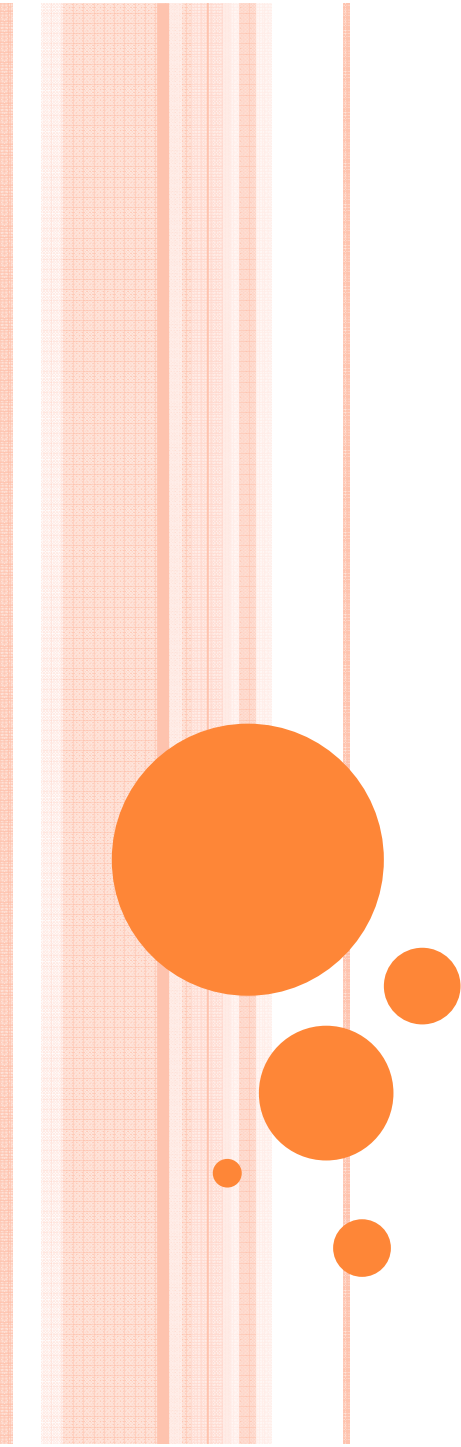




ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ II

ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ

- Η κλινική χημεία κλάδος της επιστήμης που περιλαμβάνει γνώσεις
 - Αναλυτικής Χημείας
 - Βιοχημείας
 - Ιατρικής
- Ασχολείται
 - με τον προσδιορισμό συστατικών που περιέχονται στα βιολογικά δείγματα
 - με την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των προσδιορισμών (φυσιολογικές ή παθολογικές τιμές)



Ποσοτικός Προσδιορισμός Συστατικών

○ Άμεσες μέθοδοι

- Προσδιορισμός ενός συστατικού παρουσία και άλλων συστατικών του δείγματος
- Ευαίσθητες και εκλεκτικές μέθοδοι προσδιορισμού (ενζυμικές αντιδράσεις, φασματοφωφομετρικές – φθορισμομετρικές μέθοδοι, ανοσολογικοί μέθοδοι, εκλεκτικά ηλεκτρόδια..)

○ Έμμεσες μέθοδοι

- Πριν τον προσδιορισμό ενός συστατικού απαιτείται ο διαχωρισμός και καθαρισμός του
- Οι μέθοδοι διαχωρισμού περιλαμβάνει μεθόδους όπως εκχύλιση, φυγοκέντρωση, χρωματογραφία με σκοπό να απομακρυνθούν τα ανεπιθύμητα συστατικά από το βιολογικό δείγμα τα οποία θα παρεμποδίσουν τον προσδιορισμό



Ποσοτικός Προσδιορισμός Συστατικών

- Αναλυτικά όργανα
 - Για την απόκτηση αξιόπιστων αποτελεσμάτων πρέπει να βαθμονομούνται συχνά τα όργανα
- Βιοχημικοί αυτόματοι αναλυτές
 - Αναλυτές φουρνιάς (batch analyzers)
αναλύουν ένα μόνο συστατικό του δείγματος (π.χ. Γλυκόζη ή ουρία.....)
 - Αναλυτές τυχαίας προσπέλασης (random access analyzers)
αναλύουν ταυτόχρονα πολλά συστατικά του δείγματος (π.χ. Ολική χοληστερόλη και HDL-χοληστερόλη και LDL-χοληστερόλη)



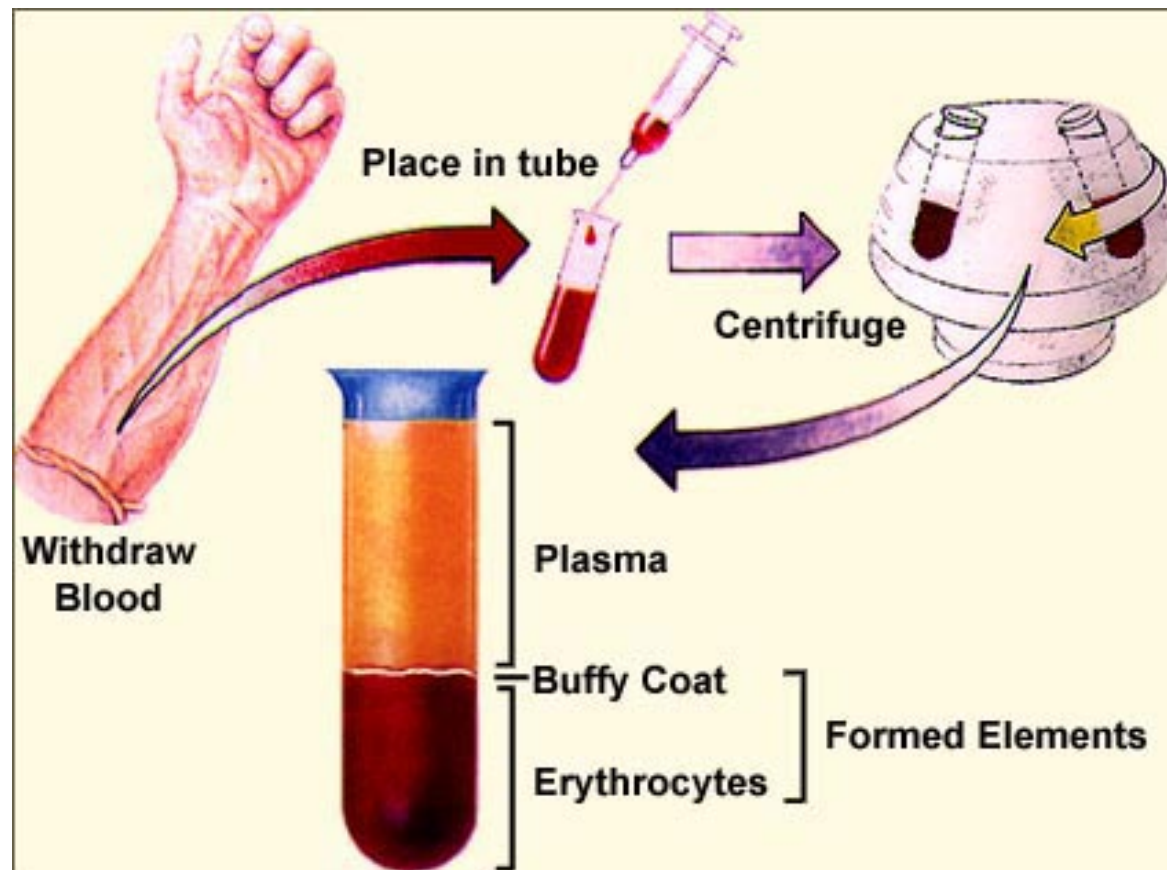
Βιολογικά δείγματα

- Τα βιολογικά δείγματα που εξετάζονται συνήθως είναι
 - Τα βιολογικά υγρά (ολικό αίμα, ορός, πλάσμα, ούρα, σίελος, αμνιακό υγρό)
 - Κόπρανα
 - Διάφοροι ιστοί (βιοψία)
- Δειγματοληψία – Αποθήκευση
 - Σε ειδικά σωληνάκια – δοχεία ανάλογα την ανάλυση
 - π.χ. για προσδιορισμό ασβεστίου => γύλινος σωλήνας γιατί το ασσβέστιο προσροφάται σε σωλήνες πολυστερίνης
 - Αποθήκευση σε κατάλληλη θερμοκρασία
 - στους 4°C εάν είναι να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός μέσα σε ώρες
 - στους -20°C εάν είναι να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός μέσα σε μέρες ή εβδομάδες
 - στους -80°C εάν είναι να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα

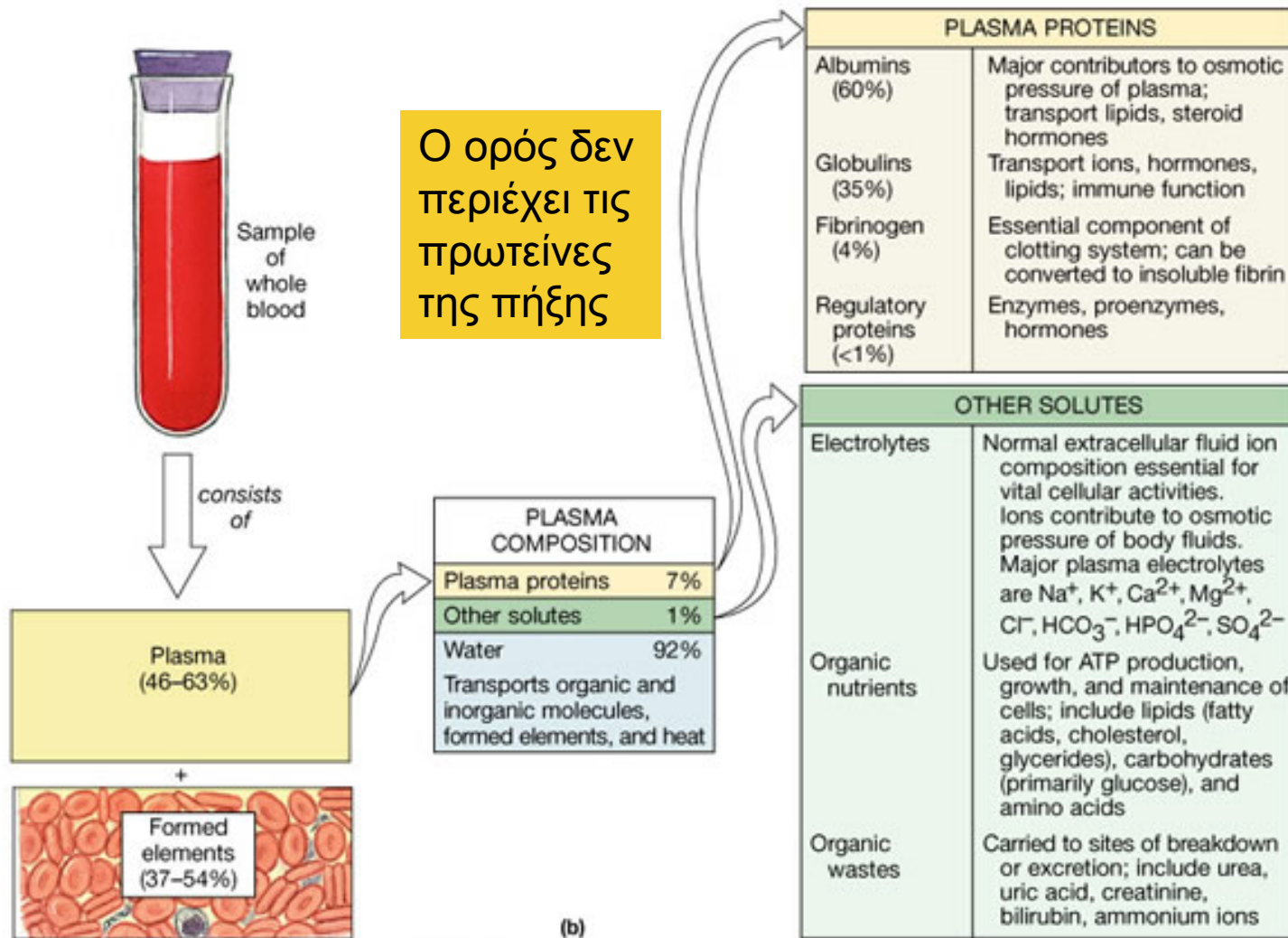


Βιολογικά δείγματα - Αίμα

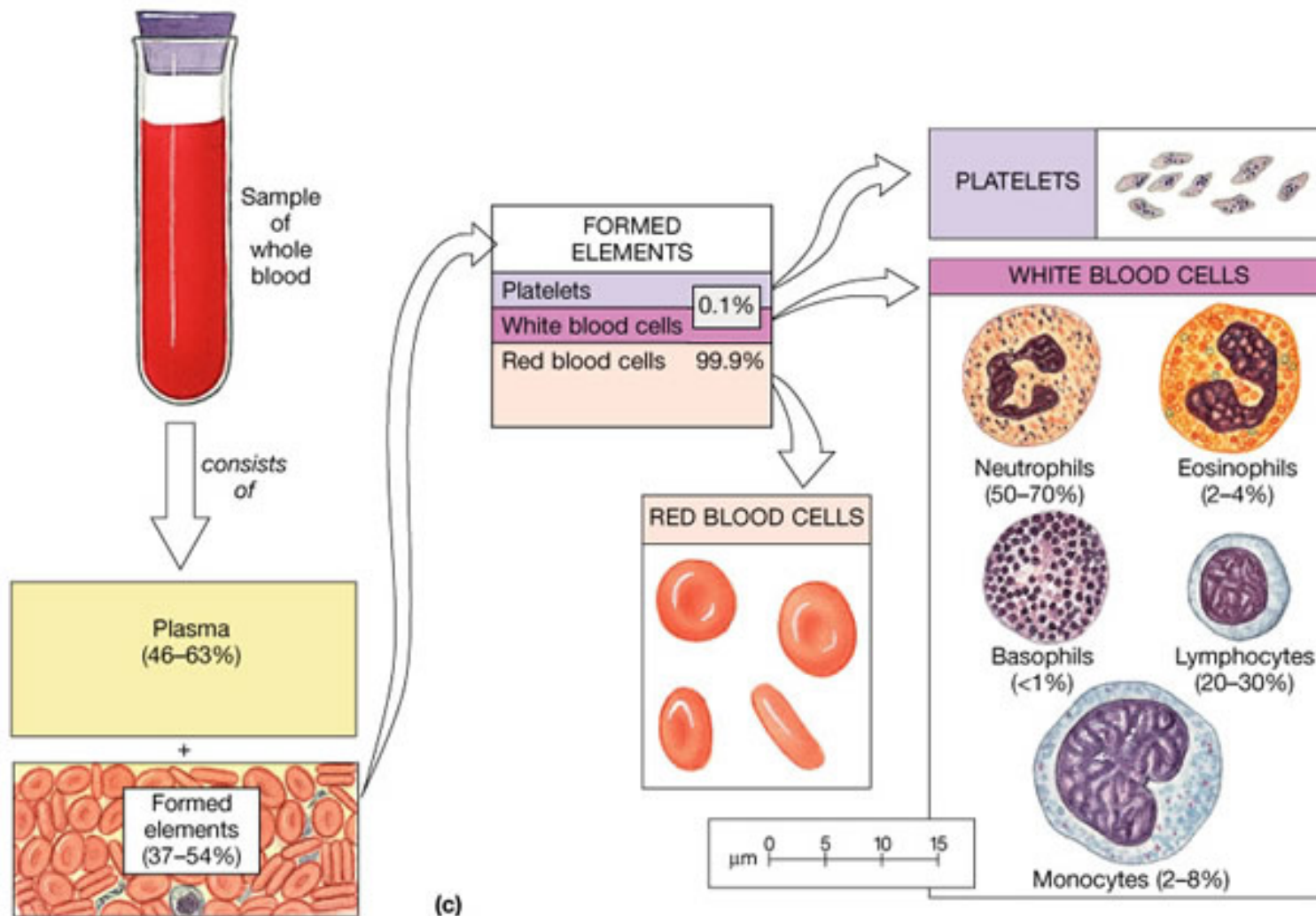
- Ολικό αίμα (σπάνια χρησιμοποιείται, κυρίως προσδιορισμό του pH, αιμοσφαιρίνης)
- Πλάσμα (ο σωλήνας περιέχει αντιπηκτικό, ακολουθεί φυγοκέντρηση, παραλαβή πλάσματος)
- Ορός (ο σωλήνας με το αίμα παραμονή 1 ώρα, ακολουθεί φυγοκέντρηση, παραλαβή ορού)



Βιολογικά δείγματα - Αίμα



Βιολογικά δείγματα - Αίμα



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΥΡΙΑΣ

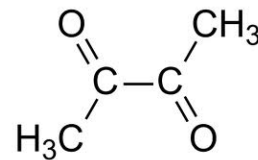
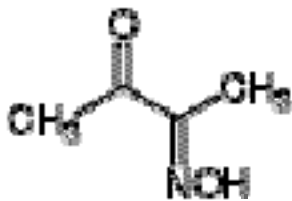
- Η ουρία είναι το κυριότερο τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πρωτεϊνών
- Ο σχηματισμός της ουρίας (τρόπος απέκκρισης της τοξικής αμμωνίας) γίνεται κυρίως στο ήπαρ
- Η ουρία δεν είναι τοξική, είναι υδατοδιαλυτή και διαχέεται μέσω των βιολογικών μεμβρανών και αποβάλλεται από τα νεφρά
- Ο προσδιορισμός της αποτελεί χρήσιμο δείκτη της ηπατικής και νεφρικής λειτουργίας



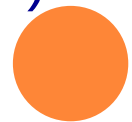
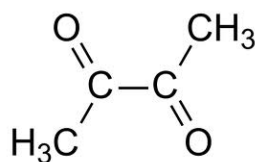
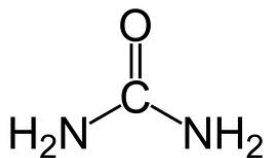
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΥΡΙΑΣ

- Η ουρία στον ορό προσδιορίζεται με δυο τρόπου
 - Άμεση χημική μέθοδο
 - Έμμεση ενζυμική μέθοδο
- Προσδιορισμός με άμεση χημική μέθοδο

διακετυλομονοξίμη + νερό $\rightarrow$ διακετύλιο + υδροξυλαμίνη



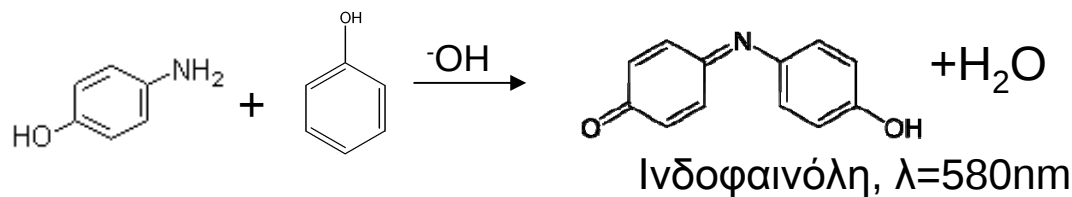
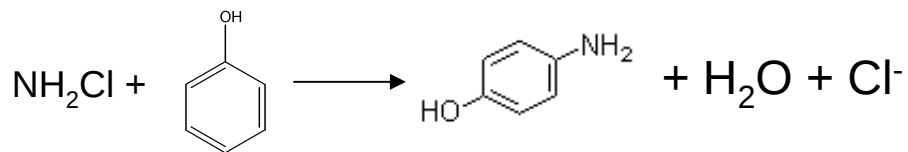
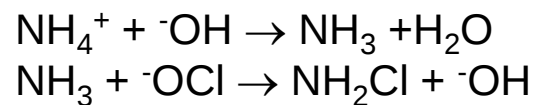
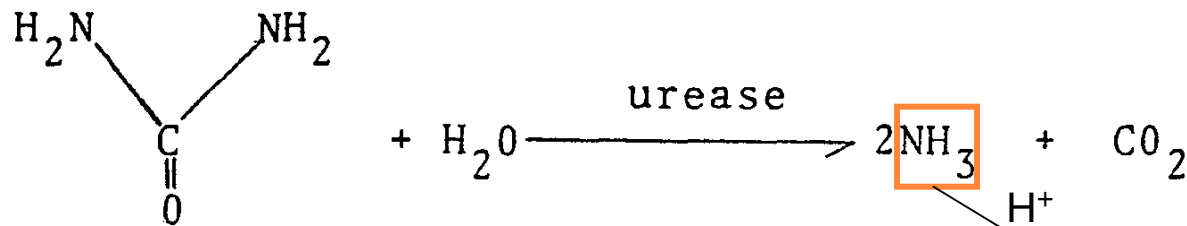
ουρία + διακετύλιο $\rightarrow$ παράγωγο διαζίνης ($\lambda=475$ nm)



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΥΡΙΑΣ

- Προσδιορισμός με έμμεση ενζυμική μέθοδο

Η ουρία με τη δράση του ενζύμου ουρεάση υδρολύεται προς διοξείδιο του άνθρακα και αμμωνία



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

- Στον ορό μπορούν να προσδιοριστούν >>100 διαφορετικές πρωτεΐνες
- Συνήθως προσδιορίζεται η ολική πρωτεΐνη και περίπου 10-15 πρωτεΐνες (αλβουμίνη, σφαιρίνες, ινοδογώνιο, ...)
- Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι (μέθοδος Lowry, Bradford,.....)



Πρωτεΐνες αίματος

Πρωτεΐνη	C (g/dL)	%	Βασικός ρόλος
Ολική πρωτεΐνη	6,0 – 8,0		
Αλβουμίνη	3,5-5,0	~ 60	Μεταφορά άλλων μορίων (λιποειδών)
Ανοσοσφαιρίνες	1,0 - 1,5	~ 18	Ανοσοποιητικό σύστημα
Άλλες σφαιρίνες	1,0 - 2,0	~ 18	Πρωτεΐνες μεταφοράς, πρωτεΐνες οξείας φάσης,...
Ινωδογόνο	0,2 -0,45	~ 4	Πήξη αίματος
Ρυθμιστικές πρωτεΐνες		< 1	Ένζυμα, πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων.....



Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνών στο κλινικό εργαστήριο

- Ποσοτικό προσδιορισμός ολική πρωτεΐνης
(παραδοχή ότι όλες οι πρωτεΐνες αντιδρούν με τον ίδιο τρόπο)
- Ποσοτικός προσδιορισμός αλβουμίνης και σφαιρινών (α, β και γ)
αλβουμίνη => δείκτης ηπατικής/νεφρικής λειτουργίας, διαιτητικής πρόσληψης πρωτεϊνών, ...
σφαιρίνες => δείκτης μόλυνσης ή διάφορων ασθενειών π.χ. πολλαπλό μυέλωμα,.....
- Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση
(όταν η ολική πρωτεΐνη ή η αλβουμίνη είναι εκτός φυσιολογικών τιμών)
- Εξειδικευμένοι ποσοτικοί προσδιορισμοί συγκεκριμένων πρωτεϊνών με ανοσοχημικές μεθόδους
- Ταυτοποίηση μη φυσιολογικών πρωτεϊνών



Αλβουμίνη

Τιμές αναφοράς: 3.5-5.0 g/dL

- ο διατηρεί την πίεση πλάσματος ώστε να αποφεύγεται η μετακίνηση υγρού στους ιστούς
- ο εμπλέκεται στη μεταφορά και αποθήκευση μιας ευρείας ποικιλίας λιποδιαλυτών μορίων (π.χ στεροειδών ορμονών,.....)
- ο αποτελεί πηγή ενδογενών αμινοξέων
- ο δεσμεύει διάφορες ενώσεις, όπως χολερυθρίνη, ασβέστιο, λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, τοξικά ιόντα βαρέων μετάλλων,.....

Η υποαλβουμιναιμία προκαλείται από διάφορους παράγοντες:

- μειωμένη βιο-σύνθεση οφειλόμενη είτε σε ηπατική νόσο (πρωτογενής)
- σε μειωμένη πρόσληψη πρωτεΐνης (δευτερογενής)
- αυξημένο καταβολισμό ως αποτέλεσμα βλάβης και φλεγμονής ιστού, δυσαπορρόφηση αμινοξέων και αυξημένη νεφρική απέκκριση (π.χ., νεφρωσικό σύνδρομο).

Η υπεραλβουμιναιμία έχει μικρή διαγνωστική σημασία εκτός από την περίπτωση της αφυδάτωσης.

Σφαιρίνες

Τιμές αναφοράς: 1.5 – 3 g/dL

Οι σφαιρίνες παίζουν σημαντικό ρόλο :

- ο στη λειτουργία του ήπατος,
- ο στην πήξη του αίματος
- ο και στην καταπολέμηση των λοιμώξεων

Υπάρχουν τέσσερις κύριοι τύποι σφαιρινών:

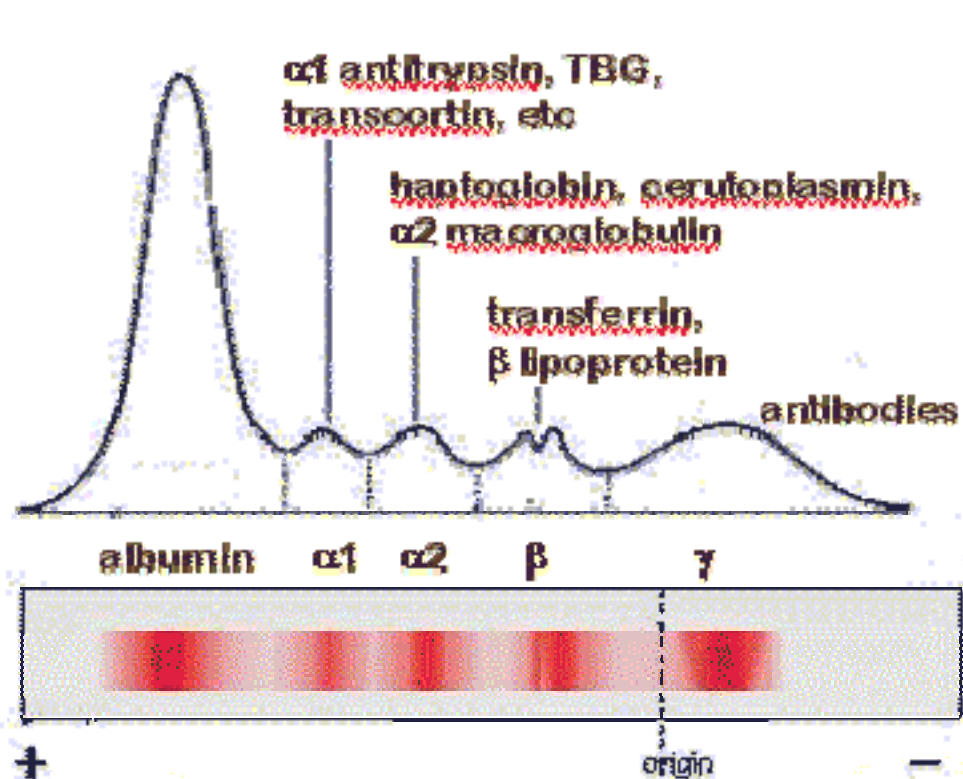
- ο α 1
- ο α 2
- ο β
- ο γ

Τα τεστ σφαιρίνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να βοηθήσουν στη διάγνωση ποικίλων καταστάσεων, όπως:

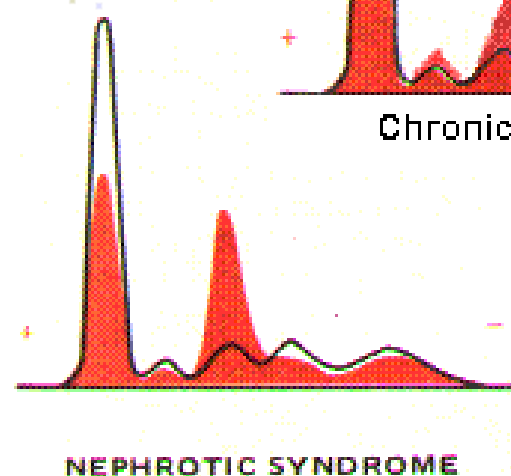
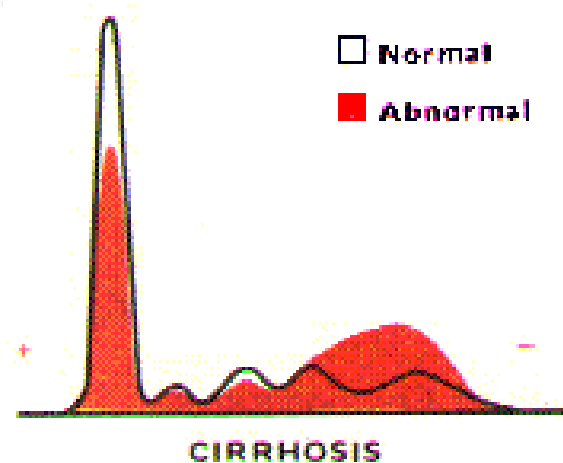
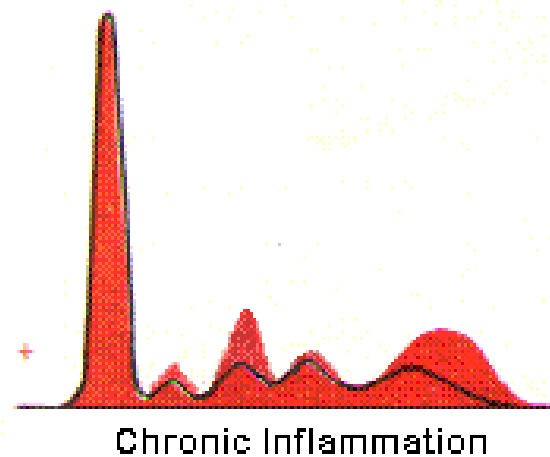
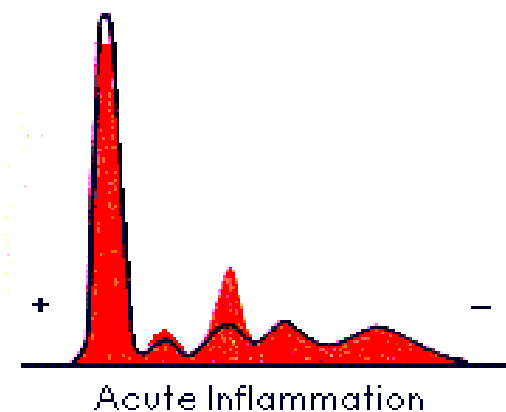
- ο Ηπατική βλάβη ή ασθένεια
- ο Νεφρική Νόσος
- ο Διατροφικά προβλήματα
- ο Αυτοάνοσες διαταραχές
- ο Ορισμένα είδη καρκίνου



Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών αίματος



□ Normal
■ Abnormal



Μέθοδος Bradford – ολικής πρωτεΐνης

Η χρωστικής Coomassie blue G250 σε όξινο περιβάλλον δεσμεύεται στις πρωτεΐνες.

Η χρωστική έχει διαφορετικές μορφές ιονισμού σε όξινο περιβάλλον: θετικά φορτισμένες: **κόκκινη μορφή** ($\lambda_{\max}=470 \text{ nm}$), **πράσινη μορφή** ($\lambda_{\max}=650 \text{ nm}$)

αρνητικά φορτισμένη: **μπλε μορφή** ($\lambda_{\max}=590 \text{ nm}$)

Η μπλε μορφή δεσμεύεται στις πρωτεΐνες (κυρίως λυσίνη αργινίνη)
=> μέτρηση στα 595 nm

- πλεονεκτήματα => γρήγορη, ανιχνεύει 1 – 10 μg πρωτεΐνης
- μειονεκτήματα => καταστρέφεται το δείγμα, εξαρτάται από τον αριθμό των κατιονικών αμινοξέων

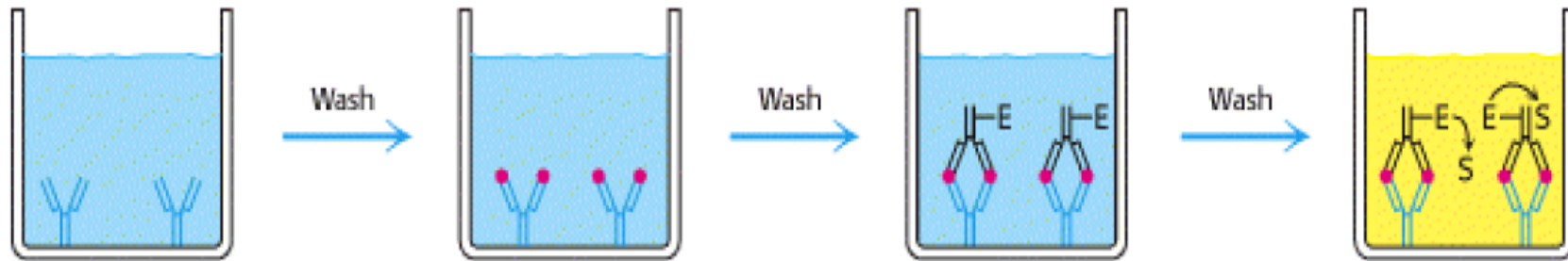


Ανοσοχημικές μέθοδοι

Χρήση αντισωμάτων (ανοσοσφαιρίνες), εξειδικευμένες πρωτεΐνες που συνθέτει ο οργανισμός για να δεσμεύσει ένα αντιγόνο

τύπου sandwich:

E: ένζυμο
S: υπόστρωμα



Αντίσωμα
ακινητοποιημένο
σε στερεή
επιφάνεια

Το αντιγόνο
(προσδιοριζόμεν
η πρωτεΐνη)
δεσμεύεται στο
αντίσωμα

Το δεύτερο
αντίσωμα
(περιέχει το E)
δεσμεύεται στο
αντιγόνο

Προστίθεται το
S το οποίο
μετατρέπεται
στο έγχρωμο
προϊόν με τη
δράση του
ενζύμου

- πλεονέκτημα => μεγάλη εξειδίκευση, ανιχνεύει ng πρωτεΐνης
- μειονέκτημα => μεγάλο κόστος



Γλυκόζη

Τιμές Αναφοράς: 70 -110 mg/dL

- Η γλυκόζη είναι ένα ευρέως διαδεδομένο «καύσιμο» του οργανισμού
- Αποθήκευση με τη μορφή του γλυκογόνου
- Μέσω της γλυκόλυσης και αργότερα στις αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος (TCAC), η γλυκόζη οξειδώνεται για να σχηματίσει τελικά διοξείδιο του άνθρακα και νερό, αποδίδοντας ενέργεια, κυρίως με τη μορφή ATP.

Επίπεδα στα όρια 110-126 mg/dL υποδηλώνουν πρόβλημα μεταβολισμού γλυκόζης

Συγκεντρώσεις που ξεπερνούν τα 126 mg/dL είναι διαγνωστικές διαβήτη



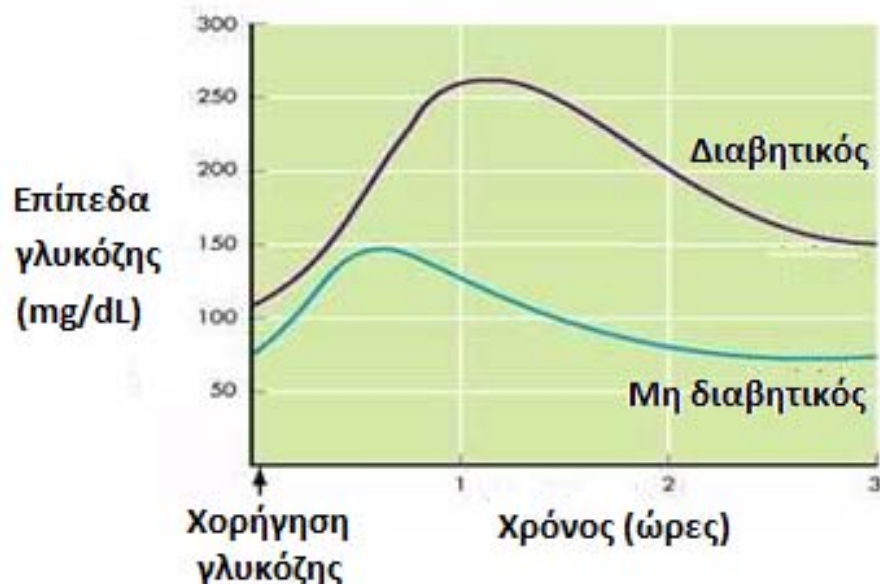
Δοκιμασία Ανοχής Γλυκόζης – Καμπύλη Σακχάρου

Χορηγούνται από του στόματος 75gr διαλύματος γλυκόζης
Λήψεις αίματος για προσδιορισμό γλυκόζης και ινσουλίνης σε χρόνους
0', 30', 60', 90', 120', 180'.

Τιμές Αναφοράς:
στο χρόνο 0' < 115mg/dl
στα 60' < 160 mg/dl
στα 120' < 140 mg/dl
στα 180' < 130 mg/dl.

Υποψία παθολογικής ανοχής στη
γλυκόζη

Διάγνωση του σακχαρώδη
διαβήτη τίθεται όταν τα βασικά
επίπεδα γλυκόζης είναι >
140mg/dl ή όταν τα επίπεδα
γλυκόζης ξεπερνούν >200mg/dl
σ' έναν από τους χρόνους.



Γλυκοζηλιωμένη Αιμοσφαιρίνη (HbA1 και HbA1c)

Τιμές Αναφοράς: HbA1c : 4,5-5,9 % HbA1 : 5,4-7,2 %.

- Η γλυκοζηλιωμένη αιμοσφαιρίνη σχηματίζεται από την μη αναστρέψιμη δέσμευση της γλυκόζης στην αιμοσφαιρίνη A1
- Τα επίπεδά της εξαρτώνται από τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα
- Η μέτρηση της γλυκοζηλιωμένης αιμοσφαιρίνης παρέχει εκτίμηση των επιπέδων γλυκόζης το προηγούμενο διάστημα 8-12 εβδομάδων
- Η ολική γλυκοζηλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA1) διαχωρίζεται σε τρία κλάσματα HbA1a, HbA1b, HbA1c.

Οι τιμές γλυκοζηλιωμένης αιμοσφαιρίνης χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση μακροχρόνιας ρύθμισης των επιπέδων γλυκόζης σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη



Χοληστερόλη

Τιμές Αναφοράς:

επιθυμητά <200 mg/dL, οριακά 200-239 mg/dL υψηλά > 240 mg/dL

Τιμές Αναφοράς: HDL: 35 - 90 mg/dL, LDL: 83 -150 mg/dL

- Απαραίτητο συστατικό των μεμβρανών
- Πρόδρομο μόριο στεροειδών ορμονών και χολικών οξέων
- Προσλαμβάνεται από την τροφή παράγεται από όλους τους ιστούς
- 65-70% LDL, 10-15 % VLDL, 20% HDL

Αυξημένα επίπεδα σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για αθηροσκλήρωσης και στεφανιαίας νόσου



Τριγλυκερίδια – Τριακυλογλυκερόλες

Τιμές Αναφοράς: 10 -210 mg/dL

- Εστέρες λιπαρών οξέων με γλυκερόλη
- 95% αποθηκευμένου λίπους στους ιστούς
- Τα TG της τροφής διασπώνται σε γλυκερόλη και ΛΟ με τη δράση της λιπάσης παρουσία χολικών οξέων=> ξανασυντίθενται για να σχηματίσουν τα χυλομικρά

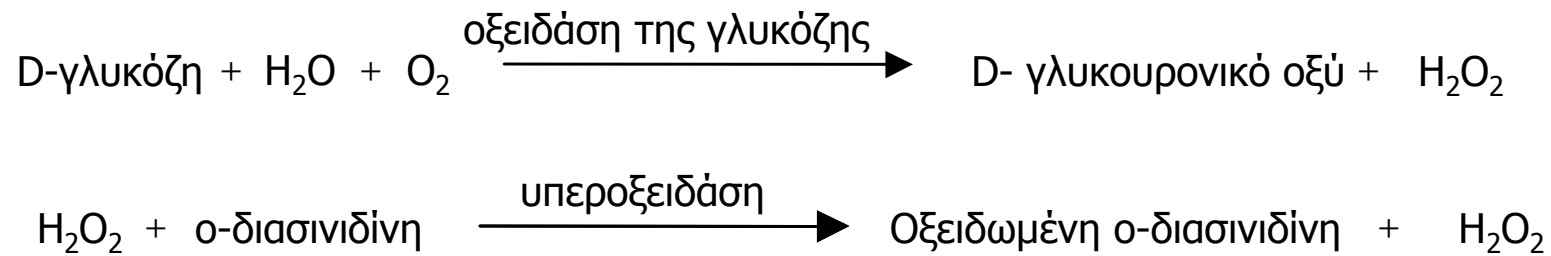
Χαρακτηρισμός υπερ-λιπιδαιμίας

Εκτίμηση παραγόντων κινδύνου στεφανιαίας νόσου



Προσδιορισμός γλυκόζης ενζυμικά

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος για την διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη
Φυσιολογικές τιμές 80 - 120 mg/dl.



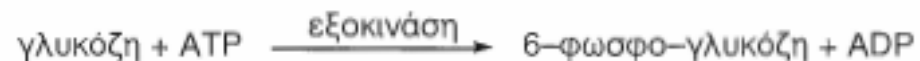
$\lambda = 510 \text{ nm}$



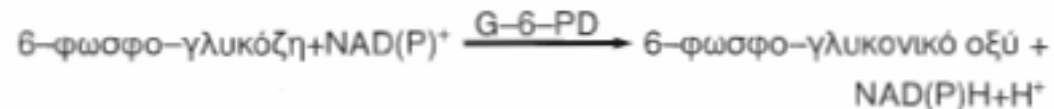
Προσδιορισμός γλυκόζης - Εξοκινάση

4α. Προσδιορισμός της γλυκόζης με τη μέθοδο της εξοκινάσης

Η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται παρουσία ATP και ιόντων Mg^{2+} , από την εξοκινάση.



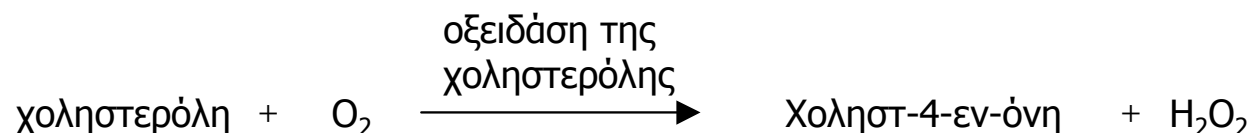
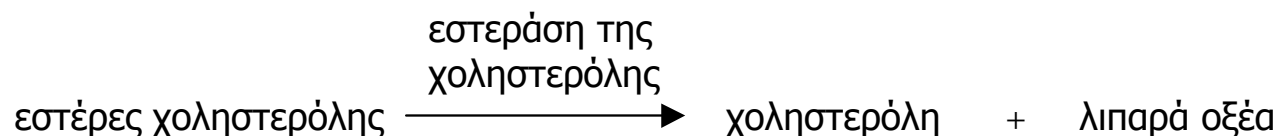
Η 6-φωσφο-γλυκόζη που σχηματίζεται, οξειδώνεται στη συνέχεια από την αφυδρογονάση της 6-φωσφο-γλυκόζης (G-6-PD) παρουσία του $NADP^+$.



Προσδιορισμός χοληστερόλης ενζυμικά

Φυσιολογικές Τιμές

Ενήλικες	Επιθυμητά επίπεδα	< 200 mg/dl
	Οριακά	200-239 mg/dl
	Ψηλά	> 240 mg/dl
Παιδιά	Επιθυμητά	< 170 mg/dl
	Οριακά	171-199 mg/dl
	Υψηλά	> 200 mg/dl.



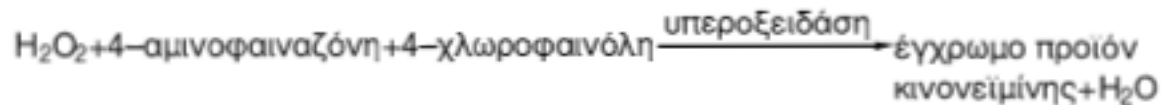
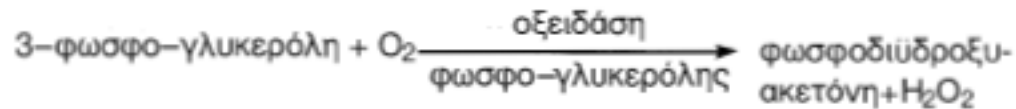
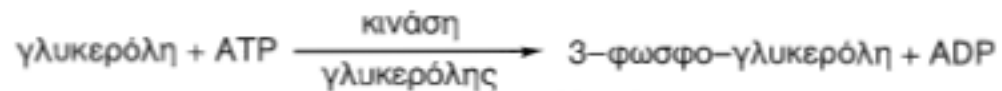
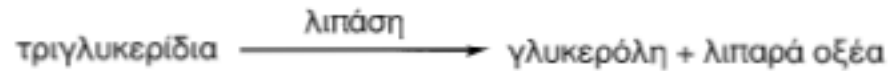
$\lambda = 510 \text{ nm}$



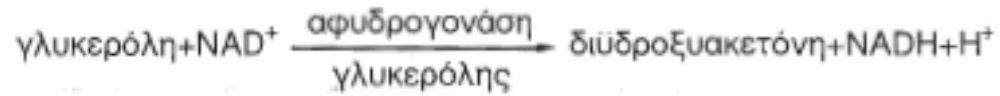
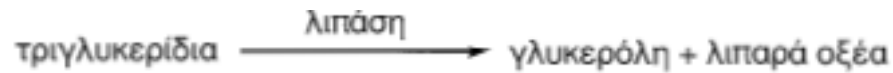
Πίνακας VI: Αρχή των μεθόδων ανάλυσης των τριγλυκεριδίων.

α/α Μεθόδου	Αρχή του προσδιορισμού
A	1. Εκχύλιση TGI με οργανικό διαλύτη Απομάκρυνση PL με προσρόφηση
	2. $\text{TGI} \xrightarrow{\text{ROH/OH}^-} \text{γλυκερόλη}$
	3. $\text{γλυκερόλη} + \text{IO}_4^- \longrightarrow \text{HCHO} + \text{HCOOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{IO}_3^-$
	4. $\text{HCHO} + \text{χρωμοτροπικό οξύ} + \text{H}_2\text{SO}_4 \longrightarrow \text{χρωμοφόρο}$
B	1-3 όπως στη μέθοδο A 4. $\text{HCHO} + \text{NH}_4^+ + \text{ακετυλακετόνη} \longrightarrow \text{3,5-διακετυλο-1,4 διϋδρολουτιδίνη (φθορίζον)}$
Γ	1-2 όπως στη μέθοδο A
	3. $\text{γλυκερόλη} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{GK}} \text{3-φωσφο-γλυκερόλη} + \text{ADP}$
	4. $\text{3-φωσφο-γλυκερόλη} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{G-3-PD}} \text{φωσφοδιϋδροξυ-ακετόνη} + \text{NADH} + \text{H}^+$
	1-3 όπως στη μέθοδο Γ
Δ	4. $\text{ADP} + \text{φωσφοενολοπυροσταφυλικό} \xrightarrow{\text{PK}} \text{ATP} + \text{πυροσταφυλικό}$
	5. $\text{πυροσταφυλικό} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LD}} \text{γαλακτικό} + \text{NAD}^+$
E	1. $\text{TGL} \xrightarrow{\text{λιπάση}} \text{γλυκερόλη}$ 2-5 όπως στη μέθοδο Δ ή 2-4 όπως στη μέθοδο Γ
ΣΤ	1-2 όπως στη μέθοδο A ή 1 όπως στη μέθοδο E
	$\text{γλυκερόλη} + \text{NAD}^+ \xrightarrow[\text{γλυκερόλης}]{\text{αφυδρογονάση}} \text{διϋδροξυακετόνη} + \text{NADH} + \text{H}^+$
Z	1. $\text{TGL} \xrightarrow{\text{λιπάση}} \text{γλυκερόλη}$
	2. $\text{γλυκερόλη} + \text{O}_2 \xrightarrow[\text{γλυκερόλης}]{\text{οξειδάση}} \text{διϋδροξυακετόνη} + \text{H}_2\text{O}_2$
	3. $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{παράγωγο φαινόλης} + \text{4-αμινοαντιπυρίνη} \xrightarrow{\text{HPO}} \text{χρωμοφόρο}$

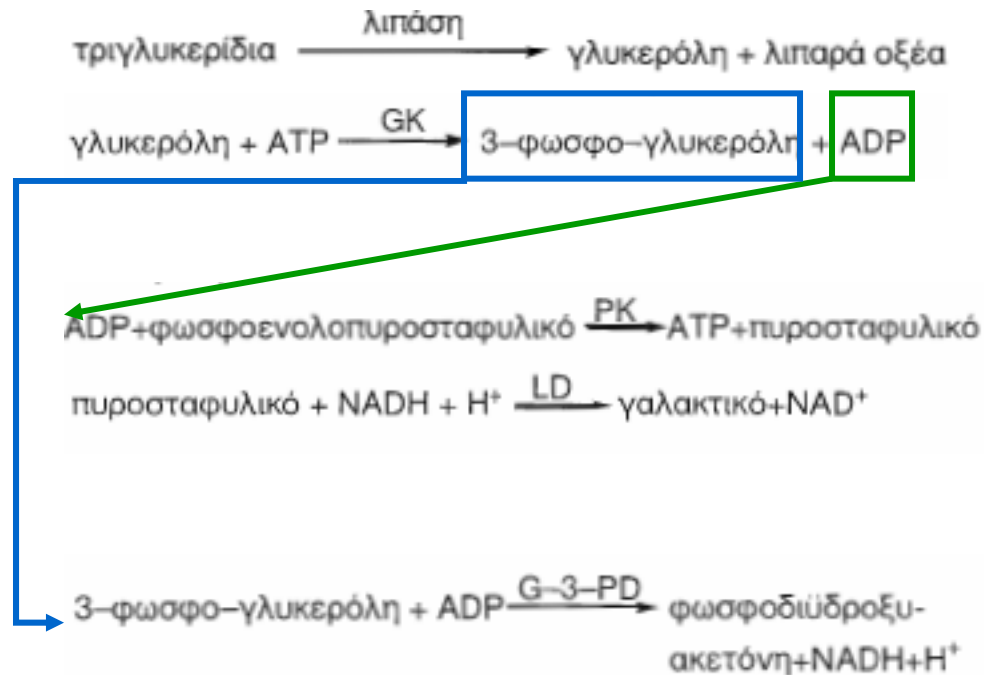
Προσδιορισμός Τριγλυκεριδίων



Προσδιορισμός Τριγλυκεριδίων

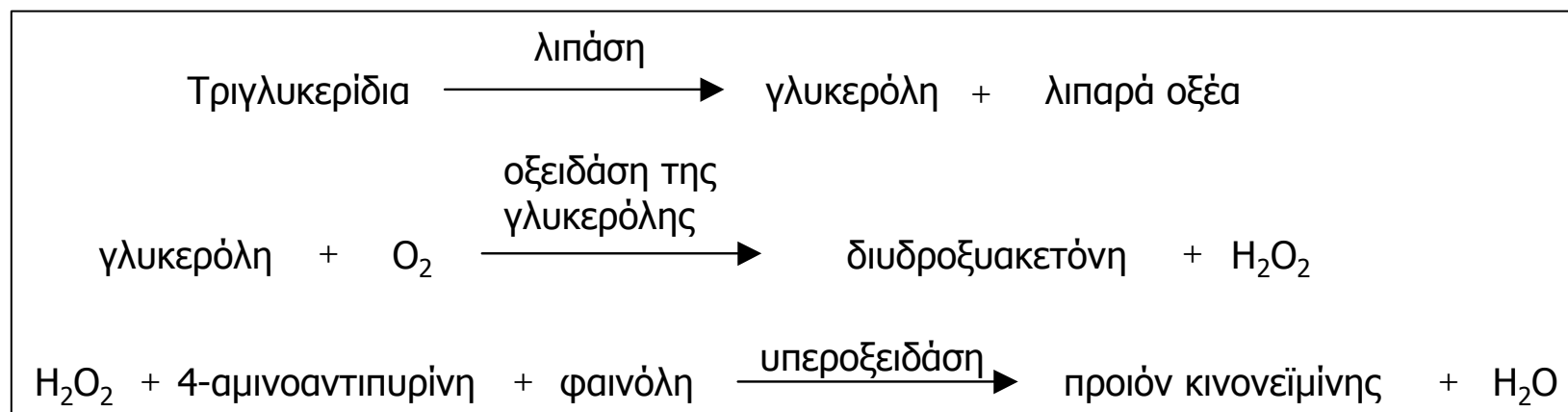


Προσδιορισμός Τριγλυκεριδίων



Προσδιορισμός τριγλυκεριδίων ενζυμικά

Φυσιολογικές τιμές 20 - 200 mg/dl.

 $\lambda = 510 \text{ nm}$