και σχηματίζει τη **φερριτίνη**, η οποία είναι πρωτεΐνη εναποθήκευσης του σιδήρου.



8.1 Διαγραμματική παράσταση του μεταβολισμού του σιδήρου

Ο σίδηρος μέσω της τρανσφερρίνης μεταφέρεται:

A) Στις αποθήκες σιδήρου του οργανισμού και μεταπίπτει σε φερριτίνη ή σε αιμοσιδηρίνη.

Η φερριτίνη και η αιμοσιδηρίνη λοιπόν είναι οι δυο ουσίες υπο τη μορφή των οποίων

αποθηκεύεται ο σίδηρος στον οργανισμό.

- Β) Στο μυελό των οστών, όπου χρησιμοποιείται για τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων.
- Γ) Στα κύτταρα, για να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση ενζύμων (καταλάση, υπεροξειδάση κ.λπ.). Άρα το μεγαλύτερο μέρος των αναγκών του οργανισμού σε σίδηρο καλύπτεται με μια συνεχή ανακύκλωση του υπάρχοντος σιδήρου. Αυτή η ανακύκλωση εξυπηρετείται με τον ειδικό τρόπο μεταφοράς και εναποθήκευσής του.

### 8.1.3. ΤΡΟΦΕΣ ΚΑΙ ΣΙΔΗΡΟΣ

Τροφές **πλούσιες** σε σίδηρο είναι: το συκώτι και τα άλλα εντόσθια, τα όσπρια, τα θαλασσινά, τα αυγά κ.ά.

Λιγότερο πλούσιες πηγές σιδήρου αποτελούν: τα πουλερικά, τα ψάρια, τα πράσινα λαχανικά, το κρέας (οι μύς), τα αμύγδαλα και τα καρύδια.

Τροφές **πτωχές** σε σίδηρο είναι το γάλα και τα προϊόντα του, το άσπρο αλεύρι, οι πατάτες και τα περισσότερα νωπά φρούτα κ.α.

Επίσης ανάλογα με το είδος της τροφής έχουμε διαφορετική απορρόφηση του σιδήρου που περιέχεται σε αυτές, (π.χ. ο σίδηρος που βρίσκεται στο κρέας απορροφάται καλύτερα από το σίδηρο των λαχανικών).

### 8.1.4. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Το μεγαλύτερο ποσό του σιδήρου βρίσκεται κυρίως στην αιμοσφαιρίνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων και κατά δεύτερο λόγο στη μυοσφαιρίνη των μυϊκών κυττάρων.

Ο σίδηρος είναι απαραίτητος στον οργανισμό ως συστατικό της αιμοσφαιρίνης για τη μεταφορά του οξυγόνου στους ιστούς και ως συστατικό της μυοσφαιρίνης για τη μεταφορά και αποθήκευση οξυγόνου στα μυϊκά κύτταρα.

Τα επίπεδά του στο πλάσμα επηρεάζονται πολύ από διάφορους παράγοντες, φυσιολογικούς και παθολογικούς. Όμως η συνολική ποσότητά του στο σώμα παραμένει σταθερή. Συνήθως έχουμε διαφοροποίηση στην κατανομή του, μεταξύ των «αποθηκών σιδήρου» και του πλάσματος.

Η ανεπάρκεια σιδήρου οδηγεί σε ανεπαρκή σύνθεση αίμης, άρα και αιμοσφαιρίνης και στη λεγόμενη **σιδηροπενική αναιμία**. Η ανεπάρκειά του μπορεί να οφείλεται σε:

- α) Ανεπαρκή πρόσληψή του από τις τροφές.
- β) Μειωμένη απορρόφησή του από το έντερο.
- γ) Σε αυξημένη αιμορραγία.

Ο σίδηρος του ορού μπορεί να μειωθεί σε φυσιολογικές περιπτώσεις όπως η εγκυμοσύνη και η γαλουχία, όπου υπάρχουν αυξημένες ανάγκες σιδήρου στον οργανισμό, καθώς επίσης

και στη διάρκεια της εμμήνου ρύσεως λόγω αυξημένων απωλειών του με την αιμορραγία.

Ο σίδηρος του ορού μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ημέρας. Είναι υψηλότερος το πρωί και χαμηλότερος το απόγευμα. Μεταβάλλεται συχνά από μέρα σε μέρα, επηρεαζόμενος από το ψυχικό και σωματικό άγχος (stress).

## **8.1.5. ΣΙΔΗΡΟΣΥΝΔΕΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΟΡΟΥ (Τ.Ι.Β.Σ.)**

Όπως αναφέραμε παραπάνω, ο σίδηρος στον ορό του αίματος μεταφέρεται με μια πρωτεΐνη, την τρανσφερρίνη. Το 1/3 της τρανσφερρίνης του ορού δεσμεύεται πλήρως με σίδηρο. Τα υπόλοιπα 2/3 της πρωτεΐνης αυτής δεν είναι δεσμευμένα. Είναι ελεύθερα και μπορούν να δεσμευτούν από επιπλέον σίδηρο. Αυτή η **ικανότητα του ορού ονομάζεται ολική σιδηροσυνδετική ή σιδηροδεσμευτική ικανότητά του (Τ.Ι.Β.Σ. = Total Iron-Binding Capacity).**

Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσό της ελεύθερης τρανσφερρίνης τόσο μεγαλύτερη και η Τ.Ι.Β.Σ. Έτσι η Τ.Ι.Β.Σ. είναι ένα μέτρο του ποσού της τρανσφερρίνης που είναι διαθέσιμο στο αίμα να συνδεθεί με σίδηρο και να τον μεταφέρει σε όλο το σώμα.

## **ΚΟΡΕΣΜΟΣ %**

Ο κορεσμός % εκφράζει τη σχέση ή την αναλογία μεταξύ του ποσού του σιδήρου που υπάρχει στην πραγματικότητα στον ορό και του ποσού της τρανσφερρίνης που είναι διαθέσιμη για να δεσμεύσει σίδηρο. Ο κορεσμός υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{ΚΟΡΕΣΜΟΣ \%} = \frac{\text{Fe ορού}}{\text{T.I.B.C.}} \times 100$$

## **8.1.6. ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ**

**Αύξηση** του σιδήρου στον ορό έχουμε στις παρακάτω περιπτώσεις:

- α) Σε αιμοχρωμάτωση από αυξημένη απορρόφησή του.
- β) Σε λήψη υπερβολικής ποσότητάς του για θεραπεία.
- γ) Στις οξείες αιμολυτικές νόσους, με μεγάλη καταστροφή ερυθρών αιμοσφαιρίων.
- δ) Σε οξεία ηπατίτιδα.
- ε) Στην αιμοσιδήρωση από συχνές μεταγγίσεις αίματος.

**Ελάττωση** του σιδήρου στον ορό έχουμε στις παρακάτω περιπτώσεις:

- α) Σε σιδηροπενική αναιμία.
- β) Σε χρόνια αιμολυτική αναιμία.
- γ) Σε μειωμένη απορρόφησή του.
- δ) Στη ρευματοειδή αρθρίτιδα.
- ε) Σε καρκίνο.
- στ) Σε χρόνιες λοιμώξεις.

## 8.1.7 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ (Χρωματομετρική Μέθοδος)

Για τον προσδιορισμό του σιδήρου στον ορό αίματος, χρησιμοποιούνται διάφορες αντιδράσεις, που παράγουν χρωματιστές ενώσεις. Για το σκοπό αυτό υπάρχουν ως αντιδραστήρια στα διάφορα σετ χρωμογόνα όπως η CAP (κετυλ-τριμεθυλ-αμμωνιακό βρώμιο), η TPTZ, η μπαθοφενανθρολίνη κ.ά.

### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο σίδηρος του ορού αφού αποδεσμευτεί από την τρανσφερίνη, αντιδρά με το χρωμογόνο αντιδραστήριο παράγοντας ένα χρωματιστό σύμπλοκο. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με το ποσό του σιδήρου στον ορό ή το πλάσμα.

### ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- ▶ Σωληνάρια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα (ελεύθερα σιδήρου).
- ▶ Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληναρίων.
- ▶ Πιπέτες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- ▶ Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέτες.
- ▶ Κυβέττες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- ▶ Φωτόμετρο αυτόματο.
- ▶ Ανακινητής σωληναρίων (Vortex).
- ▶ Γάντια και υαλογράφος.
- ▶ Parafilm.
- ▶ 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό σιδήρου.

### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1) Χρωμογόνο, ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) με pH 4,7
  - 2) Πρότυπο διάλυμα σιδήρου 100 mg/dL.
- Το αντιδραστήριο εργασίας είναι έτοιμο για χρήση.  
Σε ορισμένα σετ υπάρχουν περισσότερα αντιδραστήρια.

### ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Χρησιμοποιούμε **ορό** ή **πλάσμα** αίματος. Στη δεύτερη περίπτωση το αίμα θα πρέπει να ληφθεί ηπαρίνη ως αντιπηκτικό.

Πρέπει οπωσδήποτε να αποφεύγουμε ακόμα και την παραμικρή **αιμόλυση**, γιατί τα ερυθρά όπως γνωρίζουμε



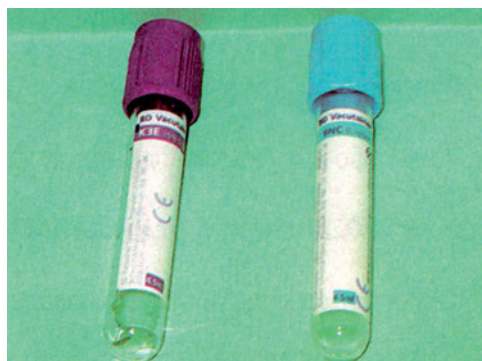
8.2 Ανακινητής σωληναρίων



## Ειδικές εξετάσεις **κεφ.8**

έχουν πολλαπλάσια ποσότητα σιδήρου. Για να αποφύγουμε την αιμόλυση, είναι προτιμότερο η λήψη αίματος να γίνεται χωρίς τη παρεμβολή της σύριγγας, δηλαδή από τη βελόνα απευθείας στο κατάλληλο σωληνάριο. Κατάλληλα για αυτό είναι τα ειδικά σωληνάρια με κενό αέρος (**Vacutainer tube**) που τοποθετούνται απευθείας στη βελόνα.

Τα δείγματα φυλάσσονται στο ψυγείο μέχρι την έναρξη της εξέτασης.



**8.3** Ειδικά σωληνάρια με κενό αέρος. (Το χρώμα του πώματος χαρακτηρίζει το είδος και την ποσότητα του αντιπηκτικού που περιέχει το σωληνάριο).

### ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια\*:

	<b>E</b>	<b>St</b>	<b>T</b>
<b>Αντιδραστήριο 1</b>	2000 $\mu\text{L}$	2000 $\mu\text{L}$	2000 $\mu\text{L}$
<b>Πρότυπο διάλυμα</b>	-	10 $\mu\text{L}$	-
<b>Ορός ή πλάσμα</b>	20 $\mu\text{L}$	-	-

όπου: E=εξεταστέο  
St=standard  
T=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάρια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινήτη.
- Παραμονή για 15' στους 20-25 °C (θερμοκρασία δωματίου).
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέτες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 620 nm. Το χρώμα παραμένει σταθερό 1 ώρα.

*\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ*

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

$$C \text{ σιδήρου ορού} = C_{(st)} \times \frac{A_{(E)}}{A_{(ST)}}$$

### ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ )

Στον ορό ή το πλάσμα: Άνδρες 59 – 148  $\mu\text{g/dL}$

Γυναίκες 37 – 145  $\mu\text{g/dL}$

**ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ** έως 500mg/dL

### ΕΙΔΙΚΕΣ ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

- Να μην αγγίζουμε με τα χέρια μας τα ρύγχη.
- Να χρησιμοποιούμε οπωσδήποτε parafilm για την ανάδευση των σωληναρίων.

- Να χρησιμοποιούμε πλαστικά σωληνάρια μιας χρήσης. Εάν χρησιμοποιήσουμε σωληνάρια γυάλινα να είναι ελεύθερα σιδήρου. Για το λόγο αυτό τα πλένουμε με ειδικά αντιδραστήρια (π.χ. χρωμοθειικό ή νιτρικό οξύ 10%). Ορισμένα σετ διαθέτουν διάλυμα αποσιδήρωσης.
- Το πλύσιμο των γυάλινων σωληναρίων να γίνεται με δισαπτεσταγμένο νερό.

## 8.1.8 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΙΔΗΡΟΣΥΝΔΕΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΟΡΟΥ (ΤΙΒC)

Ο προσδιορισμός της ΤΙΒC γίνεται παράλληλα με τον προσδιορισμό του σιδήρου στον ορό.

### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

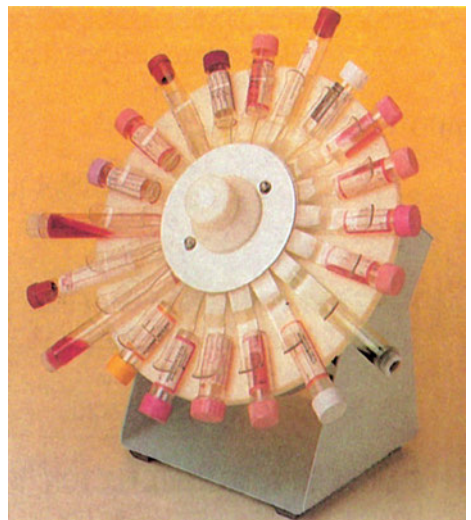
Στον ορό προσθέτουμε μια γνωστή ποσότητα διαλύματος σιδήρου. Η ελεύθερη τρανσφερρίνη του ορού θα κορεσθεί με αυτόν το σίδηρο. Το περίσσειμα του σιδήρου απορροφάται από ένα ειδικό αντιδραστήριο οξειδίου του αλουμινίου. Προσδιορίζουμε τότε την ΤΙΒC, προσδιορίζοντας όλο το δεσμευμένο σίδηρο στην τρανσφερρίνη, με τη μέθοδο προσδιορισμού σιδήρου που ήδη περιγράψαμε παραπάνω.

### ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

- Σωληνάρια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα επιμελώς πλυμένα (ελεύθερα σιδήρου).
- Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληναρίων.
- Πιπέτες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέτες.
- Κυβέτες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- Φωτόμετρο αυτόματο.
- Περιστροφικός ανακινητής για σωληνάρια (rotaror).
- Ανακινητής σωληναρίων (Vortex).
- Parafilm.
- Γάντια και υαλογράφος.
- 1 σετ (kit) για τον προσδιορισμό ΤΙΒC.

### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1) Διάλυμα σιδήρου (III) - ( $\text{Fe}^{3+}$ ).
- 2) Οξείδιο του αλουμινίου ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) σε σκόνη.



8.4 Περιστροφικός ανακινητής σωληναρίων

3) Χρωμογόνο, ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) με pH 4,7

4) Πρότυπο διάλυμα σιδήρου 100 mg/dL.

Τα αντιδραστήρια εργασίας είναι έτοιμα για χρήση.

## ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Χρησιμοποιούμε **ορό** ή **πλάσμα** αίματος. Στη δεύτερη περίπτωση το αίμα θα πρέπει να ληφθεί με ηπαρίνη ως αντιπηκτικό. Πρέπει οπωσδήποτε να αποφεύγουμε ακόμα και την παραμικρή **αιμόλυση**, (ισχύουν οι ίδιες παρατηρήσεις με το σίδηρο). Τα δείγματα φυλάσσονται στο ψυγείο (4 °C) μέχρι 7 ημέρες.

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

### 1η Φάση: κορεσμός τρανφερρίνης

Σε κωνικό σωληνάριο βάζουμε με πιπέττα\*:

Αντιδραστήριο 1	1000 mL
Ορός	500 L

- Σκεπάζουμε το σωληνάριο με parafilm και το ανακινούμε καλά στον ειδικό ανακινητή.
- Παραμονή 3-4' στους 20-25 °C (θερμοκρασία δωματίου).
- Προσθέτουμε 0,4 g οξειδίου του αλουμινίου (αντιδραστήριο 2).
- Κλείνουμε καλά το σωληνάριο.
- Τοποθετούμε το σωληνάριο σε περιστροφικό ανακινητή (rotaror) για 10'.
- Φυγοκεντρούμε το σωληνάριο για 1' στις 5.000 στροφές ανά λεπτό.
- Με πιπέττα αναρροφούμε προσεκτικά το υπερκείμενο που έχει σχηματισθεί και το τοποθετούμε σε ένα καθαρό σωληνάριο. Προσοχή να μην ανακινηθεί το περιεχόμενο του σωληναρίου και ανακατευθεί το ίζημα με το υπερκείμενο. Σ'αυτή την περίπτωση πρέπει να επαναλάβουμε τη φυγοκέντρηση.

### 2η Φάση: προσδιορισμός σιδήρου.

- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάκια\*:

	E	St	T
<b>Αντιδραστήριο 3</b>	2000 μL	2000 μL	2000 μL
<b>Πρότυπο διάλυμα</b>	-	10 μL	-
<b>Ορός ή πλάσμα</b>	10 μL	-	-

όπου: E=εξεταστέο  
St=standard  
T=τυφλό

- Σκεπάζουμε τα σωληνάκια με parafilm και τα ανακινούμε με τον ειδικό ανακινητή.
- Παραμονή για 15' στους 20-25 °C (θερμοκρασία δωματίου).
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέττες.

– Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 620 nm. Το χρώμα παραμένει σταθερό 1 ώρα.

\*Οι ποσότητες μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το σετ

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

$$C \text{ σιδήρου ορού} = C_{(st)} \times \frac{A_{(E)}}{A_{(ST)}}$$

Υπολογίζουμε την TIBC πολλαπλασιάζοντας το αποτέλεσμα της συγκέντρωσης του σιδήρου με το συντελεστή 3.

$$TIBC = C \text{ σιδήρου ορού} \times 3$$

Σημ. :ο σίδηρος εδώ ταυτίζεται με την ολική συνδετική ικανότητα του ορού, αφού έχει κορεσθεί η τρανσφερίνη με αυτόν. Ο πολλαπλασιασμός με το συντελεστή 3 γίνεται, γιατί ο προσδιορισμός δεν έγινε απευθείας στον ορό, αλλά στο υπερκείμενο, στο οποίο ο ορός αραιώθηκε. (0,5 mL ορός και 1 mL διάλυμα 1, ήτοι σύνολο 1,5 mL. Έτσι η αναλογία είναι 0,5/1,5 = 1/3).

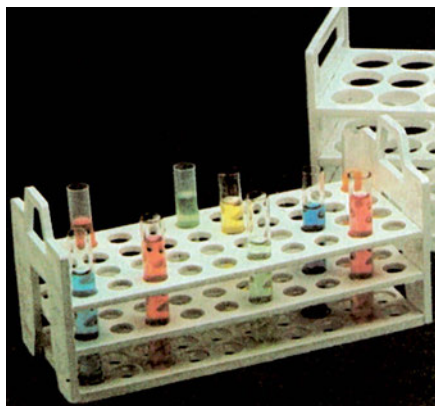
### ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ )

Στον ορό ή το πλάσμα: 274 – 385 µg/dL

**ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ** έως 1500 µg/dL

### ΕΙΔΙΚΕΣ ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

Ισχύουν όσα αναφέρονται για τον προσδιορισμό του σιδήρου



8.5 Στατώ με σωληνάκια

## 8.1.9 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΕΡΡΙΤΙΝΗΣ ΟΡΟΥ

Η φερριτίνη του ορού βρίσκεται σε ισορροπία με τη φερριτίνη των αποθεμάτων σιδήρου του οργανισμού. Προσδιορίζοντάς την στον ορό, έχουμε και μια εκτίμηση για το ποσό του αποθηκευμένου σιδήρου.

Η φερριτίνη ορού γίνεται συνήθως πάντα μαζί με τους προσδιορισμούς σιδήρου και ΤΙΒC. Έτσι έχουμε μια συνολική εικόνα για το σίδηρο του οργανισμού του εξεταζόμενου (ορού και αποθηκευμένου).

### ΜΕΘΟΔΟΙ

Για τον προσδιορισμό της φερριτίνης στον ορό χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο κυρίως ανοσοχημικές μέθοδοι: ανοσοενζυμικές (ELISA) είτε ραδιοανοσολογικές (RIA και IRMA).

### ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)

Άνδρες: 17 - 390 ng/ mL

Γυναίκες: 10 - 90 ng/ mL (προ εμμηνόπαυσης)

10 -150 ng/ mL (μετά την εμμηνόπαυση)

Οι παραπάνω τιμές είναι με τη μέθοδο IRMA.

Οι τιμές διαφέρουν αρκετά από μέθοδο σε μέθοδο και από εργαστήριο σε εργαστήριο.

## 8.2 ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ

Οι βιταμίνες είναι ουσίες που βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες στην τροφή των ανθρώπων και των ζώων και είναι απαραίτητες για τη διατήρησή τους, στη ζωή και για την ανάπτυξή τους. Οι βιταμίνες δεν βιοσυντίθενται στον ανθρώπινο οργανισμό και η λήψη τους γίνεται μόνο μέσω των τροφών ή με τη μορφή φαρμακευτικών σκευασμάτων.

Όλες οι βιταμίνες (περίπου 25) διαιρούνται σε δύο ομάδες, τις **υδατοδιαλυτές** και τις **λιποδιαλυτές** ανάλογα με τον τρόπο που εκχυλίζονται από τις τροφές. Οι λιποδιαλυτές εκχυλίζονται με οργανικούς διαλύτες ενώ οι υδατοδιαλυτές με υδατικά διαλύματα.

Η δράση των υδατοδιαλυτών βιταμινών στηρίζεται στην δραστηριότητά τους σαν συνένζυμα, δηλαδή, οργανικές ενώσεις που λειτουργούν σαν απαραίτητοι συμπαραγόντες για τη λειτουργία των ενζύμων. Η βιολογική τους δραστηριότητα εκφράζεται σε Διεθνείς Μονάδες (International Unit-I.U.). Ένα I.U. αντιστοιχεί σε διαφορετική ποσότητα για κάθε βιταμίνη (π.χ. για τη βιταμίνη A 1 I.U. = 0,3 μg, για τη βιταμίνη C 1 I.U. = 50 μg).

Πολλές από τις βιταμίνες που λαμβάνει ο άνθρωπος από τις τροφές βρίσκονται σε μορφή **προβιταμίνης**, δηλαδή, σε ανενεργή χημική μορφή που μετατρέπεται στον οργανισμό στη δραστική μορφή της βιταμίνης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η καροτίνη που βρίσκεται στα φυτά και το γάλα και η οποία μετατρέπεται στον ανθρώπινο οργανισμό σε βιταμίνη A.

Οι βιταμίνες βρίσκονται στον ανθρώπινο οργανισμό σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις γι' αυτό για τον προσδιορισμό τους στο αίμα απαιτούνται ευαίσθητες ραδιοανοσολογικές (RIA) ή ανοσοενζυμικές (ELISA) τεχνικές. Η μέτρησή τους έχει μεγάλη αξία για τη διάγνωση συγγενών ελλείψεων, ελλείψεων λόγω κακής διατροφής ή ανεπαρκειών που οδηγούν σε παθήσεις (π.χ. έλλειψη B12 οδηγεί σε μεγαλοβλαστική αναιμία). Ο προσδιορισμός των επιπέδων των βιταμινών γίνεται επίσης σε άτομα που λαμβάνουν έτοιμα φαρμακευτικά παρασκευάσματα (αθλητές, γυναίκες στην εμμηνόπαυση) για να αποφευχθεί η υπερβιταμίνωση που μπορεί να έχει τοξική δράση στον οργανισμό.



**8.6** Πολυκάναλη πιπέτα και πλάκα μικροβυθισμάτων για τους προσδιορισμούς ELISA



**8.7** Όργανο που «διαβάζει» τις πλάκες μικροβυθισμάτων στους προσδιορισμούς ELISA

# Ειδικές εξετάσεις **ΚΕΦ.8**

## 8.2.1 ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΕΣ ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

ΟΝΟΜΑ	ΔΙΑΛΥΤΟ-ΤΗΤΑ	ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΑΠΟ ΕΛΛΕΙΨΗ	ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΗ ΔΟΣΗ ΗΜΕΡΗΣΙΩΣ σε mg	ΠΗΓΕΣ
A Ρετινόλη	ΛΙΠΟΔΙΑΛΥΤΗ	30-65 pg/dL	Λειτουργία της όρασης	Ξηροφθαλμία, αλλοίωση επιθηλιακού ιστού	1,5-2,7	Συκώτι, γάλα πλήρες, βούτυρο, φρέσκα ψάρια
B1 Θειαμίνη	ΥΔΑΤΟ-ΔΙΑΛΥΤΗ		Μεταβολισμός υδατανθράκων	Βραδυκαρδία, κόπωση, μπέρι - μπέρι	1,2	Συκώτι, καρύδια, δημητριακά με φλοιό
B2 Ριβοφλαβίνη	"		Μεταφορά υδρογόνου	Αλλοιώσεις στο δέρμα και τα νύχια, τριχόπτωση	1,7	Αυγά, τυρί, πράσινα λαχανικά, μαγιά μπίρας
B4 Φολικό οξύ	"	3-16 ng/mL	Μεταφορά μόνο ανθρακικών μονάδων	Αναιμία, θρομβοπενία	1-2	Συκώτι, ζύμη, πράσινα φυτά
B5 Νικοτινικό οξύ	"			Σκληροδερμία, ψυχικές διαταραχές	18	Κρέας, δημητριακά, ξηροί καρποί
B3 Παντοθενικό οξύ	"		Μεταφορά ακυλομάδων	Κεφαλαλγίες, κόπωση	5-10	Κρόκος αυγών, ξηροί καρποί, φρούτα
B6 Πυριδοξίνη	"	5-30 ng/mL	Μεταβολισμός αμινοξέων	Νευρικήτητα, αϋπνία	2	Ψωμί, ψάρια, κρέας
B12 Κοβαλαμίνη	"	10-50 pg/dL	Συνένζυμο μεταβολικών αντιδράσεων	Διαταραχές νευρικού συστήματος, κακοήθης αναιμία	0,003	Λέκιθος του αυγού, γάλα
C Ασκορβικό οξύ	"	0,4-1,5 mg/dL	Αναγωγικός παράγοντας οξυγονασίων	Σκορβούτο	75	Εσπεριδοειδή, λαχανικά μήλα
H Βιοτίνη	"		Συνένζυμο σε αντιδράσεις καρβοξυλίωσης, μεταφορά CO <sub>2</sub>	Άγνωστη	0,25	Αυγά, σοκολάτα, μπανάνες
D Καλσιφερόλη	ΛΙΠΟΔΙΑΛΥΤΗ	16-65 pg/mL	Μεταβολισμός ασβεστίου και φωσφόρου	Κακή οστεοποίηση, ραχίτιδα	2,7	Αυγά, βούτυρο, συκώτι
E Τοκοφερόλη	"	0,6-1,8 mg/dL	Μεταφορά ηλεκτρονίων αντιοξειδωτικός παράγοντας	Ανοσοανεπάρκεια και παθήσεις γεννητικού συστήματος	5	Κόκκοι σταριού, μαρούλι, σέλινα, λάχανο
K Φυλλοκινόνη	"		Μεταφορά ηλεκτρονίων	Ανεπαρκής πήξη του αίματος	1	Πράσινα λαχανικά



### 8.3 ΟΡΜΟΝΕΣ

Οι **ορμόνες** είναι χημικές ουσίες που εκκρίνονται από ιστούς ή όργανα και μεταφέρονται με την κυκλοφορία σε άλλα όργανα όπου και επάγουν (διεγείρουν, αναστέλλουν ή ρυθμίζουν) συγκεκριμένες δραστηριότητες. Για το λόγο αυτό οι ορμόνες ονομάζονται και **χημικοί διαβιβαστές**.

Οι ιστοί ή τα όργανα που εκκρίνουν μια ή περισσότερες ορμόνες ονομάζονται **ενδοκρινείς** αδένες και οι ιστοί των οποίων η δραστηριότητα συντονίζεται από μια ορμόνη ονομάζονται **όργανα - στόχοι** της ορμόνης.

Το ορμονικό σύστημα είναι ένα εξαιρετικά πολύπλοκο σύστημα που μοιάζει με έναν καταρράκτη. Ένα εξωτερικό συνήθως ερέθισμα έχει ως αποτέλεσμα τη διέγερση του κεντρικού νευρικού συστήματος και την έκλυση ορμονών από τον υποθάλαμο. Οι ορμόνες αυτές διεγείρουν την έκλυση άλλων ορμονών από την αδenoυπόφυση ή τη νευροϋπόφυση. Αυτές με την σειρά τους δίνουν το σήμα για την έκκριση άλλων ορμονών από όργανα στόχους όπως ο θυρεοειδής αδένας, ο φλοιός των επινεφριδίων, τα παγκρεατικά νησίδια του Langerhans, οι όρχεις και οι ωοθήκες.

Οι ορμόνες που παράγονται από τα όργανα - στόχους κατευθύνονται μέσω της κυκλοφορίας στους τελικούς στόχους, όπως το ήπαρ, τα όργανα της αναπαραγωγής και οι μυς, όπου ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των οργάνων αυτών.

Σε κατάσταση ηρεμίας οι ορμόνες ανιχνεύονται στο αίμα σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (nmol/mL ή pmol/mL). Η συγκέντρωσή τους όμως στην κυκλοφορία αυξάνει κατακόρυφα όταν διεγερθεί η έκκρισή τους από ένα εξωτερικό ερέθισμα ή μια παθολογική κατάσταση. Όταν το εξωτερικό ερέθισμα σταματήσει, τότε τα επίπεδα της ορμόνης στην κυκλοφορία αποκαθίστανται ταχύτητα. Τα επίπεδα μιας ορμόνης στην κυκλοφορία ελέγχονται επίσης με **ρυθμιστικά ορμονικά κυκλώματα ή με αλλαγή της συγκέντρωσης των προϊόντων** που είναι το αποτέλεσμα δράσης των ορμονών.

Ο μηχανισμός των ορμονικών κυκλωμάτων είναι γνωστός και ως μηχανισμός αναδραστικής αναστολής. Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, όταν το σύστημα των αδένων του υποθαλάμου και της υπόφυσης ενεργοποιήσει την παραγωγή μιας ορμόνης και η ορμόνη αυτή βρεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στην κυκλοφορία, η ίδια η ορμόνη αναστέλλει το σύστημα παραγωγής της δρώντας ως αναστολέας. Ο μηχανισμός της αλλαγής της συγκέντρωσης των προϊόντων είναι πιο σπάνιος από την αναδραστική αναστολή και συναντάται στο σύστημα ινσουλίνης – γλυκόζης. Η έκκριση της ινσουλίνης ρυθμίζει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα αλλά και ρυθμίζεται από τη συγκέντρωση γλυκόζης σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

**Οι ορμόνες δρουν στα κύτταρα - στόχους με τον ακόλουθο μηχανισμό:**

Δεσμεύονται πάνω σε υποδοχείς στην πλασματική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα των κυττάρων. Οι υποδοχείς είναι μόρια που συνδέονται με υψηλή συγγένεια

με τις ορμόνες και στη συνέχεια υφίστανται χημικές μεταβολές που οδηγούν στο τελικό μήνυμα έτσι ώστε να εκτελεσθεί η εντολή της ορμόνης.

Οι ορμόνες σύμφωνα με τον **τρόπο παραγωγής** μπορούν να διακριθούν σε: αδενικές, νευροεκκριτικές, ιστικές και τοπικές ή διαβιβαστές.

Ανάλογα με τη **χημική τους σύνθεση** χωρίζονται σε στεροειδείς, πεπτιδικές και αμινοτικές ορμόνες. Οι κυριότερες ορμόνες στον ανθρώπινο οργανισμό, και οι αδένες που τις παράγουν στόχοι φαίνονται στο σχήμα 8.8

Το σύστημα **υποθαλάμου - υπόφυσης** παράγει πολλές ορμόνες. Ο υποθάλαμος εκκρίνει τις εκλυτικές ορμόνες που διεγείρουν την παραγωγή των ορμονών της υπόφυσης.

Η **αδενούπόφυση** εκκρίνει την **αυξητική** ορμόνη (GH), την **προλακτίνη** (PRL), τη **θυρεοτροπίνη** (TSH), την **ωχρινοτροπίνη** (LH), την **θυλακιοτροπίνη** (FSH), τη **μελανοτροπίνη** (MSH) και την **κορτικοτροπίνη** (ACTH).

Η **νευρούπόφυση** εκκρίνει την **βασοπρεσσίνη** (αντιδιουρητική ορμόνη-ADH) που δρα στους νεφρούς και την **ωκυτοκίνη** που προκαλεί συσπάσεις στη μήτρα κατά τη διάρκεια του τοκετού.

Ο **θύμος αδένας** παράγει ορμόνες που επάγουν την ανάπτυξη των β-λεμφοκυττάρων.

Ο **θυρεοειδής αδένας** παράγει τη **θυροξίνη** ( $T_4$ ) και την **τριϊωδοθυρονίνη** ( $T_3$ ) που ελέγχουν το μεταβολισμό και την **καλσιτονίνη** (CT) που συμμετέχει στη ρύθμιση των επιπέδων ασβεστίου.

Οι **παραθυρεοειδείς αδένες** παράγουν την **παραθορμόνη** (PTH) που σε συνδυασμό με τη βιταμίνη D ρυθμίζει το μεταβολισμό του ασβεστίου.

Το **πάγκρεας** απελευθερώνει **ινσουλίνη** και **γλυκαγόνη** (ή γλουκαγόνο) που ρυθμίζουν τη συγκέντρωση γλυκόζης και τη **σωματοστατίνη** που αναστέλλει την έκκριση των δυο άλλων ορμονών.

Τα **επινεφρίδια** απελευθερώνουν από το μυελό τις **κατεχολαμίνες** (αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη) σε καταστάσεις stress. Στο φλοιό των επινεφριδίων συντίθενται στεροειδείς ορμόνες όπως **ανδρογόνα**, γλυκοκορτικοστεροειδή (**κορτιζόλη**) και αλατοκορτικοειδή (**αλδοστερόνη**).

Οι **νεφροί** εκκρίνουν **ερυθροποιητίνη** που διεγείρει την παραγωγή ερυθροκυττάρων στο μυελό και τη **ρενίνη** που συμμετέχει στη ρύθμιση της πίεσης του αίματος.

