

ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ

Εισαγωγή

Η Κλινική Χημεία είναι ένας κλάδος της επιστήμης, ο οποίος περιλαμβάνει γνώσεις Αναλυτικής Χημείας, Βιοχημείας και Ιατρικής. Ασχολείται με τον ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών που περιέχονται στα βιολογικά υγρά και ιστούς (αίμα, ούρα, κ.λ.π.) καθώς και με την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων από τους προσδιορισμούς αυτούς.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών του ανθρώπινου οργανισμού έχουν αναπτυχθεί άμεσοι και έμμεσοι μέθοδοι προσδιορισμού.

Στις άμεσες μεθόδους στις οποίες είναι δυνατός ο προσδιορισμός ενός συστατικού, παρουσία και άλλων συστατικών του δείγματος, χρησιμοποιούνται ευαίσθητες και εκλεκτικές μέθοδοι προσδιορισμού, που βασίζονται σε ενζυμικές αντιδράσεις, σε φασματοφωτομετρικές και φθορισμομετρικές ιδιότητες των διαφόρων συστατικών ή παραγώγων αυτών, σε μεθόδους με εκλεκτικά ηλεκτρόδια, σε χρωματογραφικές μεθόδους κ.λ.π.

Στις έμμεσες μεθόδους πριν από τον προσδιορισμό ενός συστατικού, απαιτείται διαχωρισμός και καθαρισμός αυτού, από τα υπόλοιπα συστατικά που συνυπάρχουν στο δείγμα και παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό του συστατικού αυτού. Οι μέθοδοι διαχωρισμού και καθαρισμού περιλαμβάνουν μεθόδους φυσικών διαχωρισμών όπως φυγοκέντρηση, απομάκρυνση πρωτεϊνών, εκχύλιση, χρωματογραφία κ.α., μεθόδους χημικών διαχωρισμών, δηλαδή χρήση εξειδικευμένων αντιδραστηρίων που δεσμεύουν και αδρανοποιούν τα ανεπιθύμητα συστατικά του δείγματος και τέλος μεθόδους έμμεσων διαχωρισμών με χρήση ειδικών ανιχνευτών, εκλεκτικών ηλεκτροδίων κ.α.

Σημαντικό ρόλο στην απόκτηση αξιόπιστων αποτελεσμάτων, παίζει η ύπαρξη αξιόπιστων αναλυτικών οργάνων για τα οποία απαιτείται η περιοδική βαθμονόμηση των παραμέτρων τους. Επίσης, η ανάπτυξη αυτόματων κλινικών αναλυτών, έχει οδηγήσει στη σημαντική μείωση του χρόνου, που απαιτείται για την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων, σε αναλύσεις καθημερινής ρουτίνας. Οι αυτόματοι αναλυτές μπορούν να διαχωρισθούν σε "αναλυτές φουρνιάς" (batch analyzers), οι οποίοι αναλύουν ένα μόνο συστατικό του δείγματος όπως ουρία ή γλυκόζη ή κρεατινίνη και σε "αναλυτές τυχαίας προσπέλασης" (random access analyzers), οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να αναλύουν σχεδόν ταυτόχρονα, πολλά διαφορετικά συστατικά στο ίδιο δείγμα.

Τέλος, πολλές από τις αναλύσεις βιοχημικών και κλινικών παραμέτρων στηρίζονται σε ανοσολογικούς προσδιορισμούς, στους οποίους χρησιμοποι-

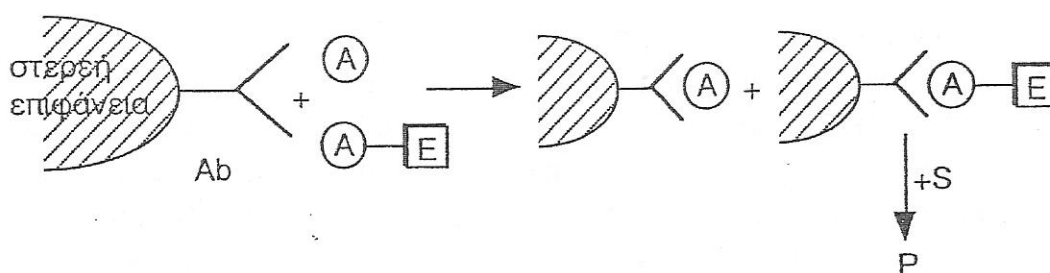
ούνται ειδικά αντισώματα, που δεσμεύουν τις ουσίες που πρόκειται να προσδιορισθούν. Τα κύρια πλεονεκτήματα αυτών των μεθόδων, είναι η μεγάλη εξειδίκευσή τους και ευαισθησία τους. Στους ανοσολογικούς προσδιορισμούς, ανήκουν ραδιοανοσολογικοί προσδιορισμοί καθώς και προσδιορισμοί που δε χρησιμοποιούν ραδιενέργεια αλλά περιέχουν φθορίζουσες ουσίες, ουσίες που εκπέμπουν φωταύγεια, ένζυμο κ.ά.

Οι ραδιοανοσολογικοί προσδιορισμοί περιλαμβάνουν:

- α) μεθόδους που βασίζονται στον ανταγωνισμό (competition) δύο μορίων, ενός ψυχρού (μη ραδιενεργού) και ενός θερμού (ραδιενεργού), για τη δέσμευση ειδικού αντισώματος και οι οποίες είναι οι κλασικές μέθοδοι RIA (radioimmunoassays).
- β) μεθόδους που χρησιμοποιούν ραδιενεργά αντισώματα, στα οποία δεσμεύεται το αντιγόνο, δηλαδή είναι μη ανταγωνιστικές (non-competitive) και είναι γνωστές ως "ανοσοραδιομετρικοί προσδιορισμοί" (immunoradiometric assays, IBMA).

Οι μη ισοτοπικοί προσδιορισμοί χρησιμοποιούν μη ραδιενεργούς ιχνηθέτες, οι οποίοι περιέχουν στο μόριό τους είτε:

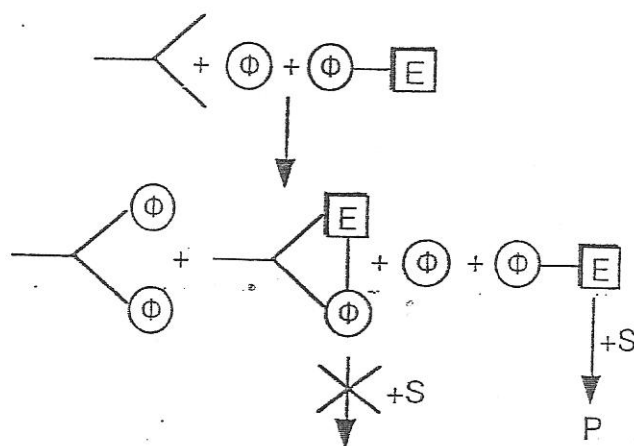
- α) ομάδα που φθορίζει και ονομάζονται ανοσοφθορισμομετρικοί προσδιορισμοί
- β) ένζυμο και καλούνται ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί. Σε αυτούς ανήκει η μέθοδος ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), η οποία παρουσιάζει πολλές παραλλαγές και στηρίζεται στην ακινητοποίηση ενός ειδικού αντισώματος ή αντιγόνου σε μία στερεή επιφάνεια (π.χ. κυτταρίνη) και στην προσθήκη υποστρώματος, το οποίο τροποποιείται από τη δράση ενός ενζύμου (σχήμα 66).



Σχήμα 66: Μέθοδος ELISA ανταγωνιστικού τύπου. Ab:αντίσωμα, (A) : αντιγόνο, (A)—[E]:αντιγόνο επισημασμένο με ένζυμο, S:υπόστρωμα και P:προϊόν

Επίσης, στους ανοσοενζυμικούς προσδιορισμούς, ανήκει και η μέθοδος EMIT (enzyme-multiplied immunoassay technique), η οποία χρησιμοποιείται κυρίως για προσδιορισμούς φαρμάκων στον ορό. Στο σχήμα 67 παρουσιάζεται η αρχή

μίας ομογενούς μεθόδου EMIT.



Σχήμα 67: Αρχή ομογενούς μεθόδου EMIT Φ : φάρμακο, $\Phi-E$: φάρμακο επισημασμένο με ένζυμο. Σε αντίθεση με την ELISA στο σύμπλοκο $Ab-\Phi-E$ δεν μπορεί να δεσμευτεί το υπόστρωμα και άρα είναι μη δραστικό.

Στη συνέχεια, θα αναφερθεί περιορισμένος αριθμός θεμάτων και εργαστηριακών ασκήσεων Κλινικής Χημείας καθώς και μερικές βιοχημικές εργαστηριακές αναλύσεις, των κυριότερων συστατικών που προσδιορίζονται σε βιολογικά δείγματα.

1. Βιολογικά δείγματα

Τα δείγματα που εξετάζονται στις κλινικές αναλύσεις είναι βιολογικά υγρά, δηλαδή αίμα (πλήρες, πλάσμα, ορός), ούρα, κόπρανα, σίελος, χολή, αμνιακό υγρό κ.ά. καθώς και διάφοροι ιστοί οργάνων ή τμήματα οργάνων. Τα πιο συνηθισμένα δείγματα, είναι το αίμα και τα ούρα γιατί η σύστασή τους σχετίζεται με όλες σχεδόν τις μεταβολικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού.

Για να είναι ένα δείγμα αντιπροσωπευτικό και αξιόπιστο, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στα διάφορα στάδια της δειγματοληψίας καθώς και στα στάδια συντήρησης και αποθήκευσης των δειγμάτων πριν από τον προσδιορισμό των συστατικών τους. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος αποθήκευσης των δειγμάτων, είναι η ψύξη στους $2-4^{\circ}\text{C}$, όπου οι περισσότερες ουσίες παραμένουν αναλλοίωτες για μία περίπου εβδομάδα και σε μερικές περιπτώσεις, η κατάψυξη στους -10°C ή στους -25°C . Σε μερικούς προσδιορισμούς παίζει σημαντικό ρόλο, το υλικό του σωλήνα αποθήκευσης. Για παράδειγμα, δείγματα ορών για προσδιορισμό ασβεστίου πρέπει να αποθηκεύονται σε γυάλινους

σωλήνες γιατί το ασβέστιο απορροφάται από το υλικό των δοχείων πολυστερίνης, σε θερμοκρασία δωματίου.

Επίσης, απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην ψύξη και στην απόψυξη του δείγματος, όταν το συστατικό που θα προσδιορισθεί είναι πρωτεϊνικής φύσης π.χ. ένζυμο. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις όπου η συγκέντρωση του συστατικού που μας ενδιαφέρει, επηρεάζεται από την παρουσία κάποιου ενζύμου στο δείγμα, απαιτείται η απενεργοποίηση του ενζύμου πριν από την αποθήκευση του δείγματος.

Αναφέρθηκε παραπάνω ότι τα δείγματα του αίματος είναι τριών ειδών, πλήρες αίμα (whole blood), πλάσμα (plasma) και ορός (serum). Το πλήρες αίμα χρησιμοποιείται σπανίως, κυρίως για προσδιορισμό του pH και της αιμοσφαιρίνης. Για την παραλαβή του πλάσματος προστίθεται αντιπηκτικό και ακολουθεί φυγοκέντρηση. Το πλάσμα χρησιμοποιείται στους χημικούς προσδιορισμούς, αφ' ενός γιατί διαχωρίζεται αμέσως από τα έμμορφα συστατικά του αίματος (ερυθρά και λευκά κύτταρα) και αφ' ετέρου γιατί σπάνια παθαίνει αιμόλυση. Ο ορός λαμβάνεται από το αίμα χωρίς αντιπηκτικό, αφού αυτό αφεθεί να πήξει για 30min και στη συνέχεια φυγοκεντρηθεί.

Η επιλογή του κατάλληλου αντιπηκτικού έχει μεγάλη σημασία για τις κλινικές αναλύσεις. Τα αντιπηκτικά που χρησιμοποιούνται, είτε δεσμεύουν το ασβέστιο, είτε παρεμποδίζουν τη δράση της θρομβίνης. Τα πιο συνηθισμένα αντιπηκτικά για τα δείγματα αίματος, είναι τα οξαλικά άλατα (νατρίου, καλίου και αμμωνίου), τα φθοριούχα άλατα (νατρίου), τα άλατα του EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ), το ACD (acid-citrate dextrose) και τέλος, η ηπαρίνη, η οποία θεωρείται το καλύτερο αντιπηκτικό γιατί παρεμποδίζει σε μικρό βαθμό τους χημικούς προσδιορισμούς.

Για τα δείγματα των ούρων, τα πιο συνηθισμένα συντηρητικά είναι το υδροχλωρικό οξύ, το τολουόλιο, το οξικό οξύ κ.α.

2. Προσδιορισμός πρωτεϊνών

Θεωρητικό Μέρος

Ο αριθμός των πρωτεϊνών, που μπορούν να προσδιορισθούν σήμερα στον ορό, ξεπερνάει τις 100 διαφορετικές πρωτεΐνες, οι δε μέθοδοι προσδιορισμού που εφαρμόζονται ποικίλλουν. Στις περισσότερες περιπτώσεις όμως προσδιορίζονται μόνο 10-15 περίπου πρωτεΐνες του ορού, που χαρακτηρίζονται σαν "κοινές" πρωτεΐνες του ορού και οι οποίες βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Συνήθως προσδιορίζεται η "ολική πρωτεΐνη" ορού καθώς και η αλβουμίνη του ορού. Με τον όρο "ολική πρωτεΐνη" ορού, αναφερόμαστε στο άθροισμα

των σφαιρινών και της αλβουμίνης, που αποτελεί το 40–60% της ολικής πρωτεΐνης. Όταν η τιμή της ολικής πρωτεΐνης είναι εκτός φυσιολογικών ορίων (60–80g/L), η δε τιμή της αλβουμίνης είναι φυσιολογική (35–50g/L), τότε η ανωμαλία εντοπίζεται στις σφαιρίνες. Η μέθοδος προσδιορισμού που χρησιμοποιείται στην περίπτωση αυτή, είναι η ηλεκτροφόρηση.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι τεχνικές προσδιορισμού των πρωτεϊνών στο κλινικό εργαστήριο είναι πάρα πολλές και χωρίζονται στις εξής κατηγορίες: i) Ποσοτικός προσδιορισμός “ολικής πρωτεΐνης” και αλβουμίνης. ii) Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση, όπου λαμβάνονται ημιποσοτικά δεδομένα για τις κύριες τάξεις των πρωτεϊνών, που βρίσκονται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις. iii) Εξειδικευμένοι ποσοτικοί προσδιορισμοί συγκεκριμένων πρωτεϊνών με ανοσοχημικές μεθόδους ή με ραδιοανοσολογικές μεθόδους και iv) Ταυτοποίηση μη φυσιολογικών πρωτεϊνών με ανοσοηλεκτροφόρηση ή με ραδιοανοσοδιάχυση.

Οι μέθοδοι του ποσοτικού προσδιορισμού της ολικής πρωτεΐνης στηρίζονται σε δύο παραδοχές: i) Όλα τα πρωτεϊνικά μόρια είναι καθαρές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, που περιέχουν κατά μέσο όρο 16% κατά βάρος, άζωτο και ii) Κάθε μία από τις εκατοντάδες πρωτεΐνες που υπάρχουν στα βιολογικά υγρά, αντιδρούν με τον ίδιο χημικό τρόπο. Αν και οι παραδοχές αυτές δεν είναι απόλυτα ακριβείς, επιτρέπουν να εφαρμόζονται μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνών, που είναι απλές και πρακτικές.

Ο προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης αρχικά γινότανε με τη μέθοδο Kjeldahl. Κατά τη μέθοδο αυτή μετατρέπεται το πρωτεϊνικό άζωτο σε ιόν αμμωνίου, η συγκέντρωση του οποίου προσδιορίζεται κυρίως με τιτλοδότηση. Η συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης ισούται με τη συγκέντρωση του αζώτου της αμμωνίας πολλαπλασιαζόμενη με το 6.25(100/16).

