

Αθανάσιος Α. Παναγιωτόπουλος

Αναλύσεις Κλινικής Χημείας

 ΕΚΔΟΣΕΙΣ
ΖΗΤΗ

ISBN 978-960-456-495-8

© Copyright: Α. Παναγιωτόπουλος, Εκδόσεις ΖΗΤΗ, Θεσσαλονίκη, Οκτώβριος 2017

Το παρόν έργο πνευματικής ιδιοκτησίας προστατεύεται κατά τις διατάξεις του ελληνικού νόμου (Ν.2121/1993 όπως έχει τροποποιηθεί και ισχύει σήμερα) και τις διεθνείς συμβάσεις περί πνευματικής ιδιοκτησίας. Απαγορεύεται απολύτως η άνευ γραπτής άδειας του εκδότη κατά οποιοδήποτε τρόπο ή μέσο αντιγραφή, φωτοανατύπωση και εν γένει αναπαραγωγή, εκμίσθωση ή δανεισμός, μετάφραση, διασκευή, αναμετάδοση στο κοινό σε οποιαδήποτε μορφή (ηλεκτρονική, μηχανική ή άλλη) και η εν γένει εκμετάλλευση του συνόλου ή μέρους του έργου.

Φωτοστοιχειοθεσία
Εκτύπωση
Βιβλιοδεσία

Π. ΖΗΤΗ & Σια ΙΚΕ

18ο χλμ Θεσ/νίκης-Περαίας
Τ.Θ. 4171 • Περαία Θεσσαλονίκης • Τ.Κ. 570 19
Τηλ.: 2392.072.222 - Fax: 2392.072.229 • e-mail: info@ziti.gr



www.ziti.gr

ΒΙΒΛΙΟΠΩΛΕΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ:

Αρμενοπούλου 27, 546 35 Θεσσαλονίκη
Τηλ.: 2310.203.720, Fax: 2310.211.305 • e-mail: sales@ziti.gr

ΒΙΒΛΙΟΠΩΛΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ:

Χαριλάου Τρικούπη 22, 106 79 Αθήνα
Τηλ.-Fax: 210.3816.650 • e-mail: athina@ziti.gr

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΒΙΒΛΙΟΠΩΛΕΙΟ: www.ziti.gr

Πρόλογος

Ως κλινική χημεία ορίζεται ο κλάδος της χημείας που ασχολείται με την ανάλυση των σωματικών υγρών καθώς επίσης και με τη βιοχημική ερμηνεία των αποτελεσμάτων που προκύπτουν. Στο βιβλίο παρουσιάζεται τόσο το θεωρητικό υπόβαθρο όσο και η πειραματική πορεία χημικών δοκιμασιών και αναλύσεων.

Πιο συγκεκριμένα, αναλύονται οι παράμετροι των βιοχημικών αναλύσεων, ο τρόπος λειτουργίας του βιοχημικού αναλυτή και η διαδικασία λήψης των αποτελεσμάτων αυτών, οι παράμετροι των αιματολογικών εξετάσεων, ο τρόπος λειτουργίας του αιματολογικού αναλυτή καθώς επίσης και η πειραματική πορεία που ακολουθείται. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται η βιοχημεία της πήξης του αίματος, οι αρχές λειτουργίας του οργάνου εξέτασης της πήξης όπως επίσης και η πειραματική πορεία που ακολουθείται για τη λήψη των αντίστοιχων αποτελεσμάτων. Επιπλέον, παρουσιάζεται το θεωρητικό υπόβαθρο και η πειραματική πορεία του προσδιορισμού της ταχύτητας καθίζησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, της γενικής εξέτασης ούρων, της καλλιέργειας ούρων, της κατασκευής των αντιβιογραμμάτων, της χρώσης κατά Gram, του τεστ κυήσεως, των οροαντιδράσεων Widal και Wright και του Monotest ανίχνευσης λοιμώδους μονοπυρήνωσης.

Οι «Αναλύσεις Κλινικής Χημείας» είναι ένας σύγχρονος εργαστηριακός οδηγός και απευθύνεται τόσο στους φοιτητές της ιατρικής, χημείας, βιολογίας, βιοχημείας, αλλά και σε όσους εργάζονται σε βιοχημικά και αιματολογικά εργαστήρια. Στο παρόν σύγγραμμα θεωρία και πείραμα, αποτέλεσμα και ερμηνεία συνδυάζονται μοναδικά και προσφέρουν στον αναγνώστη και ερευνητή την πλήρη εικόνα κάθε βιοχημικής ανάλυσης.

Περιεχόμενα

I. Εισαγωγή 15

Απομόνωση του αίματος	15
Αιματολογικές εξετάσεις	16
Βιοχημικές αναλύσεις	16
Ανάλυση ηλεκτρολυτών	17
Γενική εξέταση αίματος	17
Εξέταση της πήξης του αίματος	18
Ταχύτητα Καθίζησης Ερυθρών Αιμοσφαιρίων (ΤΚΕ)	18
Γενική εξέταση ούρων	18
Καλλιέργεια ούρων	23
Αντιβιογράμματα	24
Χρώση κατά Gram	24
Τεστ Κύησης	25
Οροαντιδράσεις Widal και Wright	26
Monotest λοιμώδους μονοπυρήνωσης	26

2. Θεωρία 27

Βιοχημικές Αναλύσεις	27
1. Αλδολάση (Aldolase, ADL)	27
2. Αλβουμίνη ορού (ALB)	29
3. Αμινοτρανσφεράση ασπαρτική (AST, SGOT)	31
4. Αμινοτρανσφεράση αλανίνης (ALT, SGPT)	34
5. Αμυλάση (Amylase, AMS)	37

6. Γαλακτική Δεϋδρογενάση LDH	38
7. γ-Γλουταμυλική Τρανσπεπτιδάση γ-GT	42
8. Γλυκόζη (σάκχαρο) αίματος (GLU)	44
9. Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη	46
10. Κρεατινίνη (CRE)	48
11. Κρεατινική Κινάση (CK)	49
12. Κρεατική Φωσφοκινάση MB	52
13. Λιπάση ορού (LSP)	52
14. Ουρία αίματος (URE)	54
15. Ουρικό οξύ ορού (URCA)	57
16. Χολερυθρίνη ορού	60
17. Χοληστερόλη	63
18. Φερριτίνη Ορού (FER)	67
19. Ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα (TIBC)	68
20. Χολινεστεράση (Cholinesterase)	70
21. C-Δραστική πρωτεΐνη (CRP)	71
22. Ολικές πρωτεΐνες	71
23. Τριγλυκερίδια ορού (TRI)	73
24. Αλκαλική Φωσφατάση (ALP)	76
Ανάλυση ηλεκτρολυτών	80
1. Κάλιο ορού (K^+)	80
2. Μαγνήσιο αίματος (Mg^{+2})	81
3. Νάτριο ορού (Na^+)	83
4. Ιόντα χλωρίου (Cl^-)	84
5. Ασβέστιο ορού (Ca^{+2})	85
6. Φώσφορος ορού (P)	87
7. Σίδηρος αίματος (Fe)	90
Πρότυπα	92
Γενική εξέταση αίματος	94
1. Λευκά Αιμοσφαίρια	94
2. Ουδετερόφιλα κύτταρα	96
3. Λεμφοκύτταρα	100
4. Μονοπύρρηνα / Μονοκύτταρα	102

5. Ηωσινόφιλα / Εοσινόφιλα	104
6. Βασεόφιλα	106
7. Ερυθρά αιμοσφαίρια	107
8. Αιμοσφαιρίνη	113
9. Αιματοκρίτης	116
10. Μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων MCV (Mean Cell Volume)	117
11. Μέση περιεκτικότητα Αιμοσφαιρίνης MCH (Mean Cell Haemoglobin)	117
12. Μέση πυκνότητα Αιμοσφαιρίνης MCHC (Mean Cell Haemoglobin Concentration)	118
13. Εύρος κατανομής μεγέθους Ερυθρών αιμοσφαιρίων (με συντελεστή μεταβλητότητας) RDW-CV (Red Distribution Width - Coefficient Variation)	118
14. Αιμοπετάλια (PLT)	118
15. Μέσος όγκος αιμοπεταλίων MPV (Mean Platelet Volume)	121
16. Εύρος κατανομής μεγέθους Αιμοπεταλίων PDW (Platelet Distribution Width)	121
17. Αιμοπεταλιοκρίτης (PCT)	121
Εξέταση της πήξης του αίματος	122
1. Η βιοχημεία της πήξης του αίματος.	122
2. Χρόνος πήξης	132
3. Χρόνος πήξης επανασβεστωμένου πλάσματος ή Χρόνος Howell	132
4. Χρόνος προθρομβίνης (PT)	132
5. Διεθνής ομαλοποιημένη σχέση (INR)	135
6. Χρόνος Ενεργοποιημένης Μερικής Θρομβοπλαστίνης (APTT) και Χρόνος μερικής Θρομβοπλαστίνης (PTT)	136
Ταχύτητα Καθίζησης Ερυθρών Αιμοσφαιρίων (ΤΚΕ)	138
Γενική εξέταση ούρων	142
Α. Φυσικοί χαρακτήρες	142
1. Χροιά	142
2. Όψη	144
3. Οσμή	145
4. Ίζημα	147
5. Ειδικό βάρος	148
6. Αντίδραση (pH)	152