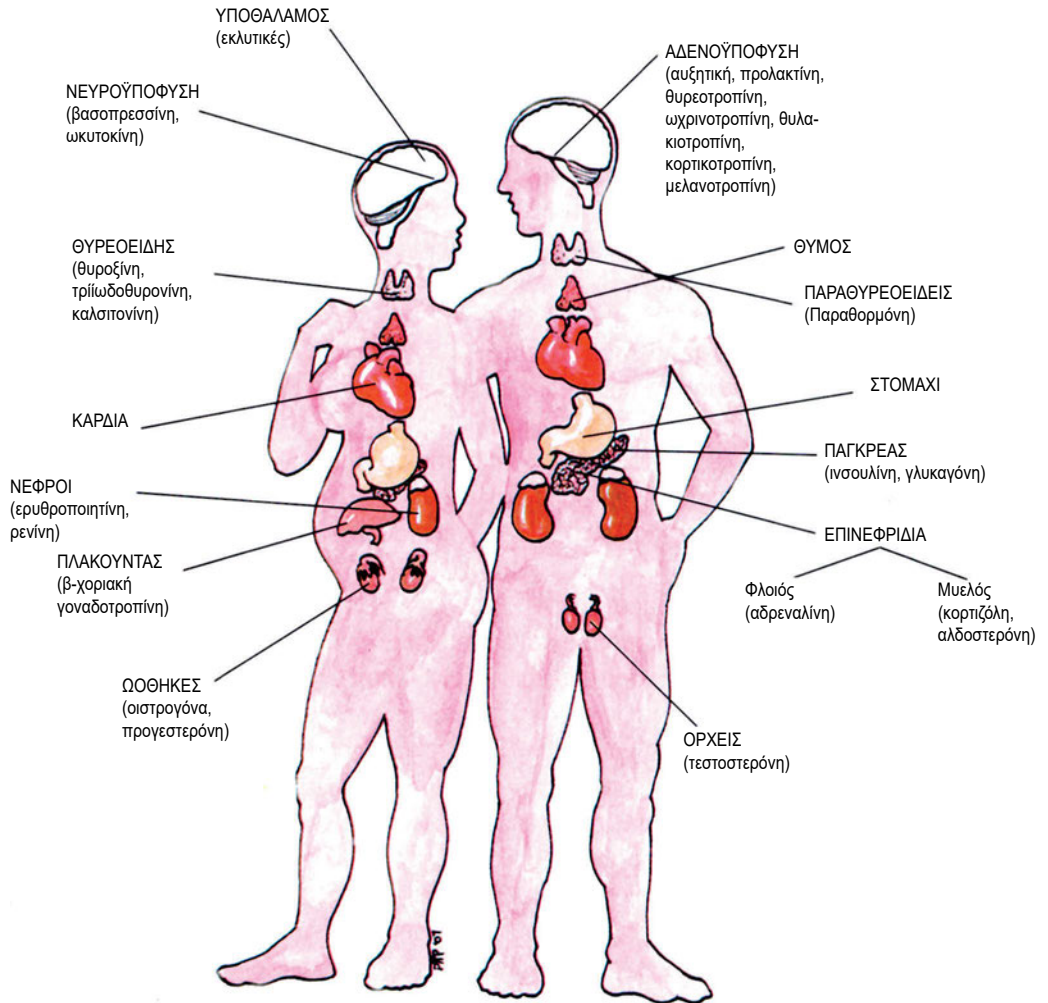
Η **καρδιά** συνθέτει πεπτιδικά που συμμετέχουν στη ρύθμιση της πίεσης του αίματος.

Ο **στόμαχος** εκκρίνει ορμόνες που διεγείρουν ή αναστέλλουν τη δραστηριότητα του πεπτικού συστήματος.

Ο **πλακούντας** παράγει ορμόνες που συμβάλλουν στην ομαλή εξέλιξη της πορείας της κύησης, όπως η **β-χοριακή γοναδοτροπίνη** ( $\beta$ -HCG).

Οι **ωθήκες** συνθέτουν **οιστρογόνα** και **προγεστερόνη** που ρυθμίζουν την έμμηνο ρύση και την κύηση.

Οι **όρχεις** εκκρίνουν ανδρογόνα (**τεστοστερόνη**) που επάγουν τη διαφοροποίηση των φύλων.



8.8 Οι αδένες και οι σημαντικότερες ορμόνες που εκκρίνουν

## 8.3.1 ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΟΡΜΟΝΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Η υπερπαραγωγή αλλά και η μειωμένη παραγωγή ορμονών μπορούν να οδηγήσουν σε βαριά συμπτώματα νόσου τα οποία αντιμετωπίζονται με φαρμακευτική αγωγή ή με χειρουργική επέμβαση.

Υπερπαραγωγή ορμονών οφείλεται συχνά σε **όγκους** των ενδοκρινών αδένων. Οι όγκοι δεν μπορούν να αντιδράσουν στους μηχανισμούς ρύθμισης και ελέγχου της παραγωγής ορμονών με τρόπο αντίστοιχο με αυτό του υγιούς αδένα. Μ' αυτόν τον τρόπο τα επίπεδα της ορμόνης αυξάνουν ανεξέλεγκτα και κατακόρυφα στην κυκλοφορία. Άλλη πηγή υπερπαραγωγής ορμονών είναι η έκτοπη σύνθεση από κακοήθη ιστό που εγκαθίσταται έξω από τον κυρίως αδένα που παράγει ανεξέλεγκτα ορμόνη. Ως άλλη αιτία υπερπαραγωγής αναφέρεται ή ελλιπής αντίδραση του αδένα στον μηχανισμό της αναδραστικής αναστολής που οφείλεται σε αυτοάνοσα νοσήματα.

Μειωμένη παραγωγή ορμονών μπορεί να οφείλεται σε **γενετικές ανωμαλίες** (μεγάλες ελλείψεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις ορμόνες), σε γενετικές βλάβες στα ένζυμα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των ορμονών, σε καταστροφή των ιστών των ενδοκρινών αδένων λόγω παθολογικών καταστάσεων ή σε αδυναμία αντίδρασης στο ερέθισμα (εκλυκτική ορμόνη) που κάτω από φυσιολογικές συνθήκες οδηγεί στην παραγωγή ορμόνης.

## 8.3.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

Για την εργαστηριακή διερεύνηση της λειτουργίας των ενδοκρινών αδένων έχει μεγάλη σημασία ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ορμονών στην κυκλοφορία. Επειδή οι ορμόνες βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες της τάξης  $nmol$  ή  $pmol$ , ο προσδιορισμός τους απαιτεί πολύ ευαίσθητες τεχνικές. Το γεγονός ότι πολλές ορμόνες έχουν παρεμφερείς χημικές ιδιότητες καθιστά ακόμα πιο δύσκολο τον ποσοτικό προσδιορισμό μιας ορμόνης

χωρίς την παρεμβολή διασταυρούμενων αντιδράσεων με τις συγγενείς ορμόνες και υπαγορεύει την εφαρμογή τεχνικών με μεγάλη ειδικότητα.

Έχει βρεθεί ότι οι τεχνικές που χρησιμοποιούν ως αρχή προσδιορισμού την **αντίδραση αντιγόνου αντι-σώματος (Ag-Ab)** χαρακτηρίζονται από πολύ μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα. Οι πιο συχνά εφαρμοζόμενες τεχνικές που στηρίζονται σ' αυτήν την αρχή είναι οι ραδιοανοσομετρικές (Radio Immuno Assay, **RIA**) και οι ανοσοενζυμικές (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, **ELISA**). Τέλος έχουν αναπτυχθεί και άλλες αξιόπιστες μέθοδοι, όπως η **χημειοφωταύγεια**.

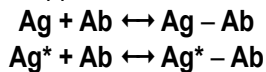


8.9 Σετ αντιδραστηρίων για ELISA

## ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ RIA

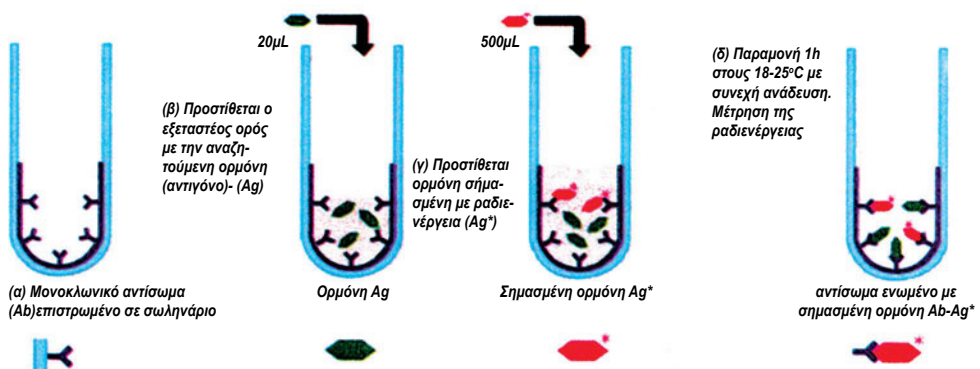
Σε διάλυμα με αντίσωμα Ab επιστρωμένο σε σταθερή επιφάνεια (σχ.8.10α), προστίθενται ο ορός που περιέχει το προς προσδιορισμό αντιγόνο Ag (ορμόνη) (σχ.8.10β) και αντιγόνο Ag\* σημασμένο με ραδιενεργό ιώδιο  $I^{125}$  (σχ.8.10γ). Το δείγμα επώαζεται σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας. Κατά τη διάρκεια της επώασης η προς προσδιορισμό ορμόνη και η ραδιενεργά σημασμένη ορμόνη ανταγωνίζονται για να προσδεθούν στις ειδικές θέσεις πρόσδεσης του αντισώματος. Όσο περισσότερη ορμόνη υπάρχει στο δείγμα, τόσο λιγότερη ραδιενεργά σημασμένη ορμόνη θα ενωθεί με το αντίσωμα.

Σχηματικά οι αντιδράσεις που συμβαίνουν είναι οι ακόλουθες:



Μετά το πέρας της επώασης και την έκπλυση της περίσσειας των αντιδραστηρίων μετράται η ακτινοβολία σε μετρητή γ-ακτινοβολίας (γ-counter) (σχ.8.10δ). Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με βάση τις τιμές cpm (counts per minute, κρούσεις ανά λεπτό) των προτύπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης. Με βάση αυτή την καμπύλη βρίσκεται η συγκέντρωση της ορμόνης στο δείγμα. **Η συγκέντρωση είναι αντιστρόφως ανάλογη της τιμής των ραδιενεργών κρούσεων (cpm).**

Η ραδιοανάλυση που περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1960 από τους Berson και Yalow, χρησιμοποιήθηκε αρχικά για προσδιορισμό πεπτιδικών ορμονών. Στη συνέχεια επεκτάθηκε και στον προσδιορισμό χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεων που δεν έχουν από μόνες τους αντιγονικές ιδιότητες αλλά τις αποκτούν όταν προσδεθούν σε πρωτεΐνες, (π.χ. η αλβουμίνη).



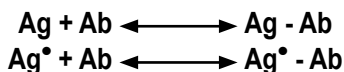
8.10 Η αρχή της μεθόδου RIA

## ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ELISA

Οι περισσότερες ανοσοενζυμικές μέθοδοι βασίζονται σε αρχή ανάλογη με αυτή της RIA αλλά σ' αυτήν την περίπτωση η σήμανση των ουσιών δεν γίνεται με ραδιενέργεια αλλά με ένζυμο και η μέτρηση του αποτελέσματος δεν γίνεται με προσδιορισμό της ραδιενέργειας αλλά της ενζυμικής δραστηριότητας. Διακρίνουμε την ανταγωνιστική ELISA και την ELISA τύπου sandwich.

## ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ ELISA

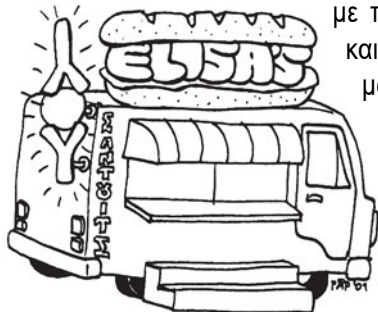
Στην ακόλουθη αντίδραση, ορμόνη σημασμένη με ένζυμο ( $Ag^*$ ) και ελεύθερη ορμόνη ( $Ag$ ) ανταγωνίζονται για να δεσμευθούν σε περιορισμένο αριθμό αντισωμάτων καθηλωμένων σε σταθερή επιφάνεια:



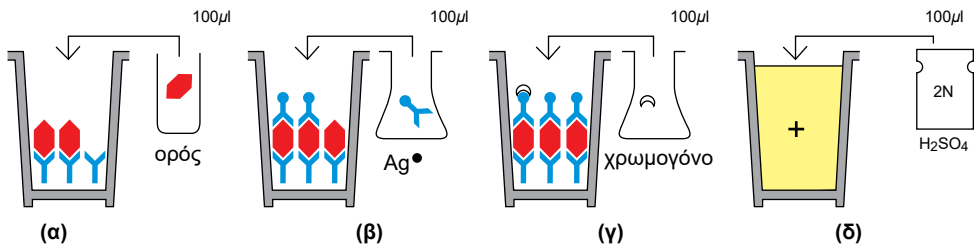
Μετά από επώαση και έκπλυση (απομάκρυνση) της περίσσειας των μη δεσμευμένων αντιγόνων (σημασμένων και μη), προστίθεται κατάλληλο χρωμογόνο υπόστρωμα και μετράται η απορρόφηση που αντικατοπτρίζει τη δραστηριότητα του καθηλωμένου ενζύμου. **Η συγκέντρωση της προς προσδιορισμό ορμόνης είναι αντιστρόφως ανάλογη της έντασης του χρώματος.** Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης γίνεται με βάση πρότυπη καμπύλη που κατασκευάζεται με πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης.

## SANDWICH ELISA

Το άγνωστο δείγμα που περιέχει την προς προσδιορισμό ορμόνη ( $Ag$ ), επωάζεται διαδοχικά με δύο διαλύματα: ένα διάλυμα αντισώματος ( $Ab$ ) καθηλωμένο σε σταθερή επιφάνεια (σχ.8.11α) και ένα διάλυμα αντισώματος σημασμένου με ένζυμο ( $Ag^*$ ). Κατά τη διάρκεια της επώασης δημιουργείται ένα sandwich  $Ab - Ag - Ag^*$  (σχ.8.11β). Μετά την έκπλυση της περίσσειας των μη δεσμευμένων μορίων, το συζευγμένο ένζυμο ενεργοποιείται με την προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος (σχ.8.11γ) και μετράται φωτομετρικά η δραστηριότητά του, αφού σταματήσει προηγουμένως η αντίδραση με την προσθήκη διαλύματος  $H_2SO_4$  (σχ.8.11 δ).



**Η συγκέντρωση της προς προσδιορισμό ορμόνης είναι ευθέως ανάλογη της έντασης του χρώματος.** Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της ορμόνης γίνεται με βάση πρότυπη καμπύλη που κατασκευάζεται με διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης.



- ΥΠΟΜΝΗΜΑ**
- Υ αντίσωμα (Ab) καθηλωμένο στο σωληνάριο
  - ♦ ορμόνη (Ag) του εξεταστέου ορού
  - λ αντίσωμα σημασμένο με ένζυμο (Ag•)
  - ⊖ χρωμογόνο υπόστρωμα

8.11 Η αρχή της μεθόδου sandwich ELISA

## 8.4 ΕΓΚΕΦΑΛΟΝΩΤΙΑΙΟ ΥΓΡΟ (Ε.Ν.Υ.)

### 8.4.1 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΟ Ε.Ν.Υ.

Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Ε.Ν.Υ.) παράγεται από το χοροειδές πλέγμα των κοιλιών του εγκεφάλου. Γεμίζει τον υπαραχνοειδή χώρο, τις κοιλίες του εγκεφάλου και τον κεντρικό σωλήνα του νωτιαίου μυελού. Είναι διήθημα του πλάσματος, με το οποίο διατηρεί ισορροπία. Ο συνολικός όγκος του είναι 90-150 mL. Η σύστασή του παραμένει σταθερή. Στο Ε.Ν.Υ. δεν υπάρχουν μικρόβια.

### 8.4.2. ΛΗΨΗ ΤΟΥ Ε.Ν.Υ.

Η λήψη του Ε.Ν.Υ. γίνεται με οσφυονωτιαία παρακέντηση ή από παρακέντηση κοιλιών πιο σπάνια. Το υγρό ρέει με τη μορφή σταγόνων. Το δείγμα μαζεύεται σε 3-4 σωληνάκια, ένα από τα οποία πρέπει να είναι αποστειρωμένο για μικροβιολογική εξέταση. Το Ε.Ν.Υ. πρέπει να εξετάζεται χωρίς καθυστέρηση και να αποφεύγεται η μόλυνσή του.

### 8.4.3. ΦΥΣΙΚΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΕΣ

- (α) Ποσό: 90-150 mL.
- (β) Τάση (πίεση): 10-12 cm στήλης ύδατος, όταν ο εξεταζόμενος βρίσκεται σε ύπτια θέση κατά την παρακέντηση.
- (γ) Χροιά: Άχρωμο. Σε παθολογικές περιπτώσεις γίνεται κόκκινο, ξανθοχρωματικό ή κιτρινοπράσινο.



- (δ) Όψη: Διαυγής. Θολερή σε μηνιγγίτιδες.
- (ε) Ειδικό βάρος: 1003-1008
- (στ) pH: 7,35-7,60

## 8.4.4. ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

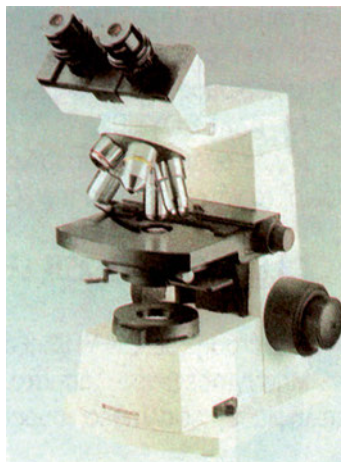
Το φυσιολογικό Ε.Ν.Υ. περιέχει 0-5 λεμφοκύτταρα. Σε παιδιά μπορεί να φτάσουν μέχρι 25. Αύξηση του αριθμού τους, όπως και ύπαρξη άλλων κυττάρων (ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα, μονοπύρνα κ.λπ.) έχει σοβαρή διαγνωστική σημασία για κάποιες ασθένειες.

### (α) Μέτρηση κυττάρων:

Πρέπει να γίνει μέσα σε 30 λεπτά από τη λήψη. Η μέτρηση γίνεται πάνω σε πλάκα Neubauer ή σε αυτόματους αναλυτές. Αν υπάρχουν ερυθρά αιμοσφαίρια προσθέτουμε μια σταγόνα οξικού οξέος 33%, σε 10 σταγόνες Ε.Ν.Υ. Το αποτέλεσμα πολλαπλασιάζεται x 1,1. Μετρούμε τα κύτταρα σε 4 μεγάλα τετράγωνα και υπολογίζουμε όπως στη μέτρηση λευκών του αίματος.

### (β) Τύποι κυττάρων:

Ετοιμάζουμε παρασκευάσμα πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα από το ίζημα (ή από το ίδιο το υγρό αν είναι θολερό) και το χρωματίζουμε με Giemsa. Η μικροσκοπήση γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως στο λευκοκυτταρικό τύπο του αίματος.



8.12 Μικροσκόπιο διοφθάλμιο για την κυτταρολογική εξέταση ΕΝΥ

## 8.4.5. ΧΗΜΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

### (α) ΓΛΥΚΟΖΗ

Οι φυσιολογικές τιμές της γλυκόζης του Ε.Ν.Υ. είναι 50-70 mg/dL με την ενζυμική μέθοδο προσδιορισμού που περιγράψαμε στις βιοχημικές εξετάσεις του αίματος.

Κάθε αύξηση ή ελάττωση της γλυκόζης στο αίμα ακολουθείται από αντίστοιχη μεταβολή στο Ε.Ν.Υ.

Ελάττωση συμβαίνει επίσης σε μηνιγγίτιδες, καρκίνους του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), σύφιλη του ΚΝΣ κ.λπ.

Αύξηση συμβαίνει και σε άλλες νόσους του ΚΝΣ.

### (β) ΛΕΥΚΩΜΑ

Ο προσδιορισμός του πρέπει να γίνει μέσα σε 1 ώρα από τη λήψη του υγρού. Το ποσό του φυσιολογικά είναι 10-45 mg/dL. Η σχέση λευκωματίνης/σφαιρινών είναι 2:1 (ενήλικες). Μεγάλη αύξηση λευκώματος έχουμε σε μηνιγγίτιδες, εγκεφαλίτιδες κ.λπ. νόσους του ΚΝΣ.

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ**

Προσδιορισμός λευκωμάτων γίνεται με τη μέθοδο διουρίας, που ήδη περιγράψαμε στις βιοχημικές εξετάσεις. Υπάρχουν και άλλες πολλές μέθοδοι για τον προσδιορισμό τους (π.χ. θολομετρική, πήξεως και καθιζήσεως κ.λπ.).

**ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ**

Γίνεται με την ίδια τεχνική που περιγράψαμε για τον ορό αίματος, με τη διαφορά ότι πολλές φορές χρειάζεται συμπύκνωση του Ε.Ν.Υ., γιατί το ποσό των λευκωμάτων σ' αυτό είναι μικρό.

**ΑΝΟΣΟΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ**

Έχει σημασία να προσδιορίσουμε τις γ-σφαιρίνες και να τις αναλύσουμε στα διάφορα είδη τους: IgG, IgA, IgM, γιατί αυτές αυξάνονται σε διάφορες ασθένειες π.χ. φλεγμονώδεις νόσοι του εγκεφάλου, ιογενείς μηνιγγίτιδες κ.λπ. Η τεχνική είναι ίδια με τον ορό. Προσδιορισμός ανοσοσφαιρινών γίνεται και με την τεχνική της ανοσοδιάχυσης.

**(γ) ΑΛΛΕΣ ΟΥΣΙΕΣ**

Άλλες ουσίες που προσδιορίζουμε στο Ε.Ν.Υ., είναι τα χλωριούχα, το ασβέστιο, το κάλιο, το νάτριο, ένζυμα (π.χ. LDH) κ.λπ.

**8.4.6 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ**

Η εξέταση του Ε.Ν.Υ. βοηθά στη διάγνωση των παρακάτω ασθενειών:

Μηνιγγίτιδες, νεοπλάσματα εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού, αιματώματα εγκεφάλου, επιληψία, εγκεφαλίτιδες, ουραιμία, ηπατοπάθειες, αλκοολισμός, διαβήτης κ.ά.

**8.5 ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑ****8.5.1 ΕΙΔΗ ΚΑΙ ΣΚΟΠΙΜΟΤΗΤΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ****ΓΕΝΙΚΑ**

Το μέρος της κλινικής χημείας που ασχολείται με τον προσδιορισμό φαρμάκων και γενικά τοξικών ουσιών στα βιολογικά υγρά του ανθρώπου, και κυρίως στο αίμα, ονομάζεται **κλινική τοξικολογία**.

Σε δυο κυρίως περιπτώσεις μας ενδιαφέρουν οι προσδιορισμοί φαρμάκων και δηλητηρίων στο αίμα:

**Α) Σε δηλητηριάσεις από φάρμακα.**

Συνέχεια αυξάνει ο αριθμός των ασθενών που εισάγονται στα νοσοκομεία και πάσχουν από αυξημένες δόσεις φαρμάκων και άλλων τοξικών ουσιών, που συνήθως έχουν πάρει χωρίς ιατρική συνταγή και παρακολούθηση.

Η δηλητηρίαση αποκτά σημαντικό ενδιαφέρον για τη διαφορική διάγνωση του κώματος

(να βρούμε δηλ. την αιτία του) που βρίσκεται ο ασθενής, έστω κι αν είναι γνωστό ότι πήρε π.χ. βαρβιτουρικά, γιατί δεν γνωρίζουμε πόσο υπεύθυνο για την κατάστασή του είναι το φάρμακο.

## Β) Στις θεραπευτικές χορηγήσεις φαρμάκων.

Στις ορισμένες περιπτώσεις όπου χορηγείται με ιατρική συνταγή σε ασθενείς κάποιο φάρμακο, μας ενδιαφέρει η ανίχνευση των επιπέδων του φαρμάκου αυτού στο αίμα (δηλ. η συγκέντρωσή του). Και αυτό είναι πολλές φορές κρίσιμο γιατί η αυξημένη συγκέντρωση μιας ουσίας (φαρμάκου) στο αίμα, μπορεί να γίνει από θεραπευτική, τοξική για τον ασθενή.

Δεν αρκεί όμως ο ποιοτικός προσδιορισμός μιας τοξικής ουσίας. Ίχνη βαρβιτουρικών και σαλικυλικών μπορεί να υπάρχουν και λόγω θεραπείας. Ανθρακουλαιμοσφαιρίνη μπορεί να εμφανισθεί από καυσαέρια ή λόγω καπνίσματος. Απαιτείται λοιπόν και ο ποσοτικός προσδιορισμός των ουσιών αυτών.

## **ΔΕΙΓΜΑΤΑ**

Οι προσδιορισμοί γίνονται στο **αίμα**, στο γαστρικό υγρό και στα ούρα. Προτιμούμε την ανάλυση του αίματος, γιατί η περιεκτικότητά του δίνει ακριβέστερο δείκτη της συγκέντρωσης στους ιστούς, από την περιεκτικότητα του γαστρικού υγρού ή των ούρων.

## **ΧΡΟΝΟΣ ΗΜΙΖΩΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΥ**

Πολλές φορές η απάντηση του εργαστηρίου, δίνεται μετά από λίγες ώρες. Στις περιπτώσεις αυτές, είναι χρήσιμο να γνωρίζουμε την ταχύτητα μείωσης της συγκέντρωσης στο αίμα των ουσιών αυτών, ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού ή της απέκκρισης.

Η πτώση της συγκέντρωσης ακολουθεί εκθετική καμπύλη, δηλ. μετά από το «χρόνο ημίσειας ζωής» ή «ημιζωής», η συγκέντρωση του φαρμάκου είναι στο μισό της αρχικής τιμής. Μετά από 2 «χρόνους ημίσειας ζωής», η συγκέντρωση είναι στο 1/4 της αρχικής τιμής.

## **ΠΙΝΑΚΑΣ**

### **Χρόνοι Ημίσειας Ζωής Τοξικών Ουσιών (κατά προσέγγιση)**

Ανθρακουλαιμοσφαιρίνη	4 ώρες	Ασθενής που αναπνέει αέρα
»	3/4 ώρας	Ασθενής που αναπνέει O <sub>2</sub>
Σαλικυλικά	20 ώρες	
Βαρβιτουρικά	3-5 μέρες	Μακράς δράσης
»	1-2 μέρες	Ενδιάμεσης δράσης
»	10-20 ώρες	Βραχείας δράσης

## ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ

Για τον προσδιορισμό φαρμάκων και δηλητηρίων στο αίμα χρησιμοποιούμε τεχνικές και αντίστοιχα όργανα που έχουν ήδη αναφερθεί σε προηγούμενα κεφάλαια του βιβλίου.

Χρησιμοποιούμε κυρίως τις παρακάτω μεθόδους:

- Χρωματογραφία υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (HPLC).
- Μέθοδο RIA.
- Μέθοδο ELISA.
- Χημειοφωταύγεια.
- Φωτομετρική μέθοδο (σε ορισμένες περιπτώσεις).



8.13 Φωτόμετρο αυτόματο

Σήμερα υπάρχουν αυτόματα μηχανήματα τα οποία ανιχνεύουν και προσδιορίζουν ποσοτικά έναν μεγάλο αριθμό φαρμακευτικών ουσιών.

Προσδιορισμοί φαρμάκων γίνονται κυρίως σε αντικαταθλιπτικά, αντιεπιληπτικά, αντιβιοτικά, σαλικυλικά, βαρβιτουρικά, καρδιοτονωτικά, βρογχοδιασταλτικά, ψυχοτρόπα, ναρκωτικά κ.ά.

Επίσης σε αλκοόλη, ανθρακυλαιμοσφαιρίνη, αρσενικό, μόλυβδο, λίθιο, βρωμιούχα κ.ά.

## 8.5.2 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

### A) ΑΝΘΡΑΚΥΛΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ

Το μονοξείδιο του άνθρακα είναι ένα τοξικό αέριο που βρίσκεται, μεταξύ των άλλων, κυρίως στα καυσάερια των αυτοκινήτων και στον καπνό του τσιγάρου. Αυτό ενώνεται εύκολα με την αιμοσφαιρίνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων του ανθρώπου και παράγεται η ανθρακυλαιμοσφαιρίνη. Με αυτόν τον τρόπο δυσκολεύεται η φυσιολογική λειτουργία της αιμοσφαιρίνης, δηλ. η μεταφορά οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα. Η δηλητηρίαση αυτή μπορεί να επιφέρει ακόμη και το θάνατο.

### Μέθοδος προσδιορισμού

Τα ερυθρά πλένονται με φυσιολογικό ορό και μετά αιμολύονται με απεσταγμένο νερό. Η οξυαιμοσφαιρίνη καταβυθίζεται σε pH 5,28 με θέρμανση στους 57-57,5 °C για 8 min. Η κατεργασία αυτή καταβυθίζει πλήρως την οξυαιμοσφαιρίνη και τα 80% περίπου της ανθρακυλαιο-σφαιρίνης παραμένουν σε διάλυση.

Τελικά φωτομετρούμε το Εξεταστέο και το Standard και υπολογίζουμε το αποτέλεσμα.

### B) ΒΑΡΒΙΤΟΥΡΙΚΑ

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας του αίματος σε βαρβιτουρικά είναι χρήσιμος για τη διάγνωση οξείας δηλητηρίασης.

Αν γίνουν επανειλημμένοι προσδιορισμοί, είναι δυνατό να παρακολουθηθεί η αποβολή του φαρμάκου από το σώμα του εξεταζόμενου. Υπάρχουν διάφορα είδη βαρβιτουρικών, που υποδιαιρούνται από φαρμακολογική άποψη σε μακράς, ενδιάμεσης και βραχείας δράσης. Η κλινική κατάσταση του ασθενούς δεν εξαρτάται μόνο από την ποσότητα αλλά και το είδος του βαρβιτουρικού.

Είδη βαρβιτουρικών είναι η βαρβιτάλη, η φαινοβαρβιτάλη, η κυκλοβαρβιτάλη, η βουτοβαρβιτάλη κ.λπ.

### **Μέθοδοι προσδιορισμού.**

Για την ανίχνευση των βαρβιτουρικών στο αίμα χρησιμοποιούνται: η δοκιμασία διαλογής, ο χρωματογραφικός διαχωρισμός τους και ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός.

### **Γ) ΑΛΚΟΟΛΗ (ΟΙΝΟΠΝΕΥΜΑ)**

Η μέτρηση των επιπέδων της αιθυλικής αλκοόλης στο αίμα είναι μια από τις περισσότερο συχνά εφαρμοζόμενες εργαστηριακές εξετάσεις στην κατηγορία των φαρμάκων και δηλητηρίων.

Μεγάλη είναι η αξία αυτού του προσδιορισμού σε περιπτώσεις τροχαίων ατυχημάτων αλλά και για ιατροδικαστικούς λόγους (σε περιπτώσεις παραβατικών συμπεριφορών, εγκλήματα κ.λπ.).

Σήμερα είναι κατορθωτή η μέτρηση των επιπέδων αλκοόλης με ένα απλό τεστ, το γνωστό μας «αλκοτέστ». Το τεστ αυτό πραγματοποιείται κυρίως για τις ανάγκες του άμεσου ελέγχου των οδηγών αυτοκινήτων. Η πραγματοποίησή του γίνεται με την απλή εκπνοή του ελεγχόμενου στο σωλήνα του ειδικού οργάνου για το «αλκοτέστ».

### **ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ**

Ο προσδιορισμός της αλκοόλης γίνεται στο αίμα (ορό ή πλάσμα). Κατά τη λήψη προσέχουμε να μη χρησιμοποιήσουμε ως αντισηπτικό οινόπνευμα, γιατί είναι δυνατόν να επηρεάσει το αποτέλεσμα. Αντί γι' αυτό χρησιμοποιούμε για τον τοπικό καθαρισμό της περιοχής φλεβοκέντησης υδατικό αντισηπτικό διάλυμα.

Πρόσθετα στοιχεία όπως ο ακριβής χρόνος συλλογής του δείγματος καθώς και ο χρόνος αποστολής του στο εργαστήριο είναι σημαντικά να καταγράφονται, μαζί με τα υπόλοιπα στοιχεία του εξεταζόμενου.

### **ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)**

Φυσιολογικά δεν υπάρχει αλκοόλη στο αίμα. Πολλή συζήτηση γίνεται μεταξύ των ειδικών σχετικά με το ποια είναι τα ασφαλή επίπεδα αλκοόλης στο αίμα, πάνω από τα οποία θεωρείται ότι υπάρχει δηλητηρίαση. Βέβαια τα όρια αυτά είναι σχετικά και με ορισμένα χαρακτηριστικά του κάθε ατόμου, όπως βάρος σώματος, ηλικία, συνθήκες λήψης της αλκοόλης, χρόνος που πέρασε από τη λήψη κ.ά.

Δεν θεωρείται ότι έχουμε δηλητηρίαση ούτε παρατηρούνται συμπτώματα στον άνθρωπο με τιμές μεταξύ 10-50 mg/dL.

Τιμές μεταξύ 500-800 mg/dL είναι θανατηφόρες.

### **Δ) ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΑ**

Το σαλικυλικό οξύ (ασπιρίνη) και διάφορα σαλικυλικά άλατα απορροφώνται ταχύτατα από το γαστρεντερικό, φέρονται στο ήπαρ ενωμένα με λεύκωμα, όπου μεταβολίζεται το σαλικυλικό οξύ, ενώ η περίσσεια αποβάλλεται με τα ούρα. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση στο αίμα παρατηρείται 2 ώρες μετά τη λήψη.

### **8.5.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΩΝ ΣΤΑ ΑΙΜΑ (Χρωματομετρική μέθοδος)**

#### **ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ**

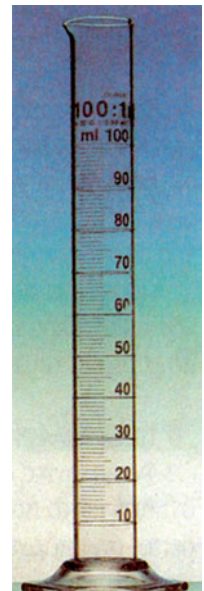
Τα σαλικυλικά αντιδρούν με νιτρικό σίδηρο και παράγουν έγχρωμη ένωση, της οποίας η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με το ποσό των σαλικυλικών.

#### **ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ**

- Σωληνάρια πλαστικά μιας χρήσης, μικρά, ύψους περίπου 5 cm, ή γυάλινα καθαρά (επιμελώς πλυμένα).
- Έδρανο στήριξης (στατώ) σωληναρίων.
- Πιπέτες αυτόματες, κατά προτίμηση ρυθμιζόμενες, με διαφορετικό εύρος.
- Ρύγχη (tips) πλαστικά για τις αυτόματες πιπέτες.
- Γυάλινες πιπέτες με το κατάλληλο πουάρ.
- Κυβέτες πλαστικές πλάτους 1 cm, καθαρές.
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 100 mL.
- Γυάλινα χωνιά.
- Parafilm.
- Γάντια και υαλογράφος.
- Ανακινήτης σωληναρίων (Vortex).
- Φωτόμετρο αυτόματο.



8.15 Parafilm



8.14 Ογκομετρικός κύλινδρος των 100 mL

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Νιτρικό οξύ 0,07 M (4,7ο/οο π.  $\text{HNO}_3$ , Ε.Β. 1,42).
2. Νιτρικός σίδηρος 1% ( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  σε 0,07 M  $\text{HNO}_3$ ).
3. Πρότυπο διάλυμα σαλικυλικών (10 mg/dL σαλικυλικό οξύ).
4. Απεσταγμένο νερό.

## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Για την παρασκευή του προς χρήση αντιδραστήριου νιτρικού οξέος ( $\text{HNO}_3$ ), αραιώνουμε 5 όγκους του αντιδραστήριου (1) με 4 όγκους απεσταγμένου νερού στον ογκομετρικό κύλινδρο με τη χρήση του γυάλινου χωνιού.
- Για την παρασκευή του προς χρήση αντιδραστήριου νιτρικού σιδήρου αραιώνουμε 5 όγκους του αντιδραστήριου (2) με 4 όγκους απεσταγμένου νερού στον ογκομετρικό κύλινδρο με τη χρήση του γυάλινου χωνιού.

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Με πιπέττα βάζουμε στα σωληνάρια:

	<b>E</b>	<b>TE</b>	<b>ST</b>	<b>TST</b>
<b>Ορός</b>	0,5 mL	0,5 mL	—	—
<b>Πρότυπο</b>	—	—	0,5 mL	0,5 mL
<b>Νιτρικός <math>\text{Fe}^{3+}</math></b>	5 mL	—	5 mL	—
<b><math>\text{HNO}_3</math></b>	—	5 mL	—	5 mL

- Ανάμειξη των σωληναρίων.
- Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων στις αντίστοιχες κυβέττες.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 530 nm.

Πρώτα γίνεται η μέτρηση της απορρόφησης για το εξεταστέο (E), αφού προηγηθεί ο μηδενισμός του φωτομέτρου με το τυφλό εξεταστέο (TE). Μετά γίνεται η μέτρηση της απορρόφησης για το πρότυπο (ST) αφού προηγηθεί ο μηδενισμός του φωτομέτρου με το τυφλό Standard (TST).

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

$$C \text{ σαλικυλικών σε mg / dL} = C_{(st)} \times \frac{A_{(εξ)}}{A_{(st)}}$$

## ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ)

Σε θεραπευτικές δόσεις: μέχρι 25 mg/dL.

Δηλητηρίαση: πάνω από 40 mg/dL.



## 8.6 ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

### 8.6.1 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

**Καρκινικοί δείκτες** (tumor markers) ονομάζονται ουσίες που βρίσκονται στα ανθρώπινα βιολογικά υγρά και των οποίων ο προσδιορισμός στο αίμα συμβάλλει στη διάγνωση, στην πρόγνωση και στην παρακολούθηση της πορείας μιας νεοπλασματικής νόσου (καρκίνου).

Αναφέρονται και ως **βιοχημικοί δείκτες καρκίνου** ή **βιολογικοί δείκτες όγκων**. Οι ουσίες αυτές παράγονται είτε από καρκινικά κύτταρα και εκκρίνονται στο αίμα, είτε από φυσιολογικούς ιστούς ως απάντηση στην εισβολή καρκινικών κυττάρων.

Οι περισσότεροι καρκινικοί δείκτες (με εξαίρεση 3-4 από αυτούς) δεν έχουν μεγάλη ειδικευση, δηλ. δεν μας παραπέμπουν αποκλειστικά σε συγκεκριμένες βλάβες του οργανισμού μας. Δίνουν όμως πολύτιμες πληροφορίες για την πορεία της νόσου καθώς και για τα αποτελέσματα της θεραπευτικής αγωγής. Ακόμη η ανίχνευσή τους συμβάλλει στην έγκαιρη διάγνωση διαφόρων μορφών καρκίνου.

#### ΕΙΔΗ ΔΕΙΚΤΩΝ

Οι καρκινικοί δείκτες είναι πρωτεϊνικής σύστασης και περιλαμβάνουν: ένζυμα, ισοένζυμα, αντιγόνα, ορμόνες, γλυκοπρωτεΐνες κ.λπ.

Τους σημαντικότερους από αυτούς τους διακρίνουμε στις παρακάτω κατηγορίες:

- 1. Ογκοεμβρυϊκά αντιγόνα:** CEA, AFP.
- 2. Ορμόνες:** Καλσιτονίνη, β-χοριακή γοναδοτροπίνη, σεροτονίνη, κατεχολαμίνες κ.ά.
- 3. Ένζυμα:** Αλκαλική φωσφατάση και ισοένζυμά της, προστατική όξινη φωσφατάση, ισοένζυμο BB της κινάσης της κρεατίνης, γ-GT κ.ά.
- 4. Γλυκοπρωτεΐνες:** Διάφορα υδατανθρακικά αντιγόνα (C.A.), το ειδικό προστατικό αντιγόνο(PSA) κ.ά.

### 8.6.2 ΕΙΔΗ ΚΑΙ ΣΚΟΠΙΜΟΤΗΤΑ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ

*(Οι Σημαντικότεροι καρκινικοί δείκτες και η διαγνωστική τους αξία)*

#### **A) AFP: ΑΛΦΑ ΦΕΤΟΠΡΩΤΕΪΝΗ** (α- Fetoprotein) ή **ΑΛΦΑ ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ**

Είναι γλυκοπρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους. Παράγεται στο ήπαρ του εμβρύου και στο λεκίθιο ασκό. Σχεδόν απουσιάζει εντελώς στους ενήλικες.

**Αύξήσή** της παρατηρείται κυρίως στον **καρκίνο του ήπατος** (ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα), αλλά και στον καρκίνο των όρχεων (τεράτωμα).

Τιμές αναφοράς (φυσιολογικές τιμές): <10 ng/mL ορού.

### **B) CEA: ΚΑΡΚΙΝΟΕΜΒΡΥΪΚΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ (Carcinoembryonic Antigen)**

Είναι γλυκοπρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους. Συντίθεται στο γαστρεντερικό σωλήνα, το ήπαρ και το πάγκρεας του εμβρύου. Φυσιολογικά βρίσκεται σε ελάχιστη ποσότητα στους ενήλικες.

Παράγεται κυρίως από **καρκίνους του γαστρεντερικού σωλήνα** (παχέος εντέρου, στομάχου) αλλά και σε καρκίνους μαστού, πνεύμονα, θυρεοειδή κ.λπ. Αυξημένες τιμές βρίσκονται στο αίμα των καπνιστών.

Τιμές αναφοράς (φυσιολογικές τιμές): < 5 ng/mL ορού.

### **Γ) β-HCG: β-ΧΟΡΙΑΚΗ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΗ (Human Chorionic Gonadotropin)**

Η β-HCG είναι ορμόνη η οποία συντίθεται στα κύτταρα του πλακούντα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Εμφανίζεται και ανιχνεύεται στο αίμα και στα ούρα της εγκύου. Ο προσδιορισμός της χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της εγκυμοσύνης και την παρακολούθηση της πορείας της.

Η αξία της ως καρκινικού δείκτη είναι ότι η β-HCG εμφανίζεται κυρίως στα άτομα με **χοριοκαρκίνωμα**, αλλά και σε καρκίνο των ωοθηκών, του μαστού, των όρχεων κ.λπ.

### **Δ) PSA: ΕΙΔΙΚΟ ΠΡΟΣΤΑΤΙΚΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ (Prostatic Special Antigen)**

Είναι ιδιαίτερα σημαντική εξέταση στη διάγνωση του **καρκίνου του προστάτη** και των μεταστάσεων του στα οστά. Μαζί με την όξινη προστατική φωσφατάση (PAP), τις απεικονιστικές μεθόδους και την κλινική εξέταση μας δίνουν πλήρη εικόνα για την ασθένεια.

Είναι δυνατόν να αυξηθεί το PSA και στην υπερτροφία του προστάτη καθώς και στην προστατίτιδα.

Τιμές αναφοράς (φυσιολογικές τιμές): < 4 ng/mL ορού.

### **Ε) C.A.: ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΙΚΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ (Carbohydrate Antigens)**

Είναι γλυκοπρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους. Κυριότερα από αυτά τα αντιγόνα είναι τα παρακάτω:

- **CA-15.3**, αυξάνεται κυρίως σε καρκίνο του μαστού.  
Τιμές αναφοράς: <30 U/mL.
- **CA-19.9**, αυξάνεται κυρίως σε καρκίνο του παγκρέατος και γαστρεντερικού σωλήνα.  
Τιμές αναφοράς: <37 U/mL.
- **CA-125**, αυξάνεται κυρίως σε καρκίνο των ωοθηκών.  
Τιμές αναφοράς: <35 U/mL.
- **CA-50**, αυξάνεται κυρίως σε καρκίνο του παγκρέατος.  
Τιμές αναφοράς: <20 U/mL.

Οι περισσότεροι CA δείκτες δεν είναι ειδικοί για συγκεκριμένο ιστό ή όγκο. Εξαιρέση αποτελεί ο CA-125.

## ΣΤ) ΑΛΛΟΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Προσδιορισμοί ουσιών που αναφέρονται ως καρκινικοί δείκτες είναι μεταξύ των άλλων και οι παρακάτω:

- **NSE:** Ειδική νευρωνική ενολάση (Neuron-specific-enolase).
- **MCA:** Βλεννομιμητικό καρκινικό αντιγόνο (Mucinous-like carcinoma associated antigen).
- **TPA:** Πολυπεπτιδικό αντιγόνο ιστών (Tissue polypeptide antigen).
- **TPS:** Ειδικό πολυπεπτιδικό αντιγόνο ιστών
- **SCC:** Αντιγόνο καρκίνου πλακώδους επιθηλίου (Squamous carcinoma cell)
- **Διάφορα** ογκογονίδια

### 8.6.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Ανάλογα με τη χημική σύσταση του καθενός καρκινικού δείκτη, εφαρμόζονται στο εργαστήριο αντίστοιχες μέθοδοι για τον προσδιορισμό τους:

Α) Τα ένζυμα προσδιορίζονται με τις κινητικές μεθόδους που ήδη έχουμε αναφέρει.

Β) Τα ισόένζυμα διαχωρίζονται με την ηλεκτροφόρηση.

Γ) Οι ορμόνες προσδιορίζονται με ραδιοανοσολογική μέθοδο (RIA ή IRMA), με ανοσο-ενζυμική μέθοδο (ELISA ή EIA) ή με χημειοφωταύγεια.

Δ) Τα αντιγόνα ανιχνεύονται με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA ή EIA), νεφελομετρία και ανοσοφθορισμό.

Οι αρχές αυτών των μεθόδων αναφέρθηκαν σε προηγούμενα κεφάλαια.

Οι προσδιορισμοί των δεικτών στο αίμα έχουν φέρει σε δεύτερη μοίρα τις κυτταρολογικές εξετάσεις σε υλικά βιοψίας γιατί αυτοί (οι προσδιορισμοί καρκινικών δεικτών) είναι ευκολότεροι, ταχύτεροι, είναι εύκολη η λήψη δείγματος και τέλος μπορούν να επαναλαμβάνονται καθημερινά ή όποτε χρειαστεί.



8.16 Ψυχόμενη φυγόκεντρος συσκευή



8.17 Σωληνάκια μικροφυγοκέντρου



8.18 Κρυσταλλίδια

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### ΝΑ ΜΗΝ ΞΕΧΝΩ

- Ο **σίδηρος**, ένα πολύ σημαντικό μέταλλο, είναι σε αφθονία στον ανθρώπινο οργανισμό και συμμετέχει σε πολλές ζωτικές λειτουργίες του οργανισμού μας. Το μεγαλύτερο ποσό του βρίσκεται στην αιμοσφαιρίνη. Το υπόλοιπο στις «αποθήκες σιδήρου». Στο πλάσμα βρίσκεται ένα πολύ μικρό ποσό. Σημαντικές ενώσεις στο πλάσμα που μεταφέρουν σίδηρο είναι η τρανσφερρίνη και η φερριτίνη. Ολική σιδηροσυνδετική ή σιδηροδεσμευτική ικανότητα του ορού (Τ.Ι.Β.С), είναι η ικανότητα της ελεύθερης τρανσφερρίνης να δεσμευτεί από επιπλέον σίδηρο. Οι προσδιορισμοί σιδήρου και Τ.Ι.Β.С στον ορό γίνονται με χρωματομετρικές μεθόδους. Πρέπει απαραίτητα να αποφεύγουμε την αιμόλυση.
- Οι **βιταμίνες** είναι ουσίες που βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες στην τροφή των ανθρώπων και των ζώων και είναι απαραίτητες για την διατήρησή τους, στη ζωή και για την ανάπτυξή τους. Οι βιταμίνες δεν βιοσυντίθενται στον ανθρώπινο οργανισμό και η λήψη τους γίνεται μόνο μέσω των τροφών ή με την μορφή φαρμακευτικών σκευασμάτων.
- Οι **ορμόνες** είναι χημικές ουσίες που εκκρίνονται από ιστούς ή όργανα και μεταφέρονται με την κυκλοφορία σε άλλα όργανα όπου και επάγουν (διεγείρουν, αναστέλλουν ή ρυθμίζουν) συγκεκριμένες δραστηριότητες.  
Οι ιστοί ή τα όργανα που εκκρίνουν μια ή περισσότερες ορμόνες ονομάζονται ενδοκρινείς αδένες. Οι προσδιορισμοί των ορμονών βασίζονται σε τεχνικές που χρησιμοποιούν ως αρχή την αντίδραση αντιγόνου αντισώματος (RIA, ELISA, χημιοφωταύγεια).
- Το **E.N.Y.** παράγεται στον εγκέφαλο, γεμίζει τον υπαραχνοειδή χώρο, τις κοιλίες του εγκεφάλου και τον κεντρικό σωλήνα του νωτιαίου μυελού. Η λήψη του γίνεται με οσφυονωτιαία παρακέντηση. Πρέπει να εξετάζεται χωρίς καθυστέρηση και να αποφεύγεται η μόλυνσή του. Εξετάζονται οι φυσικοί χαρακτήρες, η μορφή και ο αριθμός των κυττάρων, το λεύκωμα και η γλυκόζη.
- Οι προσδιορισμοί **φαρμάκων και δηλητηρίων** στο αίμα μας ενδιαφέρουν στις δηλητηριάσεις και στις θεραπευτικές χορηγήσεις. Το μέρος της κλινικής χημείας που ασχολείται με τον προσδιορισμό φαρμάκων και γενικά τοξικών ουσιών στα βιολογικά υγρά του ανθρώπου, και κυρίως στο αίμα, ονομάζεται κλινική τοξικολογία. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν σήμερα οι μετρήσεις αλκοόλ και τοξικών ουσιών.
- **Καρκινικοί δείκτες** ονομάζονται ουσίες που βρίσκονται στα βιολογικά υγρά και των οποίων ο προσδιορισμός στο αίμα συμβάλλει στη διάγνωση, στην πρόγνωση και στην παρακολούθηση της πορείας μιας νεοπλασματικής νόσου. Παράγονται είτε από καρκινικά κύτταρα και εκκρίνονται στο αίμα, είτε από φυσιολογικούς ιστούς ως απάντηση στην εισβολή καρκινικών κυττάρων. Οι περισσότεροι δεν έχουν μεγάλη ειδικευση. Είναι ορμόνες, ένζυμα, ισoenζυμα, αντιγόνα, γλυκοπρωτεΐνες κ.ά.

**ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ****ΘΕΩΡΙΑ**

1. Ποια είναι η κατανομή του σιδήρου στον οργανισμό μας;
2. Πού μεταφέρεται ο σίδηρος μέσω της τρανφερίνης;
3. Τι είναι η T.I.B.C.;
4. Τι είναι οι «αποθήκες σιδήρου»;
5. Σε ποιες περιπτώσεις αυξομειώνεται ο σίδηρος του ορού;
6. Πώς παράγεται και πού βρίσκεται το E.N.Y.;
7. Περιγράψτε τους φυσικούς χαρακτήρες του E.N.Y.
8. Ποια η σκοπιμότητα των μετρήσεων φαρμάκων και δηλητηρίων στο αίμα;
9. Τι είναι ο χρόνος ημιζωής ενός φαρμάκου;
10. Τι είναι οι καρκινικοί δείκτες;
11. Ποια είναι οι κατηγορίες των καρκινικών δεικτών και ποιες οι σημαντικότερες ουσίες σ' αυτές;
12. Τι είναι οι βιταμίνες και πώς διαιρούνται;
13. Αναφέρετε τις κυριότερες βιταμίνες και τη βιοχημική τους δράση στον οργανισμό.
14. Με ποιο μηχανισμό δρουν οι ορμόνες στα κύτταρα στόχους;
15. Αναφέρετε τις σημαντικότερες ορμόνες και τους αδένες από τους οποίους αυτές παράγονται.

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

1. Ποιες προφυλάξεις παίρνουμε στη λήψη δειγμάτων αίματος για προσδιορισμό σιδήρου και T.I.B.C.;
2. Τι προσέχουμε ιδιαίτερα στους προσδιορισμούς σιδήρου και T.I.B.C.;
3. Ποιες εργαστηριακές εξετάσεις περιλαμβάνει η χημική εξέταση του E.N.Y.;
4. Ποιες μέθοδοι χρησιμοποιούνται σήμερα για τους προσδιορισμούς φαρμάκων και δηλητηρίων;
5. Ποιες μέθοδοι χρησιμοποιούνται στα εργαστήρια για τους προσδιορισμούς των καρκινικών δεικτών;
6. Ποια η αρχή της μεθόδου ELISA;
7. Ποια η αρχή της μεθόδου RIA;
8. Περιγράψτε τη μέθοδο Sandwich ELISA.

**Αγαμμασφαιριναιμία.** Η πλήρης έλλειψη γ - σφαιρινών (ανοσοσφαιρινών).

**Αιμορροφιλία Α.** Η κλασική αιμορροφιλία είναι μία κληρονομική φιλοσύνδετη αιμορραγική διαταραχή που οφείλεται σε βλάβη ή έλλειψη του παράγοντα VIII της πήξης.

**Αιμορροφιλία Β.** Φυλοσύνδετη υπολειπόμενη αιμορραγική νόσος, που χαρακτηρίζεται από μείωση της πήκτικης δραστηριότητας του παράγοντα IX της πήξης.

**Αιμοσιδήρωση.** Κατάσταση που προκαλείται από την εναπόθεση σιδήρου σε ζωτικά όργανα, όπως είναι το ήπαρ και η καρδιά, με τις επακόλουθες διαταραχές της λειτουργίας των οργάνων αυτών. Παρατηρείται σε ασθενείς που χρειάζονται χρόνιες μεταγγίσεις αίματος, όπως σε άτομα με θαλασσαιμία.

**Αιμοχρωμάτωση.** Υπερφόρτωση του οργανισμού σε σίδηρο είτε λόγω κληρονομικής διαταραχής είτε επίκτητα.

**Αμινοξέα.** Παράγωγα λιπαρών οξέων, στα οποία ένα άτομο υδρογόνου έχει αντικατασταθεί με την αμινική ομάδα (-NH<sub>2</sub>).

**AMP.** Αδενοσινικό - 5' - φωσφορικό οξύ (Αδενυλικό οξύ)

**dAMP.** Δεοξυαδενοσινικό - 5' - φωσφορικό οξύ (Δεοξυαδενυλικό οξύ)

**ADP.** Αδενοσινικό - 5' - διφωσφορικό οξύ

**dADP.** Δεοξυαδενοσινικό - 5' - διφωσφορικό οξύ

**ATP.** Αδενοσινικό - 5' - τριφωσφορικό οξύ

**Αναβολισμός.** Σκέλος του μεταβολισμού κατά το οποίο γίνεται σύνθεση ουσιών από απλούστερες με κατανάλωση συνήθως ενέργειας.

**Αναγωγικές ουσίες.** Ουσίες που μπορούν να προκαλέσουν αναγωγή. Αναγωγή είναι η πρόσληψη υδρογόνου ή η αποβολή οξυγόνου, γενικότερα η μείωση αριθμού οξειδωσης ατόμου.

**Απαμίνωση.** Η αφαίρεση της αμινομάδας (-NH<sub>2</sub>) των αμινοξέων με τη δράση ενζύμων (γλουταμική δεϋδρογονάση, οξειδάση L- αμινοξέων, δεϋδρατάσες).

**Άποιος διαβήτης.** Πολυουρική κατάσταση, που οφείλεται στη μερική ή ολική έλλειψη της αντιδιουρητικής ορμόνης (ADH).

**Γαλακτωματοποίηση.** Ο καταμερισμός των λιπών σε πολύ μικρά σταγονίδια. Η γαλακτωματοποίηση των λιπών της τροφής επιτυγχάνεται με τη μηχανική ανάμειξη από τις κινήσεις στομάχου – λεπτού εντέρου και την απορροπτική δράση αρκετών παραγόντων, όπως είναι τα χολικά άλατα και τα προϊόντα της μερικής υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων.

**Γλυκοαιμοσφαιρίνη.** Οι γλυκοαιμοσφαιρίνες είναι παράγωγα μη ενζυμικής γλυκοσυλίωσης της αιμοσφαιρίνης Α και περιέχουν ομοιοπολικά συνδεδεμένο υδατάνθρακα ή φωσφορικό μονοσακχαρίτη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η HbA<sub>1c</sub>, η περιοδική μέτρηση της οποίας χρησιμεύει στην παρακολούθηση διαβητικών ασθενών.

**Γλυκογόνο.** Είναι ο πολυσακχαρίτης των ζώων. Βρίσκεται κυρίως στους μύς και στο ήπαρ. Αποτελείται από μόρια α - D - γλυκόζης συνδεδεμένα με δεσμούς α (1 - 4) και με διακλαδώσεις α (1 - 6) κάθε 8 - 12 μονάδες γλυκόζης.

**Γλυκοπρωτεΐνες.** Πρωτεΐνες στις οποίες συνδέονται ομοιοπολικά υδατάνθρακες.

**Διαβητική οξέωση.** (Βλέπε Διαβητικό κώμα)

**Διαβητικό κώμα.** Στο μη ελεγχόμενο σακχαρώδη διαβήτη παρατηρείται υπερβολική κινητοποίηση λιπαρών οξέων από το λιπώδη ιστό και αμινοξέων από τους σκελετικούς μυς με προώθηση της κετογένεσης και γλυκονοογένεσης στο ήπαρ. Με αποτέλεσμα η παραγωγή κετονοσωμάτων να είναι μεγαλύτερη από όση οι διάφοροι ιστοί μπορούν να χρησιμοποιήσουν και να καταναλώσουν (κέτωση). Η κέτωση οδηγεί σε μεταβολική οξέωση και τελικά σε κώμα.

**Διαπίδυση** (dialysis). (Βλέπε υπερδιήθηση).

**Διαφορική διάγνωση.** Είναι η διάγνωση (αναγνώριση) μιας νόσου ή πάθησης μεταξύ δύο ή περισσότερων νόσων ή παθήσεων που εμφανίζουν παρόμοια κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα. Η διαφορική διάγνωση επιτυγχάνεται με στάθμιση, ερμηνεία και συσχέτιση των στοιχείων της νόσου, τα οποία προκύπτουν από το ιστορικό του ασθενή, από τα συμπτώματα και τα σημεία της νόσου, από τη φυσική εξέταση του ασθενή και από τις ειδικές κάθε φορά εργαστηριακές εξετάσεις.

**Ενεργητική σωληναριακή έκκριση.** Στην ενεργητική σωληναριακή έκκριση στους νεφρούς η μεταφορά ουσιών στο σωληναριακό υγρό γίνεται με δαπάνη ενέργειας.

**Εστεροποίηση.** Η αντίδραση μεταξύ οξέος και αλκοόλης προς σχηματισμό εστέρα και νερού.

**Ηπατίτιδα.** Η φλεγμονή του ήπατος. Η ιογενής ηπατίτιδα αιτιολογικώς προκαλείται από πέντε ιούς Α, Β, C, D, E, και πιθανώς και έκτο G με ειδικά επιδημιολογικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά.

**Ηπατοχολική απόφραξη.** (Βλέπε Χολόσταση ενδοηπατική και εξωηπατική)

**Καμπύλη αναφοράς.** Είναι ένα διάγραμμα που κατασκευάζεται με συντεταγμένες την απορροφητικότητα και τη συγκέντρωση γνωστών συγκεντρώσεων της ουσίας που θέλουμε να προσδιορίσουμε και επιτρέπει τον υπολογισμό της ουσίας αυτής σε ένα βιολογικό υγρό.

**Καροτένια.** Τα καροτένια α, β και γ αποτελούν πρόδρομες ουσίες της βιταμίνης Α και ανήκουν στα τερπενοειδή.

**Καταβολισμός.** Σκέλος του μεταβολισμού κατά το οποίο γίνεται διάσπαση σύνθετων ουσιών σε απλούστερες, με απελευθέρωση συνήθως ενέργειας.

**Cut – off point.** Το κατώτερο ανιχνεύσιμο ποσό μιας ουσίας σε βιολογικά υγρά με διάφορες μεθόδους (βιοχημικές, ενζυμικές, ραδιοϊσοτοπικές κ.λ.π) που αποτελεί το λεγόμενο σημείο διαχωρισμού.

**Κετοξέα.** Είναι ενώσεις που περιέχουν στο μόριό τους καρβοξυλική ομάδα (- COOH) και κετονική ομάδα (> CO).



**Κίρρωση ήπατος.** Ο ορός κίρρωση χρησιμοποιείται για να περιγραφεί ένα διάχυτο νόσημα του ήπατος, που χαρακτηρίζεται από τρία βασικά ιστολογικά ευρήματα, τα οποία είναι η ίνωση, η ηπατοκυτταρική νέκρωση και η διαταραχή της αρχιτεκτονικής υφής του ήπατος εξαιτίας της ανάπτυξης αναγεννητικών όζων. Οι παραπάνω ανατομικές διαταραχές δημιουργούν ένα είδος ενδοηπατικής απόφραξης στο σύστημα της πυλαίας κυκλοφορίας, που έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση πυλαίας υπέρτασης.

**Κλίβανος υβριδισμού.** Θερμοστατούμενος θάλαμος με ειδικούς ανακινούμενους κυλίνδρους για υβριδισμό φίλτρων με νουκλεϊνικά οξέα και πρωτεΐνες.

**Κύκλος του Krebs.** Είναι μία κυκλική αλληλουχία αντιδράσεων, που αποτελούν τον τελικό κοινό δρόμο οξειδωσης των διάφορων μορίων – καυσίμων, τα οποία προέρχονται από τη γλυκόζη, τα αμινοξέα και τα λιπαρά οξέα. Τα περισσότερα μόρια – καύσιμα εισέρχονται στον κύκλο μέσω του ακετυλοσυνενζύμου Α. Οι αντιδράσεις του κύκλου του Krebs ή κύκλου του κιτρικού οξέος γίνονται μέσα στα μιτοχόνδρια. Ο ρόλος του κύκλου δεν είναι αποκλειστικά καταβολικός. Έτσι, ενώσεις του κύκλου μετέχουν σε αναβολικούς δρόμους, όπως στη γλυκονεογένεση, στη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και στη βιοσύνθεση της αίμης.

**Κύτταρα Kupffer.** Τα αστεροειδή κύτταρα (Kupffer) των πυλαίων τριχοειδών του ήπατος ανήκουν στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα και χρησιμεύουν για την άμυνα του οργανισμού.

**Λευχαιμίες.** Κακοήθεις νεοπλασίες των άωρων κυττάρων του αίματος. Τα νεοπλασματικά κύτταρα διατηρούν την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους αλλά έχουν απωλέσει σε μεγάλο βαθμό την ιδιότητα να μετατρέπονται σε ωριμότερες κυτταρικές μορφές. Αυτό είναι το χαρακτηριστικό διαγνωστικό σημείο των οξειών λευχαιμιών.

**Λέμφωμα Hodgkin.** Νεοπλασία που εμφανίζεται αρχικά στους περιφερικούς λεμφαδένες και στη συνέχεια επεκτείνεται σε άλλες ομάδες λεμφαδένων. Είναι δηλαδή κακοήθες νεόπλασμα του λεμφικού ιστού.

**Λήκυθος του Vater.** Ο χοληδόχος πόρος, που αποτελεί το τελικό τμήμα της εκφορητικής οδού του ήπατος, εκβάλλει τελικώς στο φύμα του Vater στο δωδεκαδάκτυλο συνήθως με κοινό στόμιο με τον μείζονα πόρο του παγκρέατος. Έτσι πριν από την κοινή εκβολή των πόρων αυτών σχηματίζεται ανεύρυσμα που καλείται λήκυθος του Vater.

**Λιθίαση χοληφόρων οδών (Χολολιθίαση).** Είναι η παρουσία λίθων στη χοληδόχο κύστη. Η πλειονότητα των λίθων είναι από χοληστερίνη (χοληστερινικοί χολόλιθοι). Επίσης υπάρχουν χολόλιθοι από χολερυθρίνη (χολερυθρινικοί χολόλιθοι). Η χολολιθίαση γενικά είναι συχνότερη στις γυναίκες σε σύγκριση με τους άνδρες. Η συχνότητά της αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας.

**Λοιμώδης μονοπυρήνωση.** Οξεία λοιμώδης νόσος με κύριες εκδηλώσεις τον πυρετό και τη διόγκωση των λεμφαδένων και του σπλήνα. Στο περιφερικό αίμα των πασχόντων

ανευρίσκονται χαρακτηριστικά «άτυπα» λεμφοκύτταρα. Η νόσος προκαλείται από ερπητοϊό των Ebstein – Barr.

**Λυοφιλοποίηση.** Η γρήγορη κατάψυξη και αφυδάτωση βιολογικής ουσίας σε κενό.

**Μεσογειακή αναιμία.** Στα θαλασσαιμικά σύνδρομα ή Μεσογειακή αναιμία υπάγεται ομάδα κληρονομικών διαταραχών, με κύριο χαρακτηριστικό τη μείωση σε ποικίλο βαθμό της παραγωγής μιας ή περισσότερων σφαιρινικών αλύσων της αιμοσφαιρίνης. Ο όρος θαλασαιμία χρησιμοποιήθηκε αρχικώς για να δηλώσει την αναιμία που παρατηρείται στους λαούς της Μεσογείου. Σήμερα ο όρος χρησιμοποιείται για την αναφορά στις ποσοτικές κληρονομικές διαταραχές της βιοσύνθεσης των σφαιρινικών αλύσων της αιμοσφαιρίνης.

**Μονοκλωνικά αντισώματα.** Είναι ανοσοσφαιρίνες που παράγονται από ένα μοναδικό κλώνο κυττάρων της σειράς των Β – λεμφοκυττάρων, όταν ένα Β – λεμφοκύτταρο εμφανίσει ανώμαλο και αρρύθμιστο πολλαπλασιασμό και τα θυγατρικά κύτταρα διατηρήσουν την ικανότητά τους να συνθέτουν την ανοσοσφαιρίνη που είναι προορισμένα να παράγουν.

**Μεταβολισμός.** Η απώληση και η χρήση ενέργειας μέσα στα κύτταρα εκπληρώνονται από ένα πολύπλοκο δίκτυο χημικών αντιδράσεων που το σύνολό τους ονομάζουμε μεταβολισμό ή ενδιάμεσο μεταβολισμό. Ο όρος καταβολισμός χαρακτηρίζει τις αντιδράσεις του μεταβολισμού που οδηγούν σε αποδόμηση ουσιών, ενώ αναβολισμός δηλώνει μεταβολικές δραστηριότητες σύνθεσης ουσιών.

**Μυϊκές δυστροφίες.** Κληρονομικές μυϊκές παθήσεις με προοδευτική εξέλιξη, ίδιες παθολογοανατομικές διαφορές και ξεχωριστές κλινικές εικόνες. Η πιο συχνή μυϊκή δυστροφία είναι του Duchenne. Χαρακτηρίζεται κλινικά από προοδευτική μυϊκή αδυναμία. Τα τυπικά συμπτώματα αρχίζουν μεταξύ 2 - 4 ετών με καθυστέρηση έναρξης της βόδισης. Τα άτομα συνήθως καταλήγουν από καρδιακή ανεπάρκεια ή πνευμονία στην ηλικία των 25 ετών.

**Μυοσφαιρίνη.** Αποτελείται από μία πολυπεπτιδική άλυσσο με 153 αμινοξέα και από ένα μόριο αίμης. Μπορεί να δεσμεύει και να αποδεσμεύει οξυγόνο. Βρίσκεται στο μυϊκό ιστό, όπου χρησιμεύει ως αποθήκη οξυγόνου.

**NAD<sup>+</sup>.** Νικοτιναμιδοαδενινουκλεοτίδιο (οξειδωτική μορφή)

**NADP<sup>+</sup>.** Φωσφορικό νικοτιναμιδοαδενινουκλεοτίδιο (οξειδωτική μορφή)

**NADH.** Νικοτιναμιδοαδενινουκλεοτίδιο (αναγωγική μορφή)

**NADPH.** Φωσφορικό νικοτιναμιδοαδενινουκλεοτίδιο (αναγωγική μορφή)

**Νεφρική ανεπάρκεια.** Αιφνίδια ελάττωση της νεφρικής λειτουργίας που έχει ως αποτέλεσμα την κατακράτηση των αζωτούχων καταλοίπων του μεταβολισμού (ουρία, κρεατινίνη, ουρικό οξύ). Η οξεία νεφρική ανεπάρκεια συχνά αναφέρεται και ως οξεία σωληναριακή νέκρωση. Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια είναι σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από βαθμιαία μείωση της νεφρικής λειτουργίας.

**Νόσος του Addison.** Πρωτοπαθής ανεπάρκεια του φλοιού των επινεφριδίων.

**Νόσος του Paget.** Παλαιότερα γνωστή ως παραμορφωτική οστεΐτιδα. Αποτελεί εντοπισμένη διαταραχή της οστικής ανακατασκευής. Χαρακτηρίζεται από υπέρμετρη οστεοκλαστική δραστηριότητα στα αρχικά στάδια, με αποτέλεσμα οστική απορρόφηση. Ακολουθεί μεγάλη αύξηση της οστεοβλαστικής δραστηριότητας και αυξημένη παραγωγή μη φυσιολογικού, μη ανθεκτικού οστού, το οποίο υφίσταται παραμορφώσεις και κατάγματα.

**Νουκλεοσίδια.** Γλυκοσιδικές ενώσεις της ριβόζης ή της 2 – δεοξυ – D – ριβόζης με τις αζωτούχες βάσεις της πουρίνης (αδενίνη και γουανίνη) και της πυριμιδίνης (κυτοσίνη, ουρακίλη, θυμίνη).

**Ομοιόσταση.** Η διατήρηση της συγκέντρωσης των διάφορων ουσιών του αίματος μέσα σε σχετικά περιορισμένα φυσιολογικά όρια. Ο οργανισμός αντιδρά στα ερεθίσματα, τα οποία μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση κάποιου συστατικού του σώματος προκαλούν την έναρξη μιας σειράς δράσεων, που τείνουν να επαναφέρουν τη συγκέντρωση του συστατικού αυτού μέσα στα φυσιολογικά όρια.

**Οξεία παγκρεατίτιδα.** Οξεία φλεγμονή του παγκρέατος. Η αμυλάση του ορού είναι η πιο συχνή εξέταση στη διάγνωση της οξείας παγκρεατίτιδας.

**Οξειδωση.** Η πρόσληψη οξυγόνου ή η αποβολή υδρογόνου, γενικότερα η αύξηση αριθμού οξειδωσης ατόμου.

**Ουριοτελικά ζώα.** Τα ζώα στα οποία το κύριο τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πρωτεϊνών είναι η ουρία.

**Οστεοπόρωση.** Ελάττωση της οστικής μάζας, όταν δεν υπάρχουν άλλες αναγνωρίσιμες αιτίες οστεοπενίας. Η ελάττωση της οστικής αντοχής που προκύπτει οδηγεί στην αύξηση της πιθανότητας σκελετικών καταγμάτων, ιδιαίτερα στο ισχίο, τη σπονδυλική στήλη και τον καρπό.

**Περιτοναϊκή κάθαρση.** Η υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας σε ασθενείς με μεγάλη μείωση της σπειραματικής διήθησης (κάτω από 5 mL / min). Στην περιτοναϊκή κάθαρση η ανταλλαγή ουσιών γίνεται μεταξύ του αίματος των τριχοειδών του περιτοναίου και του αποστειρωμένου διαλύματος, που τοποθετείται στην περιτοναϊκή κοιλότητα με μόνιμο καθετήρα από σιλκόνη.

**Πουρίνη.** Συμπύκνωση πυριμιδινικού και ιμιδαζολικού δακτυλίου. Οι κυριότερες βάσεις της πουρίνης είναι η αδενίνη και η γουανίνη που είναι συστατικά των νουκλεοτιδίων.

**Ρευματοειδής αρθρίτιδα.** Νόσος άγνωστης αιτιολογίας και είναι η πιο συχνή από τα νοσήματα του κολλαγόνου. Χαρακτηρίζεται κυρίως από τη συμμετρική προσβολή των αρθρώσεων, αλλά πολλές φορές προσβάλλει και άλλα συστήματα του οργανισμού.

**Σερουλοπλασμίνη.** Πρωτεΐνη που συνθέτεται στο ήπαρ και κάθε μόριο της μπορεί να συνδέσει έξι άτομα χαλκού. Βοηθά στην ομοίostasη και μεταφορά του χαλκού.

**Shock – Καταπληξία.** Οξεία κυκλοφοριακή ανεπάρκεια, η οποία ανεξάρτητα από την αιτιολογία της οδηγεί σε ανεπαρκή προσφορά των απαραίτητων ουσιών στους ιστούς και σε πλημμελή απομάκρυνση των προϊόντων αποδόμησης του μεταβολισμού. Αν δεν αντιμετωπισθεί έγκαιρα και αποτελεσματικά οδηγεί σε μη ανατρέψιμη δυσλειτουργία των κυττάρων, των ιστών και των οργάνων και τελικά στο θάνατο.

**Σπειραματική διήθηση.** Η κύρια λειτουργία των τριχοειδών αγγείων του αγγειώδους σπειράματος των νεφρών είναι η διήθηση. Ως αποτέλεσμα της διήθησης περίπου 120 ml πλάσματος και διαλυτών ουσιών περνούν κάθε λεπτό από το αίμα στο ουροφόρο σωληνάριο για περαιτέρω επεξεργασία, ενώ παραμένουν στο αίμα οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες του πλάσματος.

**Στεροειδή.** Παράγωγα του περυδροκυκλοπεντανοφαινανθρενίου. Μία χαρακτηριστική ομάδα στεροειδών αποτελούν οι στερόλες. Μια τέτοια στερόλη είναι η χοληστερόλη που συναντάμε σε μεγάλα ποσά στους ζωικούς οργανισμούς.

**Στερόλες.** (βλέπε στεροειδή).

**Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια.** Έτσι χαρακτηρίζεται η καρδιακή ανεπάρκεια στην οποία είναι ιδιαίτερα εμφανή (κλινικά ή απεικονιστικά) τα σημεία συμφόρησης της κυκλοφορίας στους πνεύμονες (π.χ. στάση στις πύλες) ή στην περιφέρεια (π.χ. οιδήματα κάτω άκρων).

**Σύνδρομο Reye.** Είναι μια σοβαρή, συχνά θανατηφόρος, πάθηση της παιδικής ηλικίας. Η διαταραχή αρχίζει με μια οξεία ιογενή λοίμωξη (ανεμοβλογιά, γρίπη) με πυρετό, για την οποία το παιδί παίρνει ασπιρίνη. Μέσα σε δύο ή τρεις ημέρες το παιδί αρχίζει να κάνει εμετό και να παρουσιάζει υπνηλία. Χάνει την επαφή με το περιβάλλον και μπορεί να παρουσιάσει σπασμούς. Σοβαρές διαταραχές προκαλούνται από διόγκωση και εναπόθεση λίπους στο ήπαρ, οίδημα εγκεφάλου και νεφρική βλάβη. ΠΑΙΔΙΑ ΜΕ ΟΠΟΙΑΔΗΠΟΤΕ ΝΟΣΟ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΠΑΙΡΝΟΥΝ ΑΣΠΙΡΙΝΗ.

**Υπερδιήθηση.** Η υπερδιήθηση (ultrafiltration) όπως και η διαπίδυση (dialysis) είναι τεχνικές που χρησιμοποιούν μεμβράνες για να διαχωρίσουν μεγάλα και μικρά διαλυμένα μόρια. Ενώ η διαπίδυση εστιάζει μόνο στο διαχωρισμό διαλυμένων μορίων, η υπερδιήθηση χρησιμοποιείται συχνά στην αφαίρεση ορισμένων ουσιών καθώς και στο διαχωρισμό διαλυμένων μορίων.

**Υπερθυρεοειδισμός.** Υπερλειτουργία του θυρεοειδούς αδένος.

**Υποθυρεοειδισμός.** Υπολειτουργία του θυρεοειδούς αδένος.

**Χοληφόροι οδοί.** Αποτελούν το εκφορητικό μέρος της εξωκρινούς μοίρας του ήπατος. Περιλαμβάνουν τους περιλόβιους χοληφόρους πόρους, που περιβάλλουν το ηπατικό λοβίο και υποδέχονται τα χοληφόρα σωληνάκια και τους μεσολόβιους χοληφόρους πόρους,

που σχηματίζονται από τη συμβολή των περιλόβιων. Οι μεσολόβιοι κατευθύνονται προς τις πύλες του ήπατος, αναστομώνονται μεταξύ τους και τέλος σχηματίζουν δύο μεγάλους χοληφόρους πόρους, το δεξιό και τον αριστερό ηπατικό πόρο, οι οποίοι ενώνονται τελικά και αποτελούν τον κοινό ηπατικό πόρο. Ο τελευταίος αναστομώνεται με τον κυστικό πόρο από τη χοληδόχο κύστη, μαζί με τον οποίο σχηματίζει το χοληδόχο πόρο. Ο χοληδόχος πόρος εκβάλλει τελικό το φύμα του Vater στο δωδεκαδάκτυλο.

**Χολόσταση ενδοηπατική και εξωηπατική.** Προκύπτει από κατακράτηση και συσσώρευση στο αίμα της συζευγμένης (άμεσης) χολερυθρίνης και άλλων συστατικών της χολής λόγω παρεμβολής στη ροή της από την κολποειδική μεμβράνη του χοληφόρου τριχοειδούς μέχρι και την εκβολή του χοληδόχου πόρου στο δωδεκαδάκτυλο. Η χολόσταση διακρίνεται σε εξωηπατική (λίθοι, παράσιτα, όγκοι, κύστεις, στενώσεις) και ενδοηπατική (ιογενής ηπατική νόσος, αλκοολική κίρρωση, φάρμακα, συγγενής νόσος, σαρκοείδωση, αμυλοείδωση, λοιμώξεις από βακτηρίδια, παράσιτα μύκητες, HIV).

**Χοριοκαρκίνωμα.** Ο όρος χοριοκαρκίνωμα φαίνεται ότι έχει αντικαταστήσει τελευταία τον παλαιό όρο χοριοεπιθηλίωμα. Τα κύρια παθολογοανατομικά γνωρίσματα του χοριοκαρκινώματος είναι η διήθηση του τοιχώματος της μήτρας από τροφοβλαστικά κύτταρα, με καταστροφή των ιστών της μήτρας, που συνοδεύονται από νέκρωση και αιμορραγία.

## (Α) ΕΛΛΗΝΙΚΗ

1. Α.Π.Θ., Τμήμα Ιατρικής, Τομέας Παθολογίας, Διευθυντής: Καθηγητής Μ. Παπαδημητρίου, ΕΣΩΤΕΡΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ, University Studio Press, 1998
2. ΑΒΡΑΜΙΔΗΣ ΗΡΑΚΛΗΣ, ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ, Εκδόσεις Zymel, Αθήνα, 1998.
3. ΑΡΣΕΝΗ Α., ΔΕΛΗΓΙΑΝΝΗ Β., ΖΟΥΛΙΕΝ Ζ., ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, 2η Έκδοση, Εκδόσεις Ζήτα, Αθήνα, 1991.
4. ΒΟΡΓΙΑΣ Ν.Ι., ΛΑΟΥΤΑΡΗΣ Ν.Π., ΑΙΜΟΤΟΛΟΓΙΑ, Τόμος Α΄, Ιατρικές Εκδόσεις Αργυρού, Αθήνα, 1991.
5. ΓΕΩΡΓΑΤΣΟΣ Ι.Γ., ΑΡΧΕΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, Θεσσαλονίκη, 1975.
6. ΓΕΩΡΓΑΤΣΟΣ Ι.Γ., ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, Θεσσαλονίκη, 1978.
7. ΔΕΣΥΠΡΗΣ Α., ΑΡΧΕΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, Αθήνα, 1980.
8. ΔΗΜΟΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ Γ.Δ., Ν.Ι. ΒΟΡΓΙΑΣ, ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, Ιατρικές Εκδόσεις Αργυρού, Αθήνα, 2001.
9. ΔΙΑΜΑΝΤΗΣ Ε. Φ., ΣΙΣΚΟΣ Α., ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ-ΔΙΑΜΑΝΤΗ Α., ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, Εκδόσεις ΛΥΧΝΟΣ, Αθήνα, 1987.
10. ΕΚΔΟΤΙΚΗ ΑΘΗΝΩΝ, ΓΕΝΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ, Αθήνα, 1989.
11. ΕΜΜΑΝΟΥΗΛΙΔΗ – ΑΡΣΕΝΗ Α., ΓΕΝΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΥΓΡΩΝ ΚΑΙ ΕΚΚΡΙΜΑΤΩΝ, Αθήνα.
12. ΕΜΜΑΝΟΥΗΛΙΔΟΥ – ΑΡΣΕΝΗ Α., ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, Αθήνα.
13. ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΑΘΗΝΩΝ, ΚΛΙΝΙΚΑ ΦΡΟΝΤΙΣΤΗΡΙΑ – ΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ - τομ. 1, τευχ.2, Αθήνα, 1989.
14. ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΑΘΗΝΩΝ, ΠΡΟΣΦΑΤΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, Αθήνα, 1997
15. ΙΟΡΔΑΝΙΔΗΣ Ι. ΠΡΟΔΡΟΜΟΣ, ΓΕΡΟΧΡΗΣΤΟΥ-ΖΟΡΜΠΑΣ ΑΘ., ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΟΡΓΑΝΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ, Εκδόσεις Ιδρυμ. ΕΥΓΕΝΙΔΟΥ, Αθήνα, 1988.
16. ΙΩΑΝΝΙΔΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ, ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ Ι, ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΓΙΑΧΟΥΔΗ – ΓΙΑΠΟΥΛΗ, Θεσσαλονίκη, 2001.
17. ΙΩΑΝΝΙΔΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ, ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ ΙΙ, ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΓΙΑΧΟΥΔΗ – ΓΙΑΠΟΥΛΗ, Θεσσαλονίκη, 2001.
18. ΙΩΑΝΝΙΔΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ, ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ ΙΙΙ, ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΓΙΑΧΟΥΔΗ – ΓΙΑΠΟΥΛΗ, Θεσσαλονίκη, 2001.
19. ΙΩΑΝΝΙΔΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ, ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ ΙV, ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΓΙΑΧΟΥΔΗ – ΓΙΑΠΟΥΛΗ, Θεσσαλονίκη, 2001.
20. ΚΑΝΝΑΒΑΣ Κ., ΑΓΓΛΟΕΛΛΗΝΙΚΟ ΛΕΞΙΚΟ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΡΩΝ, Εκδόσεις Καρδαμίτσα, Αθήνα, 1976.
21. ΚΑΡΑΜΟΥΖΗΣ ΜΙΧΑΛΗΣ, ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, Θεσσαλονίκη, 1989

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

22. ΚΕΛΕΡΜΕΝΟΣ Ν.Δ., ΑΡΓΥΡΙΟΥ Π.Γ., ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, Αθήνα, 1975.
23. ΚΟΤΣΙΦΑΚΗΣ ΘΕΜΙΣΤΟΚΛΗΣ, ΕΙΔΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ – Γ΄ έκδοση, Εκδόσεις Infomedia, Αθήνα, 1991.
24. Μ. ΠΑΥΛΑΤΟΥ, ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ - (2η έκδοση), Ιατρικές εκδόσεις ΛΙΤΣΑΣ, Αθήνα
25. ΜΠΑΤΡΙΝΟΣ Μ., ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑ, Ιατρικές εκδόσεις ΠΑΣΧΑΛΙΔΗ, Αθήνα, 1982.
26. ΠΑΙΔΑΓΩΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ, ΑΝΑΤΟΜΙΑ – ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ Α΄ ΤΑΞΗΣ ΤΕΕ (ΤΟΜΕΑ ΥΓΕΙΑΣ & ΠΡΟΝΟΙΑΣ), Έκδοση ΟΕΔΒ, Αθήνα, 2000.
27. ΠΑΙΔΑΓΩΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ, ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗΣ (Γ΄ ΤΑΞΗΣ ΕΝΙΑΙΟΥ ΛΥΚΕΙΟΥ), Έκδοση ΟΕΔΒ, Αθήνα, 1999.
28. ΠΑΙΔΑΓΩΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΙ ΟΔΗΓΟΙ ΧΗΜΕΙΑΣ Β΄ & Γ΄ ΤΑΞΗΣ ΕΝΙΑΙΟΥ ΛΥΚΕΙΟΥ, Έκδοση ΟΕΔΒ, Αθήνα, 2000.
29. ΠΑΙΔΑΓΩΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ & ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΟΔΗΓΟΣ Α΄ ΤΑΞΗΣ ΤΕΕ (ΤΟΜΕΑ ΥΓΕΙΑΣ & ΠΡΟΝΟΙΑΣ), Έκδοση ΟΕΔΒ, Αθήνα, 2000.
30. ΠΑΙΔΑΓΩΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ, ΝΟΣΟΛΟΓΙΑ Α΄ ΤΑΞΗΣ ΤΕΕ (ΤΟΜΕΑ ΥΓΕΙΑΣ & ΠΡΟΝΟΙΑΣ), Έκδοση ΟΕΔΒ, Αθήνα, 2000.
31. ΠΑΙΔΑΓΩΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ, ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ Β΄ ΤΑΞΗΣ ΤΕΕ (ΤΟΜΕΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΡΓ. ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ), Έκδοση ΟΕΔΒ, Αθήνα, 1999.
32. ΠΑΙΔΑΓΩΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ, ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ Β΄ ΤΑΞΗΣ ΤΕΕ (ΤΟΜΕΑ ΥΓΕΙΑΣ & ΠΡΟΝΟΙΑΣ), Έκδοση ΟΕΔΒ, Αθήνα, 2000.
33. ΠΑΤΑΡΓΙΑΣ Θ.Α., ΣΕΚΕΡΗΣ Κ.Ε., ΣΕΚΕΡΗ-ΠΑΤΑΡΓΙΑ Κ., ΜΑΡΓΑΡΙΤΗ Λ.Χ., ΛΕΞΙΚΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΟΡΩΝ, Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα, 1992.
34. ΠΡΩΤΟΠΑΠΠΑΣ Ν. ΘΩΜΑΣ, ΕΓΧΕΙΡΙΔΙΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ, 2η ΕΚΔΟΣΗ, ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΓΙΑΧΟΥΔΗ – ΓΙΑΠΟΥΛΗ, Θεσσαλονίκη, 1993.
35. ΣΤΑΣΙΝΟΠΟΥΛΟΣ Π. ΙΩΑΝΝΗΣ, ΕΙΔΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ - ΤΗΡΗΣΗ ΑΡΧΕΙΟΥ (Γ΄ ΤΕΛ), Εκδόσεις Ιδρυμ. ΕΥΓΕΝΙΔΟΥ, Αθήνα, 1989.
36. ΤΡΑΚΑΤΕΛΛΗΣ Α., ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ 2η ΕΚΔΟΣΗ, Γραφ. Τέχνες Γ.Δεδούση, 1999

### (B) ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΑΠΟ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

1. KING J. EARL - WOOTON I.D.P, Μετάφραση: Δ.&Ε. Δεμερτζή, MICROANALYSIS IN MEDICAL BIOCHEMISTRY, Εκδόσεις ΑΣΚΛΗΠΙΟΣ, Αθήνα, 1967.
2. MARSHALL WILLIAM, ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, Ιατρικές εκδόσεις ΛΙΤΣΑΣ, Αθήνα, 1998.
3. MC.NAUGHT/CALLANDER, Μετάφραση: ΓΕΩΡΓΙΑ ΝΙΚΗΤΟΠΟΥΛΟΥ-ΜΑΡΑΤΟΥ, ΕΙΚΟΝΟΓΡΑΦΗΜΕΝΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ, Εκδόσεις ΓΡ.ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΣ, Αθήνα, 1987.
4. NESTLE MARION, ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ, Εκδόσεις ΓΡ.ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΣ, Αθήνα, 1987.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5. STRYER LUBERT, ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Αθήνα, 1995
6. TOWNSEND E. CAROLYNN, ROTH A. RUTH, Μετάφραση Χατήρης Ι., Εκδόσεις ΕΛΛΗΝ, Περιστέρι, 2000
7. WOOTON I.D.P.N FREEMANN, Μετάφραση: Δρ. Β.Σπανός, Η ΜΙΚΡΟΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, Εκδόσεις ΓΡΗΓ. ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΣ, Αθήνα, 1984.

### Β) ΞΕΝΟΛΩΣΣΗ

- |   |  |                       |      |
|---|--|-----------------------|------|
| 1. Beeler, Myrton F.                        | Interpretations in clinical chemistry  | Raven Press           | 1983 |
| 2. Bhagavan, Nadhipuram V.                  | Medical biochemistry   | Academic Press        | 2000 |
| 3. Bishop, Duben-Engelkirk                  | Clinical chemistry   | Lippincott            | 1999 |
| 4. Bold, A.M. Wilding, P.                   | Clinical chemistry   | Blackwell Science UK  | 1975 |
| 5. Brandenberger, Hans<br>Maes, Robert A.A. | Analytical toxicology for clinical,<br>forensic and pharmaceutical chemists      | de Gruyter            | 1997 |
| 6. Burtis, Carl A.<br>Ashwood, Edward R.    | Tietz fundamentals of<br>clinical chemistry                                      | W B Saunders          | 1995 |
| 7. Calbreath, Donald F.                     | Clinical chemistry: A Fundamental<br>Textbook                                    | W B Saunders          | 1992 |
| 8. Clayton, Dame Barbara<br>Round, Joan     | Clinical biochemistry and the<br>sick child                                      | Blackwell Science UK  | 1994 |
| 9. Cohn, Robert M.                          | Biochemistry and disease: bridging<br>basic science and clinical practice        | Lippincott            | 1996 |
| 10. Corkill, Jeffrey A.                     | Clinical chemistry   | Ellis Horwood         | 1990 |
| 11. Dean, Theresa Whitlock,<br>Sheryl       | The clinical lab manual series   | Delmar                | 1996 |
| 12. Den Boer, N.C.                          | Clinical chemistry   | Kluwer/Plenum Publ    | 1989 |
| 13. Fischbach, F.T.                         | A manual of Laboratory Diagnostic<br>Tests                                       | J.B. Lippincott       | 1999 |
| 14. Gaw, A. Cowan, Robert A                 | Clinical biochemistry  | Churchill Liv         | 1999 |
| 15. Henry J.B.                              | Clinical Diagnosis and<br>Management by Laboratory<br>Methods Nineteenth Edition | W B Saunders          | 1996 |
| 16. Kaplan A. and SZABO L.L.                | Clinical chemistry: Interpretation<br>and Techniques                             | Lea and Febiger       | 1994 |
| 17. Kaplan, Alex Jack, Rhona                | Clinical chemistry   | Lippincott            | 1994 |
| 18. Kaplan, Alex                            | Clinical chemistry   | Lea and Febiger       | 1994 |
| 19. Kaplan, L.A. Pesce, A.J.                | Clinical chemistry   | Mosby                 | 1996 |
| 20. Knowles, Derek                          | Clinical chemistry   | Butterworth Heinemann | 1986 |
| 21. Laker M.F.                              | Clinical biochemistry for<br>medical students                                    | W B Saunders          | 1995 |

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- |     |                                    |  |                      |      |
|-----|------------------------------------|--|----------------------|------|
| 22. | Lehninger                          | The principles of biochemistry                         | Worth Publishers     | 2000 |
| 23. | Lehninger, Albert L.               | Principles of biochemistry                             | Worth Publishers     | 2000 |
| 24. | Luxton, Richard                    | Clinical biochemistry                                  | Arnold               | 1999 |
| 25. | Marks/V                            | Clinical Biochemistry Near Patient                     | Churchill Liv        | 1985 |
| 26. | Marshall,W.J.Bangert<br>Stephen K. | Clinical biochemistry                                  | Churchill Liv        | 1995 |
| 27. | Marshall,William J                 | Clinical chemistry                                     | Mosby                | 2000 |
| 28. | Metzler,David E.                   | Biochemistry   | Academic Press       | 2000 |
| 29. | Metzler                            | Biochemistry   | Academic Press       | 2000 |
| 30. | Maying,D.Philip Day,<br>Andrew P.  | Clinical chemistry pack                                | Arnold               | 1996 |
| 31. | Mayne Philip D.                    | Clinical chemistry in<br>diagnosis and treatment       | Arnold               | 1994 |
| 32. | Rosalki/Sidney B                   | Clinical Biochemistry of Alcoholis M                   | Churchill Liv        | 1985 |
| 33. | Rudman,Jack                        | Clinical Chemistry                                     | Natl Learning Corp   | 1997 |
| 34. | Sackheim                           | Clinical Biochemistry                                  | Macmillan Lib Ref    | 1993 |
| 35. | Salvatore F.Et Al                  | Clinical Biochemistry in Hepatobiliary                 | Springer-Verlag Bert | 1989 |
| 36. | Spiegel,Herbert E.                 | Advances in clinical chemistry                         | Academic Press       | 2000 |
| 37. | Stryer.Lubert                      | Biochemistry   | W H Freeman          | 2000 |
| 38. | Thabrew,M.I.Ayling,R.              | Biochemistry for clinical medicine                     | Greenwich Medical    | 2000 |
| 39. | Tietz N.W.                         | Fundamentals of Clinical Chemistry                     | W B Saunders         | 1995 |
| 40. | Walmsley,R.N.White.G.H.            | A guide to diagnostic<br>clinical chemistry            | Blackwell Science UK | 1996 |
| 41. | Werner                             | Handbook of clinical chemistry                         | CRC PRESS            | 1990 |
| 42. | Whitby,L.G.Smith,A.F.              | Lecture notes on clinical chemistry                    | Blackwell Science UK | 1988 |
| 43. | Williams D.                        | Biochemistry in clinical practice                      | Elsevier             | 1985 |
| 44. | Williams D.LMarksV.                | Biochemistry in clinical practice                      | Elsevier             | 1985 |
| 45. | Wilson,Keith Walker,<br>John       | Principles and Techniques<br>of practical biochemistry | Cambridge UP         | 2000 |
| 46. |                                    | Clinical biochemistry of steroid<br>hormones           | Elsevier             | 1985 |
| 47. |                                    | Clinical Physiology<br>and Biochemistry, Vol 5         | Karger               |      |

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### (Δ) ΑΡΘΡΑ από το ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ "ΥΓΕΙΑ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ"-Εκδόσεις ΖΥΜΕΛ









1. ΚΑΝΤΖΙΟΣ ΑΘ., Τα ένζυμα - Βασικές Γνώσεις - (Τεύχος 2, τόμος Ι, Αθήνα 1989).
2. ΚΑΝΤΖΙΟΣ ΑΘ., Ισοένζυμα - γενικότητες - χρησιμότητα στη διαγνωστική, (Τεύχος 3, τόμος Ι, Αθήνα 1989).
3. ΚΑΝΤΖΙΟΣ ΑΘ., Προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας και παράγοντες που την επηρεάζουν, (Τεύχος 4, Τόμος Ι, Αθήνα, 1989)
4. ΚΑΝΤΖΙΟΣ ΑΘ., Τεχνικές μετρήσεις της ενζυμικής ενεργότητας με τη φασματο-φωτομετρική μέθοδο, (Τεύχος 2, Τόμος ΙΙ, Αθήνα 1990).
5. ΚΑΝΤΖΙΟΣ ΑΘ., Αρχές της Διαγνωστικής Ενζυματολογίας, (Τεύχος 3, Τόμος ΙΙ, Αθήνα 1990).

### ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΑ ΦΥΛΛΑΔΙΑ ΚΑΙ ΒΙΒΛΙΑ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

- ELITECH DIAGNOSTICS
- ROCHE DIAGNOSTICA
- CLINICAL CHEMISTRY-HUMAN
- GELMAN SCIENCES INC.
- CROMATEST - LABORATORIES KNICKERBOCKER, S.A. ESPANA
- BIOCHEMICALS ORGANIC COMPOUNDS FOR RESEARCH AND DIAGNOSTIC REAGENTS -SIMGA CHEMICAL COMPANY-1991 (USA)
- SCLAVO S.P.A.
- HUMAN
- BIOSIS- Κατάλογος προϊόντων. Γενικές αρχές.
- BIOMERIEUX - Κατάλογος προϊόντων.
- BOEHRINGER MANNHEIM - Οδηγίες χρήσεως διαγνωστικών.
- Abbott Diagnostics
- Organon Technika
- Cecil instruments limited

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## ΣΗΜΑΤΑ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ

	Οξειδωτικό		Τοξικό
	Διαβρωτικό		Επιβλαβές ή Ερεθιστικό
	Εύφλεκτο		Επικίνδυνο για το περιβάλλον
	Εκρηκτικό		Βιολογικός κίνδυνος

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## ΣΗΜΑΤΑ ΥΠΟΧΡΕΩΣΗΣ

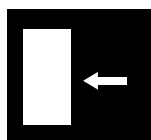
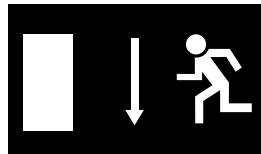
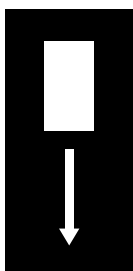
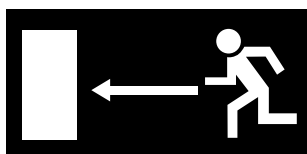


## ΣΗΜΑΤΑ ΑΠΑΓΟΡΕΥΣΗΣ

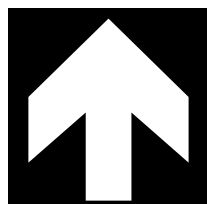
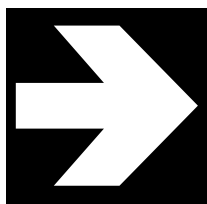
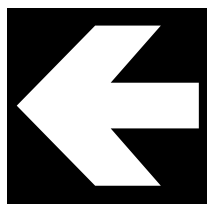
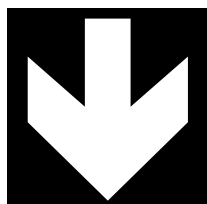
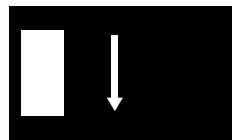


# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

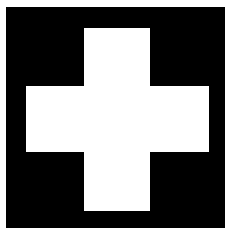
## ΣΗΜΑΤΑ ΔΙΑΣΩΣΗΣ



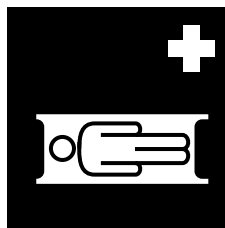
Οδός/Εξοδος  
κινδύνου



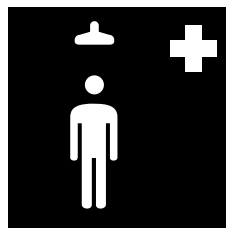
Κατεύθυνση που πρέπει  
να ακολουθηθεί



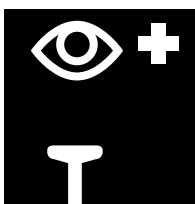
Πρώτες βοήθειες



Φορείο



Θάλαμος καταιωνισμού ασφαλείας



Πλύση ματιών



Τηλέφωνο για διάσωση  
και πρώτες βοήθειες

## **Ελάχιστες γενικές προδιαγραφές σχετικά με τη σήμανση ασφαλείας ή/και υγείας στους χώρους εγκαταστάσεων εργαστηριακών χώρων**

Οι ελάχιστες σημάνσεις ασφαλείας ή/και υγείας πρέπει να χρησιμοποιούνται, για να μεταδίδουν το μήνυμα ή τη σχετική πληροφορία, για τις οποίες προορίζονται. Οι σημάνσεις διακρίνονται σε αυτές που σχετίζονται με:

- απαγόρευση
- προειδοποίηση και
- υποχρέωση.

Εκτός από αυτές τις βασικές σημάνσεις, υπάρχουν και εκείνες που αφορούν:

- τον εντοπισμό των μέσων διάσωσης ή βοήθειας και
- την αναγνώρισή τους,

οι οποίες όλες μαζί γίνονται με πινακίδες αναρτημένες σε εμφανή σημεία κατά μόνιμο τρόπο.

### **Μόνιμη σήμανση**

Η σήμανση με πινακίδες κατά μόνιμο τρόπο γίνεται, όταν σχετίζεται με απαγόρευση, προειδοποίηση και υποχρέωση.

Η μόνιμη σήμανση προορίζεται για τον εντοπισμό και την αναγνώριση των υλικών, ουσιών και των εξοπλισμών καταπολέμησης πυρκαγιάς. Σήμανση επίσης έχουμε για τον εντοπισμό μέσων διάσωσης ή βοήθειας ή των χώρων κυκλοφορίας ενός κτιρίου. Αυτό γίνεται με πινακίδες ασφαλείας που έχουν φόντο χαρακτηριστικό για την περίπτωση χρώμα.

Η μόνιμη σήμανση γίνεται σε δοχεία και σωλήνες, που φέρουν επικίνδυνες ουσίες ή παρασκευάσματα, με ετικέτα, η οποία φέρει εικονοσύμβολο με έγχρωμο φόντο. Η ετικέτα είναι ζωγραφισμένη ή καλά κολλημένη πάνω στα δοχεία και στους σωλήνες κατά τέτοιο τρόπο, που δεν επιτρέπει την αποκόλλησή της και το εικονοσύμβολο να καταλαμβάνει το ένα δέκατο τουλάχιστον της επιφάνειάς αυτής. Το υλικό κατασκευής της ετικέτας δεν πρέπει να προσβάλλεται από το φως, χημικά αντιδραστήρια και από τις δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντος. Το εικονοσύμβολο συνοδεύεται στις χημικές ουσίες ή τα παρασκευάσματα από πρόσθετα στοιχεία που καθορίζονται από την ΚΥΑ 378/94 «Επικίνδυνες ουσίες, ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση αυτών σε συμμόρφωση αυτών προς την οδηγία του Συμβουλίου των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων 67/548/ΕΟΚ όπως έχει τροποποιηθεί και ισχύει» (ΦΕΚ 705/Β/94) και στην ΚΥΑ 1197/89 «Ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση των επικίνδυνων παρασκευασμάτων» (ΦΕΚ 567/Β/90). Οι παραπάνω διατάξεις προβλέπουν την επισήμανση δοχείων και σωληνώσεων.

Η σήμανση γίνεται και για τον εντοπισμό, την αναγνώριση των υλικών και των εξοπλισμών για την καταπολέμηση πυρκαγιάς, των οποίων σήμανση γίνεται με πινακίδες που έχουν χρώμα ασφαλείας. Το υλικό και ο εξοπλισμός καταπολέμησης πυρκαγιάς φέρει σήμανση με χρώμα κόκκινο (χρώμα απαγόρευσης).

Μόνιμη σήμανση γίνεται και στους διαδρόμους κυκλοφορίας, κλιμακοστάσια και εξόδους από το κτίριο, με χρώμα ασφαλείας. Η σήμανση επεκτείνεται σε σημεία πιθανών κρούσεων σε αντικείμενα, καθώς και σε πτώσεις ατόμων.

### **Πινακίδες σήμανσης**


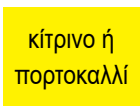
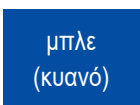
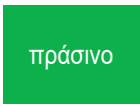

Οι πινακίδες σήμανσης που χρησιμοποιούνται διακρίνονται συνήθως σε:

- απαγορευτικές
- προειδοποιητικές
- υποχρέωσης
- διάσωσης ή βοήθειας
- αυτές που αφορούν τον πυροσβεστικό εξοπλισμό.

Κάθε μία κατηγορία πινακίδων σήμανσης φέρουν μερικά εγγενή χαρακτηριστικά, περιλαμβάνοντας ένα χρώμα που έχει κάποια σημασία ή σκοπό και αναφέρεται σε κάποιες ενδείξεις ή διευκρινίσεις.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πινακίδα σήμανσης	Χρώμα φόντου	Χρώμα εικονοσυμβόλου	Σημασία ή σκοπός	Ενδείξεις και διευκρινίσεις
Απαγορευτική	 κόκκινο	μαύρο	Απαγόρευσης κινδύνου και συναγερμού	Επικίνδυνες συμπεριφορές
Προειδοποίησης	 κίτρινο ή πορτοκαλλί	μαύρο	Προειδοποίησης	Διακοπή, στάση, συστήματα επείγουσας διακοπής. Εκκένωση
Υποχρέωσης	 μπλε (κυανό)	λευκό	Υποχρέωσης	Συγκεκριμένη συμπεριφορά ή δράση- υποχρέωση να φέρεται εξοπλισμός ατομικής ασφάλειας
Διάσωσης ή βοήθειας	 πράσινο	λευκό	Διάσωση ή βοήθεια κατάσταση βοήθειας	Πόρτες, έξοδοι, οδοί, υλικά, θέσεις, χώροι. Επιστροφή στην ομαλή κατάσταση.
Πυροσβεστικού εξοπλισμού	 κόκκινο	λευκό	Υλικό και εξοπλισμός καταπολέμησης πυρκαγιάς	Αναγνώριση και εντοπισμός







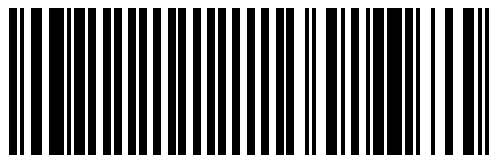


Βάσει του ν. 3966/2011 τα διδακτικά βιβλία του Δημοτικού, του Γυμνασίου, του Λυκείου, των ΕΠΑ.Λ. και των ΕΠΑ.Σ. τυπώνονται από το ΙΤΥΕ - ΔΙΟΦΑΝΤΟΣ και διανέμονται δωρεάν στα Δημόσια Σχολεία. Τα βιβλία μπορεί να διατίθενται προς πώληση, όταν φέρουν στη δεξιά κάτω γωνία του εμπροσθόφυλλου ένδειξη «ΔΙΑΤΙΘΕΤΑΙ ΜΕ ΤΙΜΗ ΠΩΛΗΣΗΣ». Κάθε αντίτυπο που διατίθεται προς πώληση και δεν φέρει την παραπάνω ένδειξη θεωρείται κλεψίτυπο και ο παραβάτης διώκεται σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 7 του νόμου 1129 της 15/21 Μαρτίου 1946 (ΦΕΚ 1946,108, Α').

*Απαγορεύεται η αναπαραγωγή οποιουδήποτε τμήματος αυτού του βιβλίου, που καλύπτεται από δικαιώματα (copyright), ή η χρήση του σε οποιαδήποτε μορφή, χωρίς τη γραπτή άδεια του Υπουργείου Παιδείας και Θρησκευμάτων / ΙΤΥΕ - ΔΙΟΦΑΝΤΟΣ.*



Κωδικός βιβλίου: 0-24-0249  
ISBN Set 978-960-06-3064-0  
Τ.Β´ 978-960-06-3120-3



(01) 000000 0 24 0249 9