Στη συνέχεια, αναπτύχθηκε η μέθοδος διουρίας, η οποία βασίζεται στην παρουσία των πεπτιδικών δεσμών στις πρωτεΐνες. Όταν ένα διάλυμα πρωτεΐνης αντιδρά με ιόντα Cu^{2+} σε αλκαλικό περιβάλλον, σχηματίζεται ένα έγχρωμο χηλικό σύμπλοκο ανάμεσα στο Cu^{2+} και στο άζωτο του αμιδικού δεσμού. Η ένταση του χρώματος που παράγεται, είναι ανάλογη του αριθμού των πεπτιδικών δεσμών και συνεπώς και του αριθμού των πρωτεϊνικών μορίων. Η μέθοδος Lowry, που αναπτύσσεται στη συνέχεια, βασίζεται στη μέθοδο διουρίας αλλά χρησιμοποιεί το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, με αποτέλεσμα να είναι πολύ πιο ευαίσθητη στον προσδιορισμό πρωτεϊνών.

Οι υπόλοιπες μέθοδοι προσδιορισμού ολικής πρωτεΐνης που αναπτύχθηκαν στηρίχθηκαν στις ακόλουθες γενικές ιδιότητες των πρωτεϊνών:

i) Χαρακτηριστική απορρόφηση στο υπεριώδες φάσμα, στις περιοχές των 200–225nm, όπου απορροφούν κυρίως οι πεπτιδικοί δεσμοί και των 270–290nm, όπου απορροφούν κυρίως οι αρωματικοί δακτύλιοι τυροσίνης και

θρυπτοφάνης σε pH 8.

ii) Καταβύθιση των πρωτεϊνών με τριχλωροξικό οξύ ή με θειοσαλυκυλικό οξύ και στη συνέχεια προσδιορισμό του σχηματιζόμενου ιζήματος, με νεφελομετρία ή με μέθοδο διουρίας ή Lowry.

iii) Ικανότητα των πρωτεϊνών να δεσμεύουν έγχρωμες ενώσεις, ο προσδιορισμός των οποίων γίνεται στη συνέχεια με φωτομετρικές μεθόδους. Οι έγχρωμες ενώσεις χρησιμοποιούνται και για την εμφάνιση των λωρίδων των πρωτεϊνών μετά από ηλεκτροφόρηση.

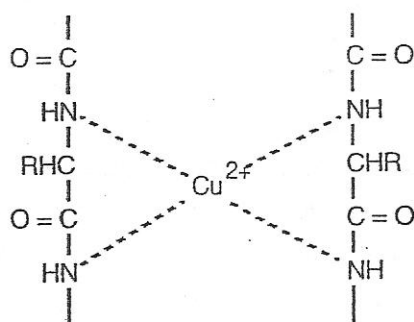
Στη συνέχεια, θα αναφερθεί ο προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry, που είναι η πιο συνηθισμένη μέθοδος στη Βιοχημεία.

Πειραματικό Μέρος

Προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry

Αρχή της μεθόδου

Ο σκοπός αυτής της εργαστηριακής άσκησης, είναι ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών, μετά από σχηματισμό έγχρωμου συμπλόκου τους με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Συγκεκριμένα ο Cu^{2+} σε αλκαλικό περιβάλλον σχηματίζει σύμπλοκο με τους πεπτιδικούς δεσμούς (σχήμα 68), με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ελαφρύ ιώδες χρώμα με την προσθήκη του αντιδραστήριου Γ (βλέπε αντιδραστήρια) στο δείγμα, που περιέχει πρωτεΐνη.



Σχήμα 68: Σύμπλοκο Cu^{2+} με τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών.

Στη συνέχεια, προστίθεται το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και προκαλείται ελεγχόμενη αναγωγή των μολυβδαινικών και βολφραμικών, που περιέχονται στο αντιδραστήριο αυτό, με σύγχρονη ανάπτυξη του χρώματος, που τελει-

κά φωτομετρείται. Η αναγωγή των παραπάνω, γίνεται από το σύμπλοκο του Cu^{2+} και θρυπτοφάνης, που περιέχονται στις πρωτεΐνες. Ο μηχανισμός της αντίδρασης δεν είναι ακριβώς γνωστός αλλά θεωρείται ότι σχηματίζεται ένα οξειδωμένο ενδιάμεσο σύμπλοκο χαλκού, με απροσδιόριστο αριθμό οξειδω-σης. Η μέθοδος Lowry είναι ευαίσθητη και μπορεί να προσδιορίσει συγκεν-τρωση πρωτεΐνης από 10 έως 60 $\mu\text{g/mL}$, δηλαδή είναι 100 φορές πιο ευαί-σθητη από τη μέθοδο διουρίας.

Συνήθως, εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών χαμηλής συγκεν-τρωσης, σε ιστούς και σε παρασκευάσματα ενζύμων. Ο προσδιορισμός ολι-κής πρωτεΐνης στα ούρα ή στον ορό δεν γίνεται συνήθως με τη μέθοδο Lowry, γιατί τα αντιδραστήρια αντιδρούν και με μη πρωτεϊνικά μόρια που βρίσκονται σε αυτά τα βιολογικά υγρά και στα αποτελέσματα υπάρχει θετική απόκλιση 3–9 $\text{mg}/100\text{mL}$. Η μέθοδος Lowry δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα ολικής πρωτεΐνης στα ούρα ή στον ορό, όταν προηγηθεί ένα στάδιο καθαρισμού (π.χ. gel filtration) του δείγματος, για την απομάκρυνση των μη πρωτεϊνικών μορίων αυτού.

Αντιδραστήρια:

1. Πρότυπο διάλυμα βοδινής αλβουμίνης (BSA, bovine serum albumin) 2 mg/mL .
2. Πρότυπο διάλυμα λυσοζύμης 1 mg/mL .
3. Αντιδραστήριο Folin–Ciocalteu 1N
Λαμβάνεται έτοιμο από το εμπόριο ή διατίθεται σε συγκέντρωση 2N και αραιώνεται με H_2O σε αναλογία 1:1.
4. Διάλυμα 2% Na_2CO_3 σε 0.1 N NaOH (Διάλυμα Α)
Για την παρασκευή του διαλύματος αυτού, διαλύονται 20g Na_2CO_3 και 4g NaOH με H_2O , μέχρι τελικού όγκου 1L.
5. Διάλυμα $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% (w/v).
6. Διάλυμα τρυγικού νατρίου (ή τρυγικού καλίου–νατρίου) 2% (w/v)
7. Διάλυμα Β=10mL διαλύματος $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ αναμιγνύονται με 10mL διαλύ-ματος τρυγικού νατρίου. Το τρυγικό νάτριο εμποδίζει το χαλκό να κατα-βυθιστεί σαν ίζημα $\text{Cu}(\text{OH})_2$, με το αλκαλικό διάλυμα του Na_2CO_3 .
8. Διάλυμα Γ=20mL Διάλυμα Β + 980mL Διάλυμα Α.

Εκτέλεση:

1. Αριθμούνται 4 δοκιμαστικά σωλήνες (Σ_1 – Σ_4) για τις διαφορετικές συγκεν-τρώσεις BSA, 1 δοκιμαστικός σωλήνας για το τυφλό (T_1) και 1 σωλήνας

για το δείγμα άγνωστης συγκέντρωσης (Δ).

2. Στο Σ_1 προστίθεται ποσότητα 0.05mL πρότυπου διαλύματος BSA, στο Σ_2 προστίθεται ποσότητα 0.1mL BSA, στο Σ_3 προστίθεται ποσότητα 0.2mL BSA και στο Σ_4 προστίθεται ποσότητα 0.3mL BSA. Στο δοκιμαστικό σωλήνα Δ τοποθετείται 1mL από το άγνωστης συγκέντρωσης δείγμα.
3. Ακολουθεί προσθήκη 5mL διαλύματος Γ και στους 6 δοκιμαστικούς σωλήνες.
4. Συμπληρώνεται ο όγκος στα 6mL με H_2O , σε όποιους σωλήνες απαιτείται.
5. Όλοι οι σωλήνες παραμένουν για 10min σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Στη συνέχεια προστίθεται 0.25mL Folin-Ciocalteu, σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες και μετά από παραμονή 30min, τα δείγματα φωτομετρούνται στα 500nm και στα 750nm.

Τα στάδια 1–6 επαναλαμβάνονται και για τη λυσοζύμη, με τις ίδιες ποσότητες αντιδραστηρίων.

Αποτελέσματα – Υπολογισμοί:

1. Κατασκευάζεται πίνακας με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και το διάγραμμα πορείας της άσκησης.
2. Υπολογίζονται τα $\mu\text{g/mL}$ BSA και λυσοζύμης, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
3. Κατασκευάζονται οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς $\text{Abs}=f(\text{BSA } \mu\text{g/mL})$ και $\text{Abs}=f(\text{Lys } \mu\text{g/mL})$ στα 500 και 750nm.
4. Με βάση την καμπύλη αναφοράς, υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις πρωτεϊνών της άγνωστης συγκέντρωσης διαλυμάτων, οι οποίες εκφράζονται σε συγκέντρωση BSA ή σε συγκέντρωση λυσοζύμης.

3. Προσδιορισμός ουρίας

Θεωρητικό Μέρος

Η ουρία είναι το κυριότερο τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πρωτεϊνών στον άνθρωπο. Ο σχηματισμός της ουρίας, σε μορφή απέκκρισης της τοξικής αμμωνίας, γίνεται κυρίως στο ήπαρ. Η ουρία, όπως είναι γνωστό, δεν είναι τοξική, είναι υδατοδιαλυτή, διαχέεται μέσω των βιολογικών μεμβρανών και αποβάλλεται από τα νεφρά. Άρα, ο ποσοτικός προσδιορισμός της ουρίας στον ορό και στα ούρα αποτελεί χρήσιμο δείκτη της ηπατικής και της νεφρικής λειτουργίας.

Η ουρία στον ορό ή το άζωτο της ουρίας στο αίμα, προσδιορίζονται με δύο κυρίως μεθόδους :

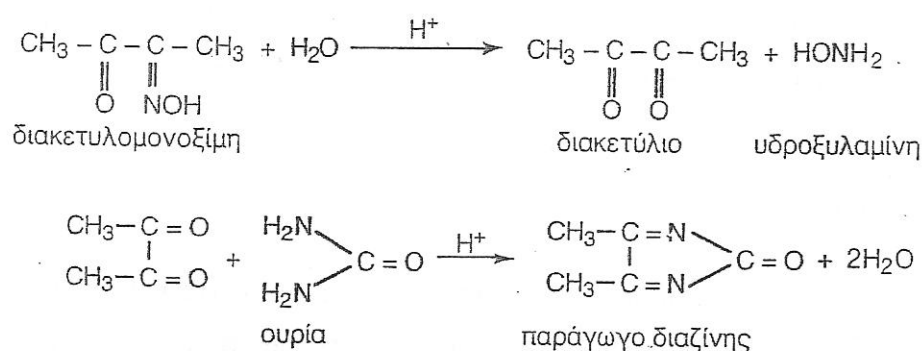
- α) Άμεση χημική μέθοδος και
- β) Έμμεση ενζυμική μέθοδος.

Πειραματικό Μέρος

3α. Προσδιορισμός ουρίας με άμεση χημική μέθοδο

Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος αυτή, βασίζεται στην αντίδραση της ουρίας με τη διακετυλομονοξίμη προς σχηματισμό εγχρώμου παραγώγου. Συγκεκριμένα, η διακετυλομονοξίμη σε όξινο περιβάλλον υδρολύεται προς διακετύλιο και υδροξυλαμίνη. Στη συνέχεια, το παραγόμενο διακετύλιο αντιδρά με την ουρία προς σχηματισμό κίτρινου κυκλικού παραγώγου διαζίνης. Επειδή η υδροξυλαμίνη που παράγεται, παρεμποδίζει το σχηματισμό του χρώματος, οξειδώνεται παρουσία του αντιδραστήριου στυπτηρίας σιδήρου. Στο σχήμα 69, παρουσιάζονται οι αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά την αντίδραση της ουρίας με τη διακετυλομονοξίμη. Το τελικό προϊόν (παράγωγο διαζίνης) φωτομετρείται στα 475nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της ουρίας γίνεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς.



Σχήμα 69: Αντίδραση ουρίας με διακετυλομονοξίμη.

Ο παραπάνω φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της ουρίας, δεν είναι εξειδικευμένη μέθοδος, γιατί η διακετυλομονοξίμη αντιδρά και με άλλες ενώσεις που περιέχουν αμινομάδες όπως κιτρουλίνη, αλλαντοΐνη κ.λ.π.

Αντιδραστήρια:

1. Θειϊκό οξύ, 0.667N

Το αντιδραστήριο αυτό παρασκευάζεται με προσθήκη 20mL πυκνού H_2SO_4 (ρ 1.84) σε 200mL H_2O και στη συνέχεια, συμπληρώνεται ο όγκος στο 1L με H_2O .

2. Βολφραμικό νάτριο 10% (w/v).

Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 10g Na_2WO_4 (ελεύθερα Mo) με H_2O , μέχρι τελικού όγκου 100mL.

3. Αντιδραστήριο στυπτηρίας σιδήρου 0.333% (w/v).

Διαλύεται 1g $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ σε 100mL H_2O και στο διάλυμα αυτό προστίθενται 100mL φωσφορικού οξέος 85% (ρ 1.71) και 100mL πυκνού H_2SO_4 (ρ 1.84). Στη συνέχεια, το διάλυμα ψύχεται και διηθείται.

4. Αντιδραστήριο διακετυλομονοξίμης 0.5% (w/v).

Παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 2.5g διακετυλομονοξίμης σε 250mL H_2O , ακολουθεί προσθήκη 75g NaCl και το διάλυμα αραιώνεται με H_2O μέχρι τελικού όγκου 500mL.

5. Πρότυπα διαλύματα ουρίας (6, 12, 30 και 60mgN/100mL)

Αρχικά παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα ουρίας, με διαλυτοποίηση 0.1287g προξηραμένης ουρίας (σε πυριαντήριο 105°C για 1h) σε 100mL H_2O . Το διάλυμα αυτό περιέχει 60mgN ουρίας στα 100mL. Στη συνέχεια, παρασκευάζονται τα υπόλοιπα πρότυπα διαλύματα ουρίας με αρραίωση του πυκνού διαλύματος. Συγκεκριμένα, με αρραίωση 1:2 παρασκευάζεται το διάλυμα 30mgN/100mL, με αρραίωση 1:4, το διάλυμα 12mgN/100mL και με αρραίωση 1:10, το διάλυμα 6mg N/100mL.

Εκτέλεση:

1. Αριθμούνται 6 δοκιμαστικοί σωλήνες, οι 4 δοκιμαστικοί (Σ_1 – Σ_4) για τα πρότυπα διαλύματα ουρίας, ο ένας δοκιμαστικός σωλήνας για το τυφλό (T) και ο τελευταίος σωλήνας για το δείγμα, άγνωστης περιεκτικότητας σε ουρία (Δ).
2. Σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται από 1.4mL H_2O , 0.2mL διάλυμα ουρίας, 0.2mL H_2SO_4 0.667N και 0.2mL 10% Na_2WO_4 . Σε όποιους δοκιμαστικούς σωλήνες απαιτείται συμπληρώνεται ο όγκος με H_2O .

Το διάλυμα ουρίας είναι:

- πρότυπο διάλυμα ουρίας ή
 - διάλυμα ουρίας άγνωστης συγκέντρωσης ή
 - ούρα 24 ώρου, τα οποία έχουν αραιωθεί σε αναλογία 1: 500 ή
 - ορός αίματος, ο οποίος αραιώνεται συνήθως σε αναλογία 1:100
3. Οι σωλήνες φυγοκεντρώνται στις ≈ 2000 rpm για 10min.
Το στάδιο αυτό παραλείπεται όταν δεν υπάρχει δείγμα ούρων ή ορού αίματος.
 4. Από το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης όλων των δοκιμαστικών σωλήνων, παραλαμβάνονται 0.4mL; τα οποία μεταφέρονται σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες (Σ'_1 – Σ'_4 , T' και Δ').
 5. Στους νέους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθονται από 1.7mL H_2O , 1.7mL αντιδραστηρίου διακετυλομονοξίμης και 1.7mL αντιδραστηρίου στυπτηρίας σιδήρου, με τη συγκεκριμένη σειρά.
 6. Στη συνέχεια, πωματίζονται οι δοκιμαστικοί σωλήνες και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο $100^\circ C$ για 15min.
 7. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε σκοτεινό χώρο και αφήνονται να κρυώσουν. Το κίτρινο χρώμα που αναπτύσσεται, παραμένει σταθερό για περίπου 1h, όταν δεν εκτείνεται στο φως.
 8. Τα δείγματα φωτομετρούνται στα 475nm.

Αποτελέσματα – Υπολογισμοί:

1. Κατασκευάζεται πίνακας με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα καθώς και το διάγραμμα πορείας της άσκησης.
2. Υπολογίζεται η τελική συγκέντρωση N ουρίας, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, που περιέχει πρότυπο διάλυμα ουρίας.
3. Κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς $Abs=f([N \text{ ουρίας}])$.
4. Υπολογίζεται η συγκέντρωση N ουρίας στο άγνωστο δείγμα με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς και η οποία μετατρέπεται σε τελική συγκέντρωση ουρίας.
5. Όταν το άγνωστο δείγμα είναι ούρα 24ώρου, συγκρίνεται η τιμή αυτού με τις φυσιολογικές τιμές: 1.2–3.0moles ουρίας / L.
6. Όταν το άγνωστο δείγμα είναι ορός, συγκρίνεται η τιμή του με τις φυσιολογικές τιμές του ορού: 1.2–3.3 mmoles ουρίας/ L.

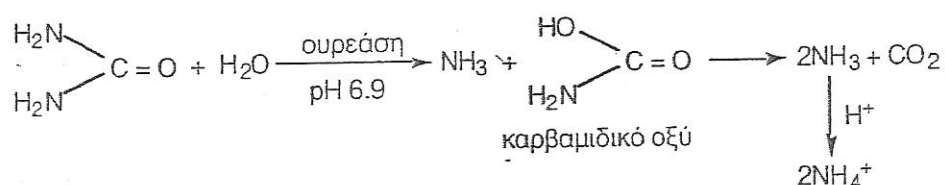
36. Προσδιορισμός ουρίας με έμμεση ενζυμική μέθοδο

Αρχή της μεθόδου

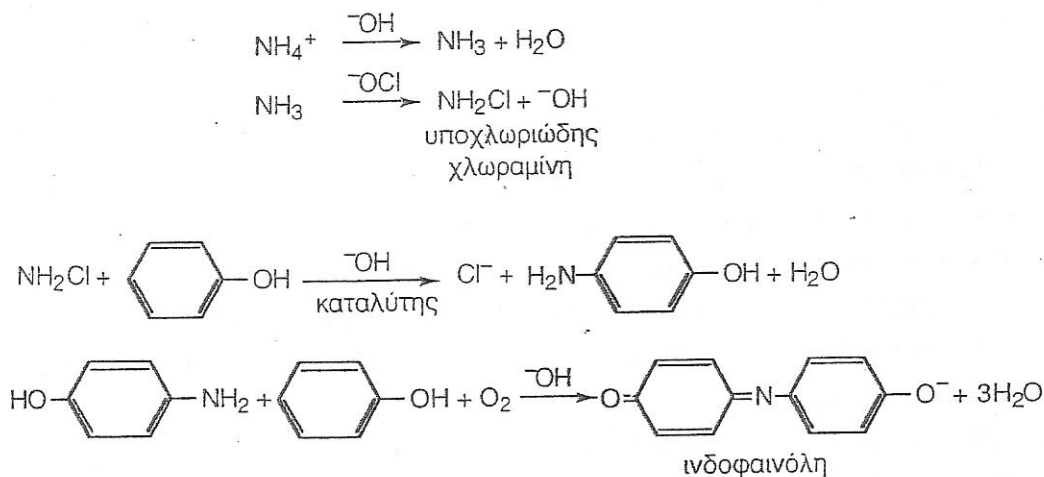
Κατά τη μέθοδο αυτή, η ουρία με τη δράση της ουρεάσης, υδρολύεται προς

διοξείδιο του άνθρακα και αμμωνία και προσδιορίζεται το ποσό της αμμωνίας που παράγεται. Η ενζυμική μέθοδος προσδιορισμού της ουρίας, πλεονεκτεί σχετικά με το φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού γιατί είναι εξειδικευμένη. Ο προσδιορισμός της παραγόμενης αμμωνίας γίνεται είτε με χημική μέθοδο, είτε ηλεκτροχημικά, με τη χρήση εκλεκτικού ηλεκτροδίου αμμωνίας, είτε φασματοφωτομετρικά. Η μέθοδος Berthelot, που θα αναπτυχθεί στη συνέχεια, βασίζεται σε φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της NH_3 .

Το πρώτο στάδιο της μεθόδου Berthelot είναι η υδρόλυση της ουρίας, με τη δράση της ουρεάσης, προς αμμωνία και καρβαμικό οξύ, το οποίο αποσυντίθεται ταχύτατα σε NH_3 και CO_2 .



Η αμμωνία που παράγεται, αντιδρά με τη φαινόλη και με αλκαλικό διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου παρουσία καταλύτη προς σχηματισμό ινδοφαινόλης, η οποία σε αλκαλικό περιβάλλον έχει έντονο μπλε χρώμα. Ο μηχανισμός της αντίδρασης δεν είναι ξεκαθαρισμένος, προτείνεται όμως το ακόλουθο σχήμα:



Η ινδοφαινόλη, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε αλκαλικό περιβάλλον έχει μπλε χρώμα και απορροφά στα 580nm, ενώ σε όξινο περιβάλλον έχει κίτρινο χρώμα.

Αντιδραστήρια:

1. Πρότυπο διάλυμα φαινόλης και καταλύτη (106mM φαινόλη και 0.50mM

νιτροπρωσικού νατρίου $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Το διάλυμα είναι σταθερό για 3 μήνες στους 4–8°C.

2. Διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου–καυστικού νατρίου (7mM NaClO και 150mM NaOH).

Το διάλυμα είναι σταθερό για 3 μήνες στους 4–8°C, όταν φυλάσσεται μακριά από φως. Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι μεταξύ 10.4 και 11.2, όπου είναι η βέλτιστη περιοχή pH για το σχηματισμό του μπλε χρώματος της ινδοφαινόλης.

3. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και EDTA (20mM φωσφορικών και 10mM EDTA) pH 6.9.

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος διαλύονται 3.36g $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$ και 3.48g K_2HPO_4 σε 900mL H_2O . Στη συνέχεια, ρυθμίζεται το pH στο 6.9 με HCl και συμπληρώνεται ο όγκος στο 1L. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4–8°C. Το ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για την παρασκευή του διαλύματος της ουρεάσης. Ο ρόλος του EDTA είναι να δεσμεύει τα βαρέα μέταλλα, που βρίσκονται σε ίχνη στα διαλύματα και τα οποία απενεργοποιούν τα ένζυμα.

4. Διάλυμα ουρεάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 6.9

Παρασκευάζεται διάλυμα ουρεάσης 7.15U/mL με διάλυμα υδραζωτικού νατρίου (NaN_3) 0.1g/100mL. Το διάλυμα είναι σταθερό για 3 μήνες στους 4–8°C.

5. Πρότυπα διαλύματα ουρίας (6, 12, 30 και 60 mgN/100mL)

Τα πρότυπα διαλύματα ουρίας παρασκευάζονται όπως περιγράφεται στο προηγούμενο πείραμα 3α.

Εκτέλεση:

1. Αριθμούνται 6 δοκιμαστικοί σωλήνες, οι 4 δοκιμαστικοί σωλήνες (Σ_1 – Σ_4) χρησιμοποιούνται για τα πρότυπα διαλύματα ουρίας, ο ένας δοκιμαστικός σωλήνας για το δείγμα, άγνωστης περιεκτικότητας σε ουρία (Δ) και ο τελευταίος δοκιμαστικός για το τυφλό (T).
2. Στους δοκιμαστικούς σωλήνες Σ_1 – Σ_4 προστίθεται ποσότητα 0.010mL από τα πρότυπα διαλύματα ουρίας 6, 12, 30 και 60 mgN/100mL, αντίστοιχα. Στο δοκιμαστικό σωλήνα Δ προστίθεται ποσότητα 0.010mL από το άγνωστο δείγμα και στον T , 0.010mL H_2O .
3. Σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται ποσότητα 0.100mL από το διάλυμα ουρεάσης.
4. Στη συνέχεια, επωάζονται και οι 6 δοκιμαστικοί σωλήνες σε υδατόλουτρο 37°C για 5min.

5. Μετά την επώαση των 5min, προστίθεται σε όλους τους σωλήνες ποσότητα 2.5mL διαλύματος φαινόλης και 2.5mL από το διάλυμα του υποχλωριώδους νατρίου.
6. Ακολουθεί θέρμανση των σωλήνων για 5min σε υδατόλουτρο 37°C.
7. Τα δείγματα φωτόμετρούνται στα 580nm.

Αποτελέσματα – Υπολογισμοί:

1. Κατασκευάζεται Πίνακας με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα καθώς και το διάγραμμα πορείας της άσκησης.
2. Υπολογίζεται η τελική συγκέντρωση N ουρίας, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, που περιέχει πρότυπο διάλυμα ουρίας.
3. Κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς $Abs=f([Nουρίας])$.
4. Υπολογίζεται η συγκέντρωση N ουρίας στο άγνωστο δείγμα, με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς και η οποία μετατρέπεται σε τελική συγκέντρωση ουρίας.

Οι φυσιολογικές τιμές για τα ούρα 24ώρου και για τον ορό, αναφέρονται στο προηγούμενο πείραμα 3α.

Παρατήρηση:

Όταν το δείγμα ορού είναι λιπαιμικό, τότε το τελικό διάλυμα είναι αρκετά θολό. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται ένα επιπλέον τυφλό, το οποίο περιέχει 0.010mL ορού, 0.1mL διάλυμα ουρεάσης, 2.5mL διάλυμα φαινόλης και 2.5mL διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου, δηλαδή περιέχει όλα τα αντιδραστήρια, που περιέχει και το εξεταζόμενο δείγμα αλλά παραλείπονται τα δύο στάδια της επώασης και της θέρμανσης στους 37°C. Στη συνέχεια, υπολογίζεται η απορρόφηση του τυφλού, η οποία αφαιρείται από την απορρόφηση του λιπαιμικού δείγματος.

4. Προσδιορισμός γλυκόζης

Θεωρητικό Μέρος

Ο προσδιορισμός της γλυκόζης, είναι από τις πιο συνηθισμένες αναλύσεις ενός κλινικού εργαστηρίου και αποτελεί την κύρια εργαστηριακή δοκιμασία για τη διάγνωση του σακχαρώδη διαβήτη.

Το δείγμα που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της γλυκόζης, μπορεί να είναι ολικό αίμα ή πλάσμα ή ορός ή ούρα. Το δείγμα ολικού αίματος δε χρη-