Β. Χημικοί χαρακτήρες	155
1. Χολερυθρίνη	155
2. Νιτρώδη	159
3. Γλυκόζη	161
4. Κετόνες	164
5. Λευκοκυτταρική εστεράση	168
6. Πρωτεΐνη	171
7. Αιμοσφαιρίνη	178
8. Ουροχολινογόνο	181
Γ. Μικροσκοπικοί χαρακτήρες	185
1. Επιθηλιακά Κύτταρα	185
2. Σταγονίδια Λίπους	187
3. Άμορφα άλατα	187
4. Βλέννη ούρων	189
5. Κρύσταλλοι ούρων	190
6. Ερυθρά αιμοσφαίρια	194
7. Κύλινδροι	195
8. Πυοσφαίρια	199
9. Μικροοργανισμοί	201
Καλλιέργεια ούρων	206
Αντιβιόγραμμα-Αντιβιοτικά	211
1. Ampicillin (AP)	211
2. Amoxicillin/clavulanic acid (AUG)	212
3. Piperacillin/tazobactam (PTZ)	213
4. Cefaclor (CFC)	214
5. Cefuroxime (CXM)	215
6. Ceftriaxone (CRO)	216
7. Aztreonam (ATM)	217
8. Amikacin (AN)	219
9. Imipenem (IMI)	220
10. Ciprofloxacin (CIP)	221
Χρώση κατά Gram	222
Τεστ Κύησης - Ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG)	225

Οροαντιδράσεις Widal και Wright	228
Σαλμονέλα	229
Βρουκέλλα	231
Monotest λοιμώδους μονοπυρήνωσης	235

3. Περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας 237

Φυγόκεντρος	237
Πειραματική διάταξη	237
Πειραματική διαδικασία	239
Βιοχημικός Αναλυτής	240
Πειραματική διάταξη	240
Πειραματική διαδικασία	246
Αιματολογικός Αναλυτής	250
Πειραματική διάταξη και μέθοδοι	250
Πειραματική διαδικασία	267
Αναλυτής Πήξης	277
Πειραματική διάταξη-Μέθοδος	277
Πειραματική Διαδικασία	285
Ταχύτητα Καθίζησης Ερυθρών Αιμοσφαιρίων (ΤΚΕ)	288
Μέθοδος και πειραματική διαδικασία	288
Ταινίες ανάλυσης ούρων	289
Μέθοδος και πειραματική διαδικασία	289
Μικροσκόπηση ούρων	292
Μέθοδος και πειραματική διαδικασία.	292
Καλλιέργεια ούρων	294
Πειραματική διαδικασία.	294
Παραγωγή οξειδάσης	296
Διάσπαση της λακτόζης	297
Παραγωγή καταλάσης	298
Αντιβιογράμματα	299
Πειραματική διαδικασία.	299

Χρώση κατά Gram	301
Πειραματική διαδικασία	301
Τεστ Κύησης	303
Αρχή της μεθόδου	303
Πειραματική διαδικασία	304
Οροαντιδράσεις Widal και Wright	306
Μέθοδος και πειραματική διαδικασία	306
Monotest λοιμώδους μονοπυρήνωσης	309
Μέθοδος και πειραματική διαδικασία	309

4. Βιβλιογραφία-Αναφορές..... 313

2

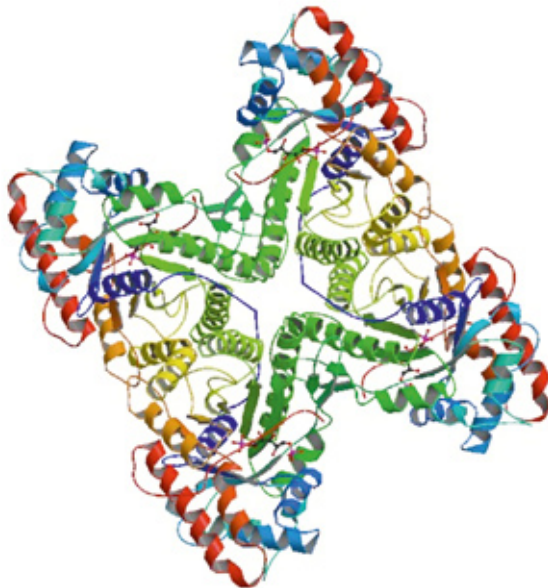
Θεωρία

Βιοχημικές Αναλύσεις

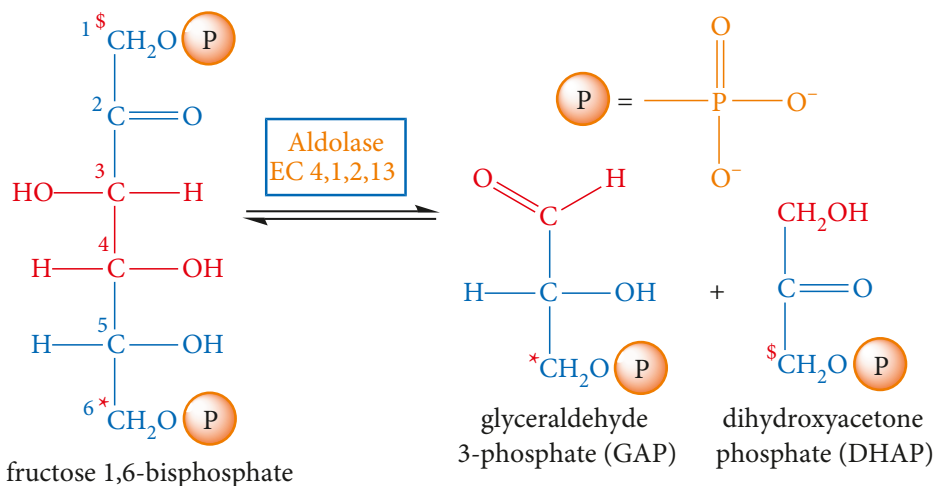
Στο τμήμα αυτό περιγράφεται η παθοφυσιολογία κάθε ουσίας του αίματος που προσδιορίζεται ποσοτικά σε μία βιοχημική ανάλυση, η κλινική χρησιμότητά της, τα φυσιολογικά επίπεδά της στον οργανισμό καθώς και η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της.

I. Αλδολάση (Aldolase, ADL)

Η αλδολάση είναι το ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης σε φωσφορική διϋδροξυακετόνη (DHAP) και σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη (GAP). Το ένζυμο αυτό παίρνει το όνομά του από την φύση της αντίστροφης αντίδρασης, την αλδολική συμπύκνωση. Η αντίδραση που καταλύεται από την αλδολάση αντιστρέφεται εύκολα κάτω από τις ενδοκυτταρικές συνθήκες.



Σχήμα 1:
Η δομή της ανθρώπινης
αλδολάσης.



Σχήμα 2: Η αντίδραση διάσπασης της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης που καταλύεται από την αλδολάση.

Η αλδολάση ανευρίσκεται σ' όλους τους ιστούς του σώματος. Είναι απαραίτητη για τη γλυκόλυση στους μυς ως «οδός ταχείας απάντησης» για την παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) ανεξάρτητα από την παροχή οξυγόνου στους ιστούς. Η ανάλυση αυτή δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται γιατί έχει αντικατασταθεί από την Κρεατινική Φωσφοκινάση (CPK). Υψηλά επίπεδα αλδολάσης ανευρίσκονται σε ασθενείς με προϊούσα μυϊκή δυστροφία (Duchenne). Χαμηλότερες τιμές παρατηρούνται σε άλλες νόσους των μυών, ενώ τα επίπεδα αλδολάσης είναι φυσιολογικά σε πολιομυελίτιδα, σκλήρυνση κατά πλάκας και βαριά ψευδοπααραλυτική μυασθένεια.

Αυξημένα επίπεδα του ενζύμου παρατηρούνται σε ασθένειες και παθολογικές καταστάσεις όπως η μυϊκή δυστροφία Duchenne, η δερματομυοσίτιδα, η μυοτονική δυστροφία, το έμφραγμα μυοκαρδίου, η γάγγραινα, η τριχίνωση, η οξεία ιογενής ηπατίτιδα, ο καρκίνος (πνευμόνων, μαστών, προστάτη και εγκεφάλου), τα μεταστατικά καρκινώματα ήπατος, η λευχαιμία, η μεγαλοβλαστική αναιμία, η αιμολυτική αναιμία, η μυοσφαιρινουρία, η οξεία ψύχωση, η σχιζοφρένεια, ο τέτανος, η λοιμώδης μονοπυρήνωση, η Νόσος του Mc Ardle, το ιστικό έμφρακτο και η οξεία παγκρεατίτιδα. Αντίθετα, μειωμένα επίπεδα της αλδολάσης παρατηρούνται σε άτομα με κληρονομική δυσανεξία φρουκτόζης.

Η αλδολάση αυξάνεται παρουσία αμινοκαπρικού οξέος, κλοφιμπράτης, καρμπενοξολόνης και εντομοκτόνων. Επίσης αυξάνεται κατά την αιμόλυση και τις ενδομυϊκές ενέσεις. Τέλος, η αλδολάση μειώνεται παρουσία φαινοθειαζινών.

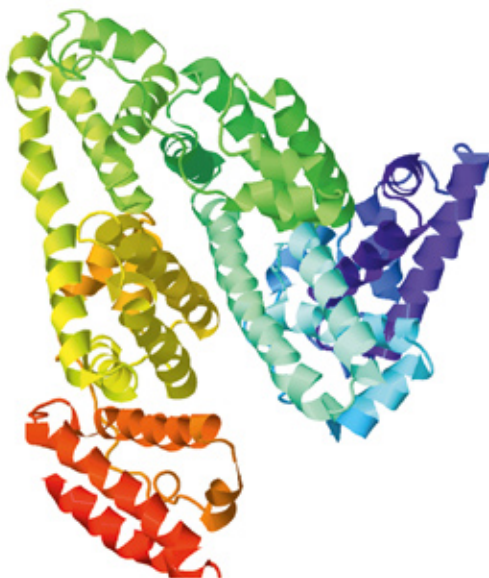
Φυσιολογικές Τιμές	
Ενήλικες	2-8 IU/L
Παιδιά	2-16 IU/L

2. Αλβουμίνη Ορού (ALB)

Η αλβουμίνη συντίθεται στα ηπατοκύτταρα και εισέρχεται στην κυκλοφορία διαμέσου της ηπατικής φλέβας. Η αλβουμίνη εισέρχεται ελεύθερα στον εξωαγγειακό χώρο και επανέρχεται στην κυκλοφορία διαμέσου των λεμφικών αγγείων. Η αλβουμίνη καταβολίζεται με πινοκύττωση στα τριχοειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα πολλών ιστών. Ο καταβολισμός ελαττώνεται στην περίπτωση υποαλβουμιναιμίας.

Η πρωταρχική λειτουργία της αλβουμίνης είναι η διατήρηση της κολλοειδικής οσμωτικής πίεσης τόσο στον αγγειακό όσο και στον εξωαγγειακό χώρο. Η πρωτεΐνη αυτή δεσμεύει και μεταφέρει μεγάλο αριθμό ουσιών, όπως ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια, μεταλλικά ιόντα, αμινοξέα, φάρμακα, ορμόνες και χολερυθρίνη. Η αλβουμίνη είναι απαραίτητη τόσο για τον μεταβολισμό όσο και για την αποτοξίνωση πολλών εξ αυτών των ουσιών.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η αλβουμίνη λειτουργεί ως πηγή αμινοξέων για τους περιφερικούς ιστούς, μεταφέροντας τα αμινοξέα που προέρχονται από την τροφή ή παρέχοντας αμινοξέα κατά τον καταβολισμό της. Η πρωτεΐνη αυτή είναι σημαντικό συστατικό της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας του πλάσματος, κυρίως με το να δεσμεύει ελεύθερα λιπαρά οξέα, δισθενή κατιόντα και χολερυθρίνη. Η αλβουμίνη δρα ως ρυθμιστικό διάλυμα σε παθολογικές καταστάσεις. Καθώς οι τιμές του pH του πλάσματος αυξάνονται πάνω από ή πέφτουν κάτω από τα φυσιολογικά όρια αυξάνεται και η ικανότητα της αλβουμίνης να δεσμεύει ελεύθερα ιόντα και άλλα φορτισμένα μόρια. Η δέσμευση της αλβουμίνης στις γλυκοπρωτεΐνες των



Σχήμα 2:
Η δομή
της αλβουμίνης.

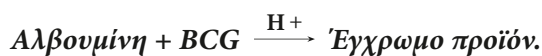
ενδοθηλιακών μεμβρανών αυξάνει τη διαπερατότητα των τριχοειδών για μικρές πρωτεΐνες που είναι σημαντικές για τον μεταβολισμό στον εξωαγγειακό χώρο. Η αλβουμίνη αναστέλλει την παραγωγή λευκοτριένης και ακτίνης αναστέλλοντας έτσι την φλεγμονώδη απάντηση των αιμοπεταλίων και ουδετεροφίλων.

Αυξημένα επίπεδα αλβουμίνης παρατηρούνται σε περιπτώσεις οξείας αφυδάτωσης, ενώ αντίθετα μειωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης παρατηρούνται σε ασθένειες και παθολογικές καταστάσεις όπως η αναλβουμιναιμία, το νεφρωσικό σύνδρομο, τα εγκαύματα, τα γαστροεντερικά και λεμφικά συρίγγια, η εντεροπάθεια από ευαισθησία στη γλουτένη, οι ρευματικές νόσοι η νέκρωση ιστών από όγκους, οι φλεγμονές, οι βακτηριδιακές λοιμώξεις, η αγγειίτιδα, η ελκώδης νόσο εντέρων, η υποξεία βακτηριακή ενδοκαρδίτιδα, η ορογονίτιδα, η οξεία και χρόνια νόσος του ήπατος, η αμυλοείδωση, η υποθρεψία, ο καρκίνος, η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, η περικαρδίτιδα, ο πυρετός και η τοξιναιμία, όπως επίσης και στην κύηση.

Τα επίπεδα της αλβουμίνης στο αίμα αυξάνονται παρουσία προγεστερόνης, αναβολικών στεροειδών και γλυκοκορτικοστεροειδών. Αντίθετα, μειώνονται παρουσία αλλοπουρινόλης, ασπαραγινάσης, δεξτράνης, οιστρογόνων, ισονιαζίδης, αντισυλληπτικών ουσιών και βαλπροϊκού οξέος.

Τα επίπεδα της αλβουμίνης πρέπει να προσδιορίζονται με σκοπό την παρακολούθηση ασθενών με οξεία ηπατική νόσο, ασθενών με ηπατική κίρρωση, τη διαγνωστική διερεύνηση οίδηματικών καταστάσεων και τον προγνωστικό παράγοντα σε υπερήλικες νοσηλευόμενους ασθενείς. Φυσιολογικές συγκεντρώσεις της αλβουμίνης για τον άνθρωπο κυμαίνονται μεταξύ 30-50 g/L (S.I.) ή 3-5 g/dL.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αλβουμίνης γίνεται φασματοφωτομετρικά. Πιο συγκεκριμένα, σε όξινο περιβάλλον η αλβουμίνη αντιδρά με τη χρωστική πράσινο της βρωμοκρεζόλης (BCG) και σχηματίζεται ένα έγχρωμο προϊόν. Η αύξηση της απορρόφησης στα 630 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αλβουμίνης στο δείγμα:



Πίνακας 3: Τα όρια των φυσιολογικών τιμών της συγκέντρωσης της αλβουμίνης.

	Όρια (g/dL)
<i>Ενήλικες</i>	3,4-4,8
<i>Νεογνά</i>	2,8-4,4
<i>4 ημερών-14 ετών</i>	3,8-5,4
<i>14-18 ετών</i>	3,2-4,5

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της αλβουμίνης χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρικού οξέος 230 mM (pH 4,2) και πράσινο της βρωμοκρεζόλης συγκέντρωσης 0,31 mM. Πραγματοποιείται φωτομέτρηση έναντι τυφλού σε αυτόματο αναλυτή σε μήκος κύματος 630 nm. Στον αυτόματο αναλυτή η θερμοκρασία θα πρέπει να είναι 37°C και ο ορός του αίματος που πρόκειται να αναλυθεί να μην είναι αιμολυμένος.

Πίνακας 4: Οι όγκοι των διαλυμάτων που απαιτούνται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της αλβουμίνης.

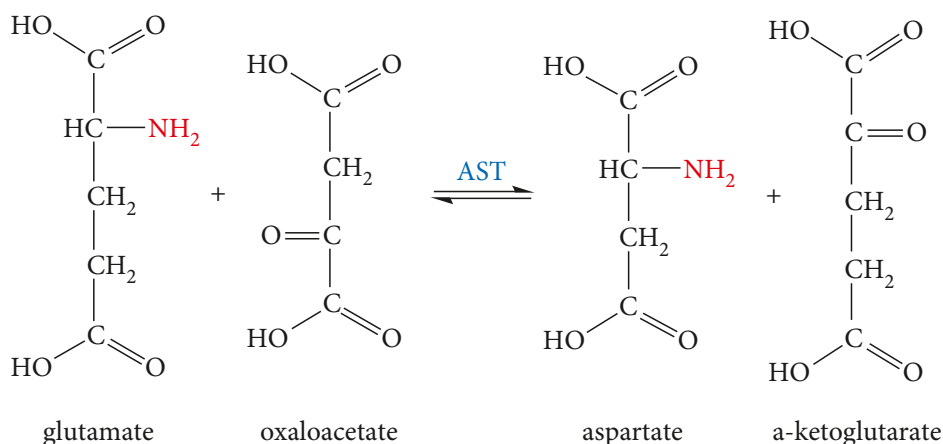
	Τυφλό	Δείγμα	Πρότυπο
<i>Δ/μα BCG</i>	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
<i>Πρότυπο δ/μα αλβουμίνης</i>	–	–	0,01 ml
<i>Δείγμα</i>	–	0,01 ml	–

Η συγκέντρωση της αλβουμίνης υπολογίζεται με βάση την ακόλουθη σχέση:

$$C_{\alpha\beta} = \frac{A_{\text{δείγματος}}}{A_{\text{προτύπου}}} \cdot C_{\text{προτύπου}}$$

3. Αμινοτρανσφεράση Ασπαρτική (AST, SGOT)

Η ασπαραγανική τρανσαμινάση (AST-Aspartate transaminase) ή ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (ASAT-Aspartate aminotransferase), γνωστή παλαιότερα και ως γλουταμινική οξαλοξική τρανσαμινάση ορού (SCOT-Serum Glutamyl Oxaloacetic Transaminase) είναι ένα ένζυμο που καταλύει την αλληλομετατροπή των αμινοξέων



Σχήμα 4: Η καταλυόμενη αλληλομετατροπή των αμινοξέων από την ασπαρτική αμινοτρανσφεράση.

και των κετοξέων με μεταφορά αμινομάδων και ειδικότερα καταλύει την ανταλλαγή της αμινομάδας του ασπαρτικού με την όξο-ομάδα του 2-κετογλουταρικού για τον σχηματισμό οξαλοξικού και γλουταμικού.

Η AST είναι ευρέως κατανεμημένη σε όλους τους ιστούς, με σημαντικές ποσότητες στην καρδιά και το ήπαρ. Μικρότερα ποσά βρίσκονται επίσης στους σκελετικούς μυς, τα νεφρά, το πάγκρεας, τη σπλήνα, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο. Σχεδόν όλη η ποσότητα του ενζύμου είναι ενδοκυττάρια και οποιαδήποτε βλάβη στους ιστούς αυτούς προκαλεί απελευθέρωση του ενζύμου στην κυκλοφορία, γεγονός που του προσδίδει την ικανότητα του δείκτη της κυτταρικής καταστροφής.



Σχήμα 5: Η δομή της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης.

Η ημερήσια διακύμανση της AST στο ίδιο άτομο μπορεί να φτάσει τις 5-8 μονάδες, ενώ η ημιπερίοδος ζωής της στην κυκλοφορία είναι 12-22 ημέρες. Η AST χρησιμοποιείται στη διάγνωση των ηπατικών και ισχαιμικών καρδιακών νοσημάτων και συνήθως συνοδεύεται και από τη μέτρηση της αλανινικής αμινοτρανσφεράσης (ALT).

Αύξηση της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης παρατηρείται μετά από έντονη σωματική άσκηση, όπου η μέγιστη τιμή εμφανίζεται μετά από 24 ώρες. Στο έμφραγμα μυοκαρδίου, η AST του ορού αυξάνει κατά 4-10 φορές του φυσιολογικού. Η αύξηση αρχίζει μέσα σε 6-8 ώρες μετά από την έναρξη, μεγιστοποιείται μέσα σε 18-24 ώρες και επιστρέφει στο φυσιολογικό την τέταρτη και πέμπτη μέρα μετά από το έμφραγμα. Η αύξηση της AST σε μη επιπεπλεγμένα και μικρού βαθμού εμφράγματα του μυοκαρδίου

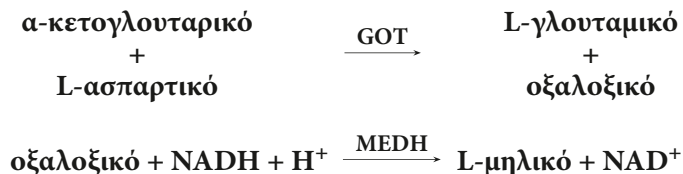
είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την ALT. Η χρήση της στη διάγνωση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου είναι σήμερα περιορισμένη, λόγω της ανάπτυξης πιο αξιόπιστων δεικτών μυοκαρδιακής νέκρωσης, όπως η CK MB, η LDH και η τροπονίνη.

Κατά τις παθήσεις του ήπατος η AST αυξάνεται κατά 10-100 φορές του φυσιολογικού. Τέτοιες παθήσεις είναι η ιογενής και τοξική οξεία ηπατίτιδα, όπου τα επίπεδα της ALT είναι μεγαλύτερα από τα επίπεδα της AST, η κίρρωση λόγω φαρμακευτικού ή αλκοολικού αίτιου, όπου τα παραπάνω επίπεδα αντιστρέφονται, ο πρωτοπαθής ή μεταναστευτικός καρκίνος του ήπατος, η ηπατική συμφόρηση, ο αποφρακτικός ίκτερος, η χολολιθίαση, η στεατονέκρωση, η λοιμώδης μονοπυρήνωση και το σύνδρομο Reye. Άλλες παθήσεις κατά τις οποίες παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της AST είναι η οξεία παγκρεατίτιδα, ο υποθυρεοειδισμός, η δερματομυοσίτιδα-πολυμυοσίτιδα, ο τραυματισμός και η ακτινοβολία των σκελετικών μυών, το σύνδρομο της τοξικής καταπληξίας, ο καρδιακός καθετηριασμός, τα εγκεφαλικά τραύματα, η μυϊκή δυστροφία Duchenne, η πνευμονική εμβολή, η γάγγραινα, η κακοήθης υπερθερμία, η δηλητηρίαση από μανιτάρια και η θερμοπληξία.

Μείωση της δραστικότητας της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης παρατηρείται κατά την αζωθαιμία, τη χρόνια νεφρική αιμοκάθαρση και κατά την ανεπάρκεια της βιταμίνης B6.

Πρέπει να σημειωθεί ότι ο λόγος των δραστικοτήτων AST/ALT στον ορό είναι περίπου ίσος με τη μονάδα αλλά αυξάνεται στο 3-4 κατά την αλκοολική ηπατοπάθεια.

Η δραστικότητα της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (GOT) προσδιορίζεται κινητικά σύμφωνα με τις προδιαγραφές της Διεθνούς Εταιρείας Κλινικής Χημείας (IFCC). Η παρουσία του ενζύμου καταλύει τη μεταφορά μιας αμινομάδας από το μόριο του L-ασπαρτικού στο μόριο του α κετογλουταρικού οξέος. Το παραγόμενο οξαλοξικό οξύ παρουσία του ενζύμου μηλική αφυδρογονάση (MDH) ανάγεται προς L-μηλικό οξύ με ταυτόχρονη οξειδωση του συνενζύμου NADH σε NAD⁺. Η ελάττωση της απορρόφησης στα 340 nm είναι ανάλογη της δραστικότητας της GOT στο δείγμα. Πιο συγκεκριμένα, οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται κατά τον προσδιορισμό της GOT είναι οι ακόλουθες:



Τα όρια των φυσιολογικών τιμών της δραστικότητας της GOT είναι μέχρι 40U/L σε θερμοκρασία 37°C. Ειδικότερα για τους άνδρες τα όρια είναι 15-40 U/L, ενώ για τις γυναίκες 13-35 U/L.

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της GOT χρησιμοποιούνται ρυθμιστικό διάλυμα Tris συγκέντρωσης 80 mM με pH 7,8, NADH 0,18 mM, L-ασπαρτικό 240 mM, MDH > 400 U/L, LDH > 600 U/L και α-κατογλουταρικό 12 mM.

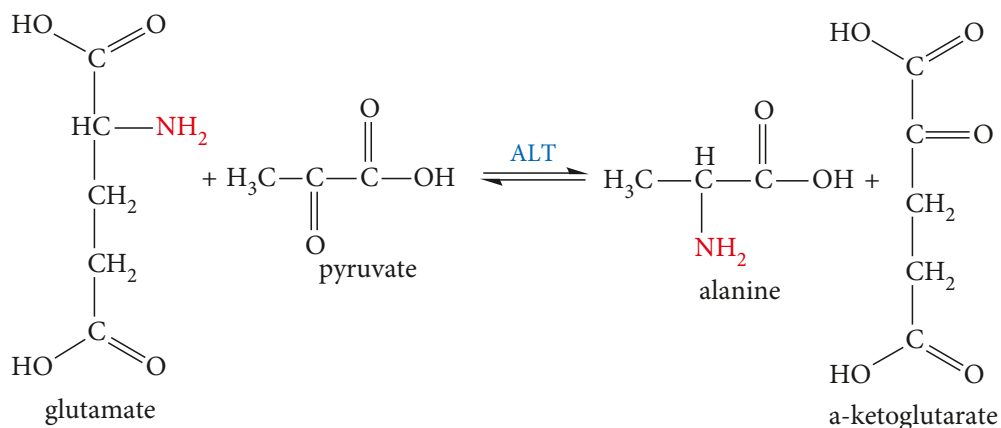
Πραγματοποιείται άμεση φωτομέτρηση σε αυτόματο αναλυτή σε μήκος κύματος 340 nm. Στον αυτόματο αναλυτή η θερμοκρασία θα πρέπει να είναι 37 °C και ο ορός του αίματος που πρόκειται να αναλυθεί να μην είναι αιμολυμένος. Ο όγκος του ορού θα πρέπει να είναι 0,1 ml. Η δραστηριότητα της GOT υπολογίζεται από τη σχέση:

$$GOT_{(U/L)37^{\circ}C} = \frac{\Delta A}{\text{min}} \cdot 1746$$

Πρέπει να σημειωθεί ότι το NADH είναι εξαιρετικά ευαίσθητο σε οξειδωτικούς παράγοντες, γι' αυτό κάθε σκεύος που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι σχολαστικά καθαρό. Επίσης, ανεξάρτητα του εάν η θερμοκρασία της κυψελίδας του φωτομέτρου είναι στους 37 °C, ο χρόνος επώασης δεν επαρκεί ώστε να ανέλθει και το διάλυμα στη θερμοκρασία αυτή, ειδικά εάν είναι ψυχρό. Λαμβάνοντας υπόψη ότι 1 °C διαφορά θερμοκρασίας προκαλεί σφάλμα περίπου 10%, για καλύτερη επαναληψιμότητα είναι αναγκαίο να προεπωάζεται το διάλυμα εργασίας.

4. Αμινοτρανσφεράση Αλανίνης (ALT, SGPT)

Η τρανσαμινάση της αλανίνης (ALT-Alanine Transaminase), γνωστή και ως γλουταμινική πυροσταφυλική τρανσαμινάση ορού (SGPT-Serum Glutamic Pyruvic Transaminase) ή αλανινική αμινοτρανσφεράση (ALAT-Alanine Aminotransferase) είναι ένα ένζυμο που καταλύει την αλληλομετατροπή των αμινοξέων και των κετοξέων με μεταφορά αμινομάδων και ειδικότερα καταλύει την ανταλλαγή της αμινο-



Σχήμα 6: Η καταλυόμενη αλληλομετατροπή των αμινοξέων από την αμινοτρανσφεράση της αλανίνης.

μάδας της αλανίνης με την όξο-ομάδα του 2-κέτογλουταρικού για τον σχηματισμό πυροσταφυλικού και γλουταμικού.

Μεγάλες ποσότητες του ενζύμου υπάρχουν στο ήπαρ και μικρότερες στην καρδιά, στους νεφρούς και στους μύς. Η ημερήσια διακύμανση της ALT στο ίδιο άτομο μπορεί να φτάσει τις 5-8 μονάδες, ενώ τα υψηλότερα επίπεδα παρατηρούνται μεταμεσονύκτια.



Σχήμα 7: Η δομή της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης.

Η αμινοτρανσφεράση της αλανίνης χρησιμοποιείται κυρίως στη διάγνωση ηπατικών νοσημάτων, στην παρακολούθηση της πορείας της ενεργού ηπατίτιδας, αφού η διατήρησή της σε υψηλά επίπεδα δείχνει τη μετάπτωση της ηπατίτιδας σε χρόνια, καθώς και στην παρακολούθηση της θεραπευτικής απάντησης στη θεραπευτική αγωγή. Η ALT είναι πιο ευαίσθητη στην ανίχνευση ηπατικών νοσημάτων από ό,τι αποφρακτικών νοσημάτων των χοληφόρων και μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στη διαφοροδιάγνωση του αιμολυτικού ίκτερου από τον ίκτερο που οφείλεται σε ηπατικά νοσήματα.

Αύξηση των επιπέδων της ALT παρατηρείται κατά την ηπατοκυτταρική νόσο, την αλκοολική κίρρωση, τον μεταναστευτικό καρκίνο ήπατος, τον αποφρακτικό ίκτερο, την ιογενή λοιμώδη ή τοξική ηπατίτιδα, τη λοιμώδη μονοπυρήνωση, την παγκρεατίτιδα, το έμφραγμα μυοκαρδίου, την καρδιακή ανεπάρκεια με υπατική συμφόρηση, τη μυοκαρδίτιδα, την πολυμυοσίτιδα-δερματομυοσίτιδα, τα σοβαρά εγκαύματα, τις κακώσεις γραμμωτών μυών. Επίσης, παρατηρείται σε παχύσαρκα άτομα, σε άτομα με

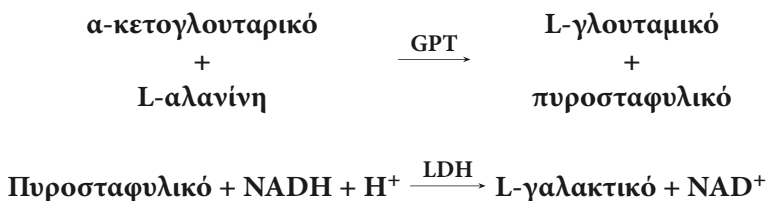
οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (με παράλληλη αύξηση της AST), σε άτομα με βαριά καταπληξία και σε άτομα με υποθυρεοειδισμό.

Μείωση των επιπέδων της ALT παρατηρείται κατά τις λοιμώξεις του ουροποιητικού, τις κακοήθειες και κατά την έλλειψη φωσφορικής πυριδοξίνης (βιταμίνης B6) λόγω δυσαπορρόφησης, εγκυμοσύνης και αλκοολικής ηπατικής νόσου.

Πρέπει να σημειωθεί ότι παρά το γεγονός ότι τα επίπεδα της AST είναι πάντα αυξημένα στο οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου, τα επίπεδα της ALT δεν είναι πάντα αυξημένα αν δεν υπάρχει ηπατική βλάβη.

Η δραστηριότητα της Αλανίνης Αμινοτρανσφεράσης (GPT) προσδιορίζεται κινητικά σύμφωνα με τις προδιαγραφές της Διεθνούς Εταιρείας Κλινικής Χημείας (IFCC). Η παρουσία του ενζύμου καταλύει τη μεταφορά μιας αμινομάδας από το μόριο της L-αλανίνης στο μόριο του α-κετογλουταρικού οξέος. Το παραγόμενο πυροσταφυλικό οξύ, παρουσία του ενζύμου γαλακτική αφυδρογονάση (LDH), ανάγεται προς L-γαλακτικό οξύ με ταυτόχρονη οξειδωση του συνενζύμου NADH σε NAD⁺. Η ελάττωση της απορρόφησης στα 340 nm είναι ανάλογη της δραστηριότητας της GPT στο δείγμα.

Πιο συγκεκριμένα, οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τον προσδιορισμό της GPT είναι οι εξής:



Τα όρια των φυσιολογικών τιμών της δραστηριότητας της GPT είναι μέχρι 40 U/L σε θερμοκρασία 37°C. Ειδικότερα για τους άνδρες τα όρια είναι 10-40 U/L, ενώ για τις γυναίκες 7-35 U/L.

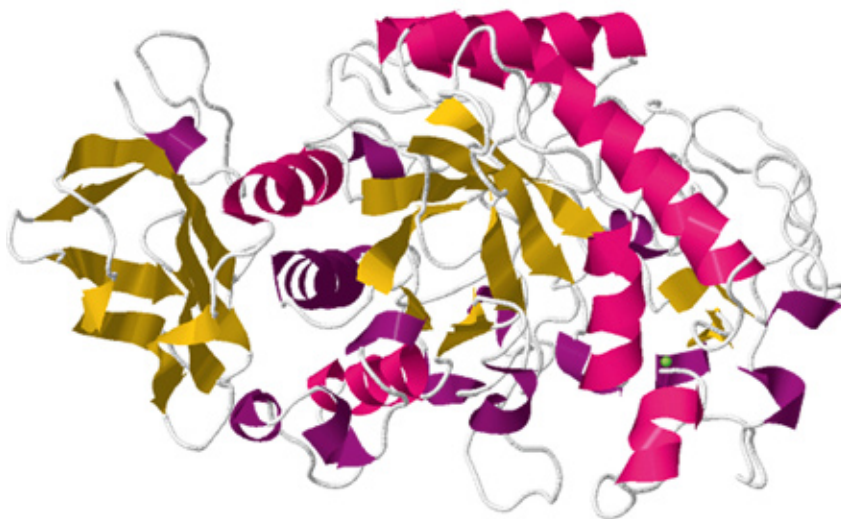
Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της GPT χρησιμοποιούνται ρυθμιστικό διάλυμα Tris 100 mM, PH 7,3, NADH 0,18 mM, L-αλανίνη 500 mM, LDH > 1000 U/L και α-κετογλουταρικό 15 mM.

Πραγματοποιείται άμεση φωτομέτρηση σε αυτόματο αναλυτή σε μήκος κύματος 340 nm. Στον αυτόματο αναλυτή η θερμοκρασία θα πρέπει να είναι 37°C και ο ορός του αίματος που πρόκειται να αναλυθεί να μην είναι αιμολυμένος. Ο όγκος του ορού θα πρέπει να είναι 0,1 ml. Η δραστηριότητα της GPT υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\text{GPT}_{(\text{U/L})37^\circ\text{C}} = \frac{\Delta A}{\text{min}} \cdot 1746$$

5. Αμυλάση (Amylase, AMS)

Η αμυλάση (α-αμυλάση) είναι ένα ένζυμο το οποίο διασπά το άμυλο και το γλυκόγONO των τροφών σε μαλτόζη. Η αμυλάση βρίσκεται στο πάγκρεας και στους σιελογόνους αδένες και λιγότερο στον μυϊκό και λιπώδη ιστό, το ήπαρ, τους ωαγωγούς, τους πνεύμονες, τους νεφρούς, την καρδιά, το γάλα και το σπέρμα. Πολύ συχνά, ακολουθεί τις διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων των λευκωμάτων και των ιόντων ασβεστίου.



Σχήμα 8: Η δομή της α-αμυλάσης.

Η p-αμυλάση και η s-αμυλάση αποτελούν τα ισoenζυμα της αμυλάσης. Η p-αμυλάση αναφέρεται στον τύπο της αμυλάσης που παράγεται κυρίως στο πάγκρεας και αποτελεί το 40% των επιπέδων της αμυλάσης στον ορό, ενώ η s-αμυλάση αναφέρεται στον τύπο που παράγεται κυρίως στους σιελογόνους αδένες και αποτελεί το 60% της αμυλάσης στον ορό.

Η αμυλάση ορού αυξάνεται στο 75% των περιπτώσεων παγκρεατίτιδας. Ωστόσο, η αμυλάση του ορού μπορεί να είναι φυσιολογική ακόμη και σε μαζική νεκρωτική παγκρεατίτιδα. Ο σημαντικός περιορισμός της αμυλάσης του ορού στη διάγνωση της παγκρεατίτιδας είναι η έλλειψη ειδικότητας, διότι πολλές κλινικές καταστάσεις μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένα επίπεδα αμυλάσης.

Οι φυσιολογικές τιμές δραστηριότητας της αμυλάσης στον ορό είναι 60-160 U/dl ενώ στα ούρα είναι 35-260 U/dl. Αυξημένα επίπεδα δραστηριότητας της αμυλάσης (υπεραμυλασαιμία) παρατηρούνται σε παγκρεατικές νόσους όπως η παγκρεατίτιδα οξεία ή χρόνια, οι επιπλοκές παγκρεατίτιδας, σε καρκίνους του παγκρέατος και σε

τραυματισμούς του οργάνου αυτού. Επίσης, αυξημένα επίπεδα της δραστικότητας του ενζύμου παρατηρούνται και σε μη παγκρεατικές νόσους. Τέτοιες περιπτώσεις είναι η νεφρική ανεπάρκεια όπου υπάρχει μειωμένη νεφρική κάθαρση της αμυλάσης, οι αλλοιώσεις των σιελογόνων αδένων που προκαλούνται από παρωτίτιδα, τραυματισμούς, λιθίαση, σιελογραφία, ακτινική σιελαδενίτιδα και από γναθοπροσωπική χειρουργική. Υπεραμυλασαιμία προκαλείται και από όγκους, όπως του πνεύμονα, του οισοφάγου, του παχέος εντέρου, του προστάτη, των ωοθηκών, του μυελώματος (αύξηση της s-αμυλάσης) και του μαστού (αύξηση της p-αμυλάσης).

Μειωμένα επίπεδα δραστικότητας του ενζύμου παρατηρούνται κατά την παγκρεατική ανεπάρκεια, την ηπατίτιδα, σε σοβαρές ηπατικές νόσους, σε άτομα με προχωρημένη κυστική ίνωση και άτομα που έχουν υποστεί παγκρεατεκτομή.

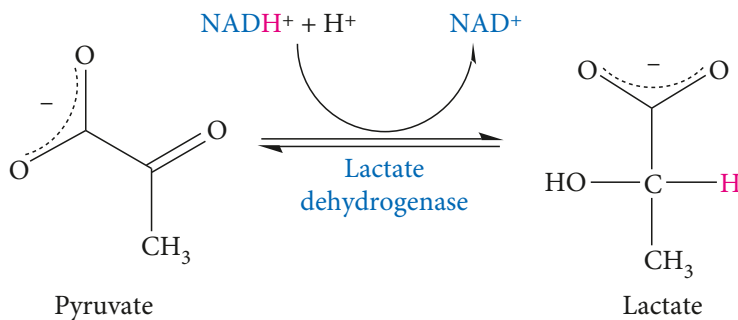
Η δραστικότητα της αμυλάσης προσδιορίζεται κινητικά χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την ένωση 2-chloro-p-νιτροφαινυλ-α-D-μαλτοτριοζίδιο (CNP-G3). Πλεονέκτημα αυτού του υποστρώματος είναι ότι αμφότερες οι αμυλάσες του ορού παγκρεατική (P-τύπος) και σιελογόνας (S-τύπος) αντιδρούν με την ίδια ταχύτητα και σχεδόν ποσοτικά (>95%). Η παρουσία του ενζύμου αμυλάση καταλύει την υδρόλυση του υποστρώματος CNP-G3 προς σχηματισμό της έγχρωμης ένωσης 2-χλώρο 4- νιτροφαινόλη (CNP). Η αύξηση της απορρόφησης στα 405 nm είναι ανάλογη της δραστικότητας της αμυλάσης στο δείγμα. Πιο συγκεκριμένα, η αντίδραση που πραγματοποιείται κατά τον προσδιορισμό αυτόν είναι η εξής:



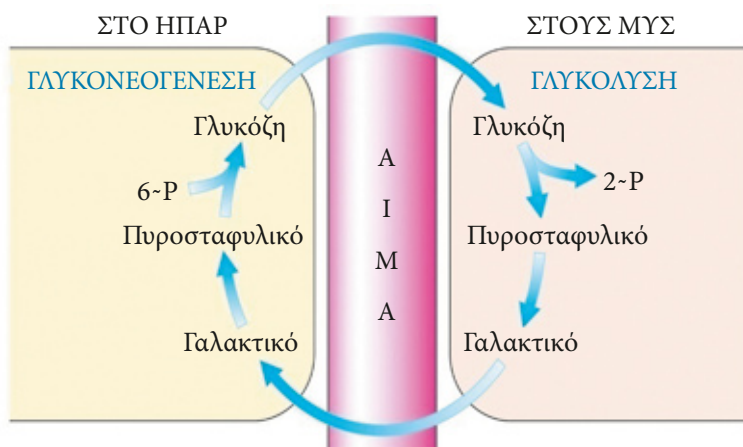
Για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της αμυλάσης χρησιμοποιούνται ρυθμιστικό Goods PH 6,2, 49 mM, NaCl 68 mM, Ca^{+2} 6 mM, CNP-G3 2,2 mM, SCN^- 880 mM. Πραγματοποιείται άμεση φωτομέτρηση σε αυτόματο αναλυτή σε μήκος κύματος 405 nm. Στον αυτόματο αναλυτή η θερμοκρασία θα πρέπει να είναι 37°C και ο ορός του αίματος που πρόκειται να αναλυθεί να μην είναι αιμολυμένος.

6. Γαλακτική Δεϋδρογενάση LDH

Η γαλακτική δεϋδρογενάση LDH είναι το ένζυμο που καταλύει την αλληλομετατροπή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό σε μία διεργασία που ονομάζεται γαλακτική ζύμωση. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται σε μία ποικιλία μικροοργανισμών και σε κύτταρα ανώτερων οργανισμών όταν η ποσότητα του οξυγόνου είναι οριακή ή ανεπαρκής, όπως στους μυς κατά τη διάρκεια μυϊκής δραστηριότητας. Η αναγωγή του πυροσταφυλικού από το NADH για τον σχηματισμό γαλακτικού καταλύεται από τη γαλακτική δεϋδρογενάση LDH. Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η εξής:



Η αντίστροφη διεργασία πραγματοποιείται στον κύκλο του Cori στο ήπαρ.



Σχήμα 9: Ο κύκλος του Cori στο ήπαρ.

Η περιοχή πρόσδεσης του NAD^+ αποτελείται από 4 α -έλικες και από μια επιφάνεια έξι παράλληλων β -αλυσίδων. Επιπλέον, σε όλες τις περιπτώσεις, το προσδεμένο NAD^+ εμφανίζει την ίδια στερεοδιάταξη. Αυτή η κοινή δομική περιοχή πρόσδεσης ονομάζεται πτυχή Rossmann. Σε υψηλές συγκεντρώσεις του γαλακτικού οξέος, το ένζυμο εμφανίζει αναστολή ανάδρασης, και το ποσοστό της μετατροπής του πυρουβικού σε γαλακτικό μειώνεται. Υπάρχουν πέντε ισοένζυμα της γαλακτικής αφυδρογονάσης.

Η λειτουργική γαλακτική αφυδρογονάση είναι ομο- ή ετερο-τετραμερές που αποτελείται από M και H υπομονάδες πρωτεΐνης που κωδικοποιούνται από τα *LDHA* και *LDHB* γονίδια αντίστοιχα. Η *LDH-1* (4H) βρίσκεται κυρίως στην καρδιά, η *LDH-2* (3H1M) στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα, η *LDH-3* (2H2M) στους πνεύμονες, η



Σχήμα 10: Η δομή της Γαλακτικής Δεϋδρο-γενάσης LDH.

LDH-4 (1H3M) στα νεφρά, τον πλακούντα και το πάγκρεας και η LDH-5 (4M) στο ήπαρ και τους γραμμωτούς μυς.

Συνήθως η LDH-2 είναι η κυρίαρχη μορφή στον ορό. Στην περίπτωση όπου η LDH-1 βρίσκεται σε υψηλότερο επίπεδο από την LDH-2 έχει εκδηλωθεί έμφραγμα του μυοκαρδίου, διότι βλάβη στους ιστούς της καρδιάς απελευθερώνει LDH-1 στην κυκλοφορία του αίματος). Η χρήση αυτού του φαινομένου για τη διάγνωση του μυοκαρδίου έχει σε μεγάλο βαθμό αντικατασταθεί από τη χρήση της τροπονίνης I ή T μέτρησης.

Αυξημένα επίπεδα LDH παρατηρούνται σε περιπτώσεις όπως αμολυμένου δείγματος, έντονης σωματικής άσκησης, φυσιολογικής εγκυμοσύνης, κυκλοφορικής ανεπάρκειας με καταπληξία (shock) και ανοξία (αύξηση της LDH μέχρι και 5 φορές στην οποία κυριαχεί το ισοένζυμο LDH-5, συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας, εμφράγματος μυοκαρδίου. Στην τελευταία περίπτωση η LDH χρησιμοποιείται συμπληρωματικά με την CPK και την AST διότι τα επίπεδά της αυξάνονται ως και 10 φορές από την 2^η μέρα, κορυφώνονται κατά τη διάρκεια της 3^{ης}-5^{ης} μέρας και

διατηρούνται υψηλά μέχρι την 10^η-14^η μέρα, όταν τόσο η AST, όσο και η CPK έχουν επανέλθει σε φυσιολογικά επίπεδα.

Άλλες περιπτώσεις αύξησης των επιπέδων της LDH είναι το πνευμονικό, νεφρικό και εγκεφαλικό εμφρακτό, ο HIV, διάφορα αιματολογικά νοσήματα όπως η αιμολυτική αναιμία, η οξεία λευχαιμία, η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η μεσογειακή αναιμία, η μυελοϊνωση κ.ά.

Πίνακας 5: Οι φυσιολογικές τιμές δραστηριότητας της LDH και η φυσιολογική κατανομή των ισοενζύμων της.

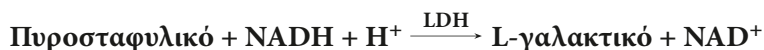
	Κατώτατο όριο	Ανώτατο όριο
<i>Νεογνά</i>	160 U/L	450 U/L
<i>Παιδιά</i>	60 U/L	170 U/L
<i>Ενήλικες</i>	140 U/L	280 U/L
<i>LDH-1</i>	17%	27%
<i>LDH-2</i>	29%	39%
<i>LDH-3</i>	19%	27%
<i>LDH-4</i>	8%	16%
<i>LDH-5</i>	6%	16%

Πίνακας 6: Αύξηση των επιπέδων των ισοενζύμων της LDH σε διάφορα νοσήματα.

Νόσος	LD-1	LD-2	LD-3	LD-4	LD-5
<i>Έμφραγμα μυοκαρδίου</i>	✓	✓			
<i>Πνευμονικό έμφρακτο</i>				✓	✓
<i>Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια</i>				✓	✓
<i>Λοιμώδης ηπατίτιδα</i>				✓	✓
<i>Τοξική ηπατίτιδα</i>				✓	✓
<i>Λευχαιμία</i>		✓	✓		
<i>Παγκρεατίτιδα</i>		✓	✓		
<i>Εκτεταμένη καρκινωμάτωση</i>		✓	✓		
<i>Μεγαλοβλαστική αναιμία</i>	✓	✓			
<i>Αιμολυτική αναιμία</i>	✓	✓			
<i>Μυϊκή δυστροφία</i>	✓	✓			

Η δραστηριότητα της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) προσδιορίζεται κινητικά, σύμφωνα με τις προδιαγραφές της Γαλλικής Εταιρείας Κλινικής Χημείας (SFBC). Η μέθοδος αυτή, όπως και η μέθοδος της Σκανδιναβικής Εταιρείας Κλινικής Χημείας (SSCC), χρησιμοποιούν ρυθμιστικό διάλυμα Tris και υπόστρωμα

πυροσταφυλικό. Παρουσία του ενζύμου το πυροσταφυλικό οξύ ανάγεται προς L-γαλακτικό οξύ με ταυτόχρονη οξείδωση του συνενζύμου NADH σε NAD⁺. Η ελάττωση της απορρόφησης στα 340 nm είναι ανάλογη της δραστηριότητας της LDH στο δείγμα. Πιο συγκεκριμένα, η αντίδραση που πραγματοποιείται κατά τον προσδιορισμό είναι η εξής:



Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της LDH χρησιμοποιούνται ρυθμιστικό διάλυμα Tris 80 mM, PH 7.2, NADH 0.25 mM, NaCl 200 mM και πυροσταφυλικά ιόντα 1,6 mM.

Πραγματοποιείται άμεση φωτομέτρηση σε αυτόματο αναλυτή σε μήκος κύματος 340 nm. Στον αυτόματο αναλυτή η θερμοκρασία θα πρέπει να είναι 37 °C και ο ορός του αίματος που πρόκειται να αναλυθεί να μην είναι αιμολυμένος. Ο όγκος του ορού θα πρέπει να είναι 20 μl. Η δραστηριότητα της LDH υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\text{LDH}_{(\text{U/L})37^\circ\text{C}} = \frac{\Delta A}{\text{min}} \cdot 8095$$

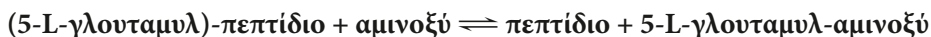
7. Γάμμα Γλουταμυλική Τρανσπεπτιδάση γ-GT

Η γ-γλουταμυλτρανσφεράση (ή γ-γλουταμυλ-τρανσπεπτιδάση) είναι το ένζυμο που καταλύει τη μεταφορά μιας ομάδας γ-γλουταμυλίου από ένα γ-γλουταμυλοπεπτίδιο σε ένα άλλο πεπτίδιο ή αμινοξύ ή στο νερό. Το ένζυμο είναι πρωτίστως συνδεδεμένο με την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων εκείνων τα οποία επιδεικνύουν μεγάλη εκκριτική ή απορροφητική ικανότητα, όπως είναι τα ηπατοκύτταρα (στις ενδοχοληφόρες επιφάνειες), τα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων νεφρικών σωληναρίων (μέγιστες συγκεντρώσεις του ενζύμου), τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα και ο προστάτης. Υπάρχει ένας αριθμός ισοενζύμων της γ-GT που προσδιορίζονται με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης, τα οποία όμως δεν φαίνεται να είναι ειδικά για τους ιστούς. Η απελευθέρωση της γ-GT από τα κύτταρα αρχικά σχετίζεται με την απελευθέρωσή της από τα θραύσματα των κυτταρικών μεμβρανών. Οι νεφροί και το έντερο συμβάλλουν ελάχιστα στην ολική γ-GT του ορού, με το ήπαρ να συνιστά τη μείζονα πηγή της δραστηριότητας αυτού του ενζύμου.

Η γ-GT είναι παρούσα στις κυτταρικές μεμβράνες πολλών ιστών, συμπεριλαμβανομένων των νεφρών, του χοληδόχου πόρου, του παγκρέατος, της χοληδόχου κύστης, του σπλήνα, της καρδιάς, του εγκεφάλου και των σπερματικών κυστιδίων.

Το ένζυμο αυτό συμμετέχει καθοριστικά στη μεταφορά των αμινοξέων σε ολόκληρη την κυτταρική μεμβράνη και στον μεταβολισμό των λευκοτριενίων. Παιίζει

καθοριστικό ρόλο και στον μεταβολισμό της γλουταθειόνης μεταφέροντας τη γλουταμυλ- χαρακτηριστική ομάδα σε μια ποικιλία μορίων αποδεκτών, συμπεριλαμβανομένου του νερού, ορισμένων L-αμινοξέων και πεπτιδίων, αφήνει την κυστεΐνη με σκοπό τη διατήρηση της ενδοκυτταρικής ομοιόστασης. Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η εξής:



Η γ-GT στα προκαρυωτικά και στα ευκαρυωτικά κύτταρα αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, μία μεγάλου μοριακού βάρους και μία μικρότερου μοριακού βάρους.



Σχήμα 11:
Η δομή του ενζύμου
Γάμμα Γλουταμυλική
Τρανσπεπτιδάση γ-GT.

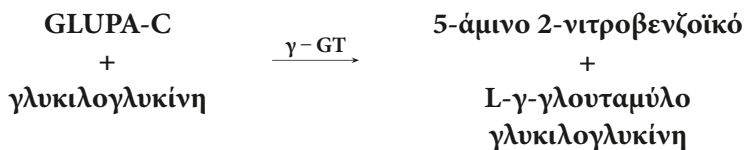
Η γ-GT εντοπίζεται κυρίως στους νεφρούς, στο ήπαρ και στον σπλήνα. Αποτελεί την πιο ευαίσθητη εξέταση για την ανίχνευση του αποφρακτικού ικτέρου, της χολαγγειίτιδας και της χολοκυστίτιδας. Το γεγονός ότι τα επίπεδα της γ-GT είναι φυσιολογικά στα παιδιά και στις έγκυες γυναίκες σε αντίθεση με τα αυξημένα επίπεδα της LDH και αλκαλικής φωσφατάσης επιτρέπει τη χρησιμοποίησή της στη διαφορική διάγνωση ηπατοχολικών παθήσεων στις δύο αυτές ομάδες. Χρησιμοποιείται επίσης για την παρακολούθηση χρόνιων αλκοολικών οι οποίοι βρίσκονται υπό θεραπεία. Χρησιμοποιείται ακόμη ως καρκινικός δείκτης, επειδή τα επίπεδά της αντανakλούν την υποτροπή ή την ύφεση της νόσου. Τα επίπεδα της γ-GT είναι φυσιολογικά στο έμφραγμα του μυοκαρδίου. Αυξήσεις μπορεί να

παρατηρηθούν μετά την τέταρτη ημέρα και αποδίδονται σε δευτεροπαθή ηπατική βλάβη από καρδιακή ανεπάρκεια.

Αυξημένα επίπεδα δράσης του ενζύμου παρατηρούνται σε άτομα με κίρρωση του ήπατος, πρωτοπαθή χολική κίρρωση, αποφρακτικό ίκτερο, χολόσταση, χολική ατρησία, ηπατίτιδα, ηπατικές μεταστάσεις, καρκίνο του ήπατος, αλκοολισμό, παγκρεατίτιδα, καρκίνο του παγκρέατος, καρκίνο του προστάτη, λοιμώδη μονοπυρήνωση και μυοτονική δυστροφία. Αντιθέτως, μειωμένα επίπεδα δράσης του ενζύμου παρατηρούνται σε άτομα με υπερθυρεοειδισμό.

Η δράση της γ -GT αυξάνεται κατά πολύ σε άτομα που έχουν πάρει μεγάλη ποσότητα αιθανόλης, βαρβιτουρικά, ακεταμινοφαίνη, οιστρογόνα, αντισυλληπτικά φαινυτοΐνη ή στρεπτοκινάση.

Η δραστηριότητα του ενζύμου L- γ -Γλουταμύλο τρανσφεράση (γ -GT) προσδιορίζεται κινητικά, σύμφωνα με τη μέθοδο Szasz. Η παρουσία του ενζύμου καταλύει τη μεταφορά της ομάδας L- γ -Γλουταμύλο από το μόριο του L- γ -Γλουταμύλο 3- καρβόξυ 4-νιτρανιλιδίου (GLUPA-C) στο μόριο της γλυκυλογλυκίνης. Η αύξηση της απορρόφησης στα 405-420 nm οφείλεται στο παραγόμενο 5-άμινο-2-νίτροβενζοϊκό οξύ και είναι ανάλογη της δραστηριότητας της γ -GT στο δείγμα. Η αντίδραση που πραγματοποιείται κατά τον προσδιορισμό αυτό είναι η ακόλουθη:



Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της γ -GT χρησιμοποιούνται ρυθμιστικό Tris 100 mM, PH 8,25 Glygly 130 mM, υπόστρωμα 2,9 mM. Πραγματοποιείται άμεση φωτομέτρηση σε αυτόματο αναλυτή σε μήκος κύματος 405 nm. Στον αυτόματο αναλυτή η θερμοκρασία θα πρέπει να είναι 37°C και ο ορός του αίματος που πρόκειται να αναλυθεί να μην είναι αιμολυμένος. Ο όγκος του ορού θα πρέπει να είναι 0,1 ml. Η δραστηριότητα της γ -GT υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\gamma\text{-GT}_{(U/L)37^{\circ}\text{C}} = \frac{\Delta A}{\text{min}} \cdot 1158$$

8. Γλυκόζη (σάκχαρο) αίματος (GLU)

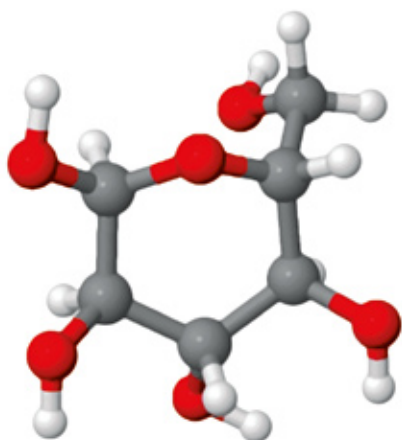
Η γλυκόζη είναι ένα ευρέως διαδεδομένο καύσιμο στη βιολογία. Χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας τόσο για τους μικροοργανισμούς όσο και για τον άνθρωπο.

Ο μεταβολισμός της γλυκόζης γίνεται κατά την αερόβια αναπνοή, την αναερόβια αναπνοή ή ζύμωση. Η γλυκόζη είναι η βασική πηγή ενέργειας του ανθρώπινου σώμα-

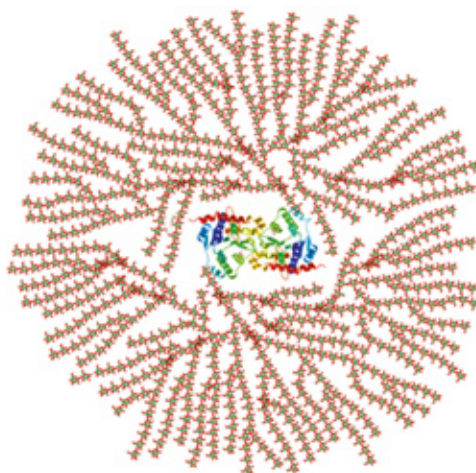
τος μέσω της αερόβιας αναπνοής, που περιέχει περίπου 3,75 θερμίδες, της ενέργειας των τροφίμων ανά γραμμάριο.

Στα θηλαστικά, η γλυκόζη είναι το μοναδικό καύσιμο που χρησιμοποιεί ο εγκέφαλος κάτω από συνθήκες επάρκειας τροφής και το μοναδικό καύσιμο που μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια σε κάθε περίπτωση. Η γλυκόλυση είναι η ακολουθία των αντιδράσεων που μεταβολίζουν ένα μόριο γλυκόζης σε δύο μόρια πυροσταφυλικού, με ταυτόχρονη καθαρή παραγωγή δύο μορίων ATP. Αυτή η πορεία είναι αναερόβια διότι δεν απαιτείται οξυγόνο για την πραγματοποίησή της.

Όταν η πρόσληψη ενέργειας υπερβαίνει την κατανάλωσή της, η περίσσεια μετατρέπεται σε λίπος και γλυκογόνο για αποθήκευση στον λιπώδη ιστό, στο ήπαρ ή στους μυς. Αντίθετα, όταν η κατανάλωση ενέργειας υπερβαίνει την πρόσληψή της πραγματοποιείται ενδογενής σχηματισμός γλυκόζης από τη διάσπαση αποθεμάτων υδατανθράκων αλλά και από μη υδατανθρακικές πηγές.



Σχήμα 12: Η δομή της γλυκόζης.

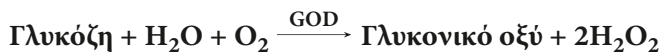


Σχήμα 13: Η σφαιρική δομή του γλυκογόνου.

Το επίπεδο γλυκόζης στο αίμα διατηρείται εντός ενός περιορισμένου εύρους κάτω από ποικίλες συνθήκες από ρυθμιστικές ορμόνες όπως η ινσουλίνη, η γλυκαγόνη και η επινεφρίνη. Η διαταραχή μεταβολισμού υδατανθράκων που αντιμετωπίζεται συχνότερα είναι η υψηλή γλυκόζη αίματος λόγω του σακχαρώδη διαβήτη.

Παρουσία του ενζύμου γλυκόζο-οξειδάση (GOD), η γλυκόζη οξειδώνεται και παράγει H_2O_2 . Η αντίδραση του H_2O_2 με φαινολικό παράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510 nm είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο δείγμα. Οι αντιδράσεις που πραγματο-

ποιούνται κατά τον προσδιορισμό αυτό είναι οι εξής:



Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της γλυκόζης χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα 0,2M pH 8,0, GOD > 18 IU/ml, POD > 2 U/ml, αμινοφαιζόνη 0,25 mM, παράγωγο φαινόλης 10 mM και συμπαράγοντες. Πραγματοποιείται φωτομέτρηση έναντι τυφλού σε αυτόματο αναλυτή σε μήκος κύματος 510 nm. Στον αυτόματο αναλυτή η θερμοκρασία θα πρέπει να είναι 37 °C και ο ορός του αίματος που πρόκειται να αναλυθεί να μην είναι αιμολυμένος.

Πίνακας 7: Οι όγκοι των διαλυμάτων που απαιτούνται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της γλυκόζης.

	Τυφλό	Δείγμα	Πρότυπο
<i>Δ/μια Εργασίας</i>	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
<i>Γλυκόζη 100mg/dl</i>	–	–	0,01 ml
<i>H₂O</i>	0,01 ml	–	–
<i>Δείγμα ορού</i>	–	0,01	–

Η συγκέντρωση της γλυκόζης υπολογίζεται με βάση την ακόλουθη σχέση:

$$C_{\text{mg/dl}} = \frac{A_{\text{δείγματος}}}{A_{\text{προτύπου}}} \cdot 100$$

9. Γλυκοζυλιωμένη Αιμοσφαιρίνη

Η αιμοσφαιρίνη είναι ουσία που βρίσκεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια του αίματος. Κύριο έργο της είναι να μεταφέρει μέσω της κυκλοφορίας του αίματος οξυγόνο στους ιστούς. Η γλυκόζη (ή αλλιώς σάκχαρο) συνδέεται με την αιμοσφαιρίνη και σχηματίζει τη γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη. Η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη παραμένει αδιάσπαστη σε όλη τη διάρκεια της ζωής του αιμοσφαίριου.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο ότι η σύνδεση της γλυκόζης με την A1 αιμοσφαιρίνη (η οποία αποτελεί το 97% της ολικής αιμοσφαιρίνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, το υπόλοιπο ποσοστό αποτελείται από την A2, κατά 2,5% και από την F, κατά 0,5% περίπου) γίνεται κατά τρόπο ευθέως ανάλογο με το επίπεδο σακχάρου του αίματος. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια που παράγονται στον μυελό των οστών, ζουν περίπου 120 ημέρες και στη συνέχεια καταστρέφονται στον σπλήνα. Καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους η γλυκόζη συνδέεται συνεχώς με την αιμοσφαιρίνη.