تهیه کننده: حسین پیری

اصول کلی کنترل کیفی

در یک جمله کنترل کیفی به معنی مطالعه خطاهای آزمایشگاهی و روشهای تشخیصی و اتخاذ تدابیر لازم جهت به حداقل رساندن آنها می‌باشد. وقتی صحبت از کنترل کیفی می‌شود, بیشتر فعالیتها حول محور انجام آزمایش متمرکز میگردد, اما محدوده کنترل کیفی بسیار وسیعتر است. هرجا امکان خطا وجود دارد باید برنامه کنترل کیفی نیز وجود داشته باشد. لذا در چرخه مراجعه بیمار به آزمایشگاه تا گرفتن نتیجه کلیه مراحل نمونه‌گیری, انتقال, انجام آزمایش و ارائه جواب باید تحت نظارت سیستم کنترل کیفی باشد. دقیق‌ترین سیستم انجام آزمایش وقتی که نمونه‌گیری و انتقال نمونه صحیح نباشد یا منشی آزمایشگاه نتیجه را اشتباه تایپ نماید, فاقد کارایی است. اما انواع خطاها:

1. **خطای اتفاقی(راندمی)یا نامنظم:** این خطا قابل پیش‌بینی نیست و در یک جهت خاص هم اتفاق نمی‌افتد. یعنی گاهی نتیجه بیش از مقدار واقعی و گاهی کمتر است. اعمال روشهای کنترل کیفی در جلوگیری از ایجاد این نوع خطاها چندان موثر نیست.
2. **خطای سیستماتیک یا منظم:** این نوع خطا جهت‌دار است و همیشه در یک جهت(یعنی بالاتر یا پایین‌تر از مقدار واقعی) اتفاق میافتد. اینگونه خطاها خود به چند دسته تقسیم می‌شوند:

الف- خطای پرسنل(Personal bias): مانند تفاوتی که دو فرد در خواندن مینیسک مایع در پیپت دارند.

ب- خطای آزمایشگاه(Laboratory bias): اگر یک نمونه را برای انجام آزمایش به چند آزمایشگاه مختلف بدهیم, اختلاف جوابها گاه قابل توجه و چشمگیر است. این اختلافات ناشی از تفاوت در استانداردها, معرفها, روشها, وسایل و ... می‌باشند.

ج- خطای تجربی(Experimental bias): این خطا وابسته به روش, وسایل و ... است. مثلا یک روش نسبت به روش آزمایش دیگر بطور ثابت کمتر یا بیشتر میخواند.

د- کهنه شدن(Aging): در اثر کهنه شدن معرفها, استانداردها یا سرم بیمار تغییراتی مانند تبخیر, کریستالیزاسیون, رشد میکروبها, حل‌شدن ظرف شیشه‌ای در قلیا و اسیدی‌شدن بر اثر ترکیب با دی‌اکسیدکربن هوا ایجاد می‌شود که بالطبع موجب خطا خواهد شد.

حوزه کار کنترل کیفی:

1. **دستگاهها:** کلیه دستگاههای آزمایشگاه از قبیل یخچال, بن‌ماری, فتومتر و غیره باید بطور مرتب تحت نظارت وکنترل باشند.
2. **معرفها:** هر معرفی بطور جداگانه باید از نظر دارا بودن شرایط مطلوب بررسی شود. برچسب همه معرفها باید این اطلاعات را داشته باشد: نام معرف, نام تستی که معرف جهت آن تهیه شده است, تاریخ تهیه, تاریخ انقضاء, نام تهیه‌کننده, توضیحات لازم مثل شرایط نگهداری و ... .
3. **انجام آزمایش:** این مقوله از سایر عوامل مثل دستگاهها و معرفها و همچنین شخص آزمایش‌کننده تاثیر می‌پذیرد.

اصطلاحات متداول در کنترل کیفی:

صحت(Accuracy): میزان توافق مقادیر اندازه‌گیری‌شده با مقدار واقعی. در آزمایشگاه جز در مورد استانداردها, مقدار واقعی مشخص نیست.

دقت(Precision): میزان خطاهای اتفاقی و تکرارپذیری سنجشها را نشان می‌دهد. این مفهوم در یک روش آزمایشگاهی بوسیله واریانس یا انحراف معیار که مفاهیمی آماری هستند نشان داده میشود. هرچه واریانس کوچکتر باشد دقت بیشتر است.

اعتمادپذیری(Reliability): این مفهوم با ظرفیت یک روش جهت حفظ صحت و دقت مشخص می‌شود. اگر یک روش صحت و دقت خود را در یک زمان قابل‌توجه حفظ کند قابل اعتماد است.

روشهای کنترل کیفی:

1. **استفاده از سرم کنترل:** سرم کنترل‌ها سرمهایی هستند که دارای مواد مورد اندازه‌گیری در آزمایشگاهها هستند و آنها را میتوان ساخت یا بصورت تجاری تهیه نمود و به دو نوع سرم‌کنترل صحت و سرم‌کنترل دقت قابل تقسیم است. غلظت مواد درونی این سرم کنترل‌ها(صحت) و دامنه تغییرات آنها در کاتالوگ همراه آن و یا برچسب ظروف مربوطه نوشته شده است. بعضی از سرم کنترل‌ها ممکن است تمام موادی که در بخش شیمی‌بالینی اندازه‌گیری می‌شوند را دارا باشد. سرم کنترل همراه سایر نمونه‌های بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرد و اگر نتایج در محدوده غلظت سرم کنترل نباشد آزمایش جهت پیدانمودن عوامل یا عامل ایجاد خطا مجددا مورد بررسی قرار می‌گیرد. سه نوع سرم کنترل با مقادیر پایین, طبیعی و بالا باید مورد استفاده واقع شود زیرا گاهی ممکن است به علت خصوصیات آزمایش, سرم کنترل طبیعی در حد مورد قبول نتیجه دهد ولی سرم‌کنترل بالا خطای آزمایش را کشف نماید. از سرم‌کنترل‌ها برای ترسیم نمودارهای کنترل کیفیت نیز استفاده میشود(در پایین).
2. **بررسی میانگین یا میانه بطور روزانه:** اگر تعداد آزمایشهای آزمایشگاه زیاد باشد, معمولا میانگین یا میانه یک آزمایش عدد ثابتی است و شاخص حساسی جهت کنترل کیفی محسوب می‌گردد.
3. **بررسی محاسباتی(Arithmatic check):** مثل محاسبه اسید و باز از روی مقدار pH و CO_2 از معادله هندرسن-هاسلباخ یا بررسی شکاف آنیونی(Anion gap) یا اسمولاریته باتوجه به غلظت گلوکز, سدیم, اوره و ... .
4. **بررسی سوابق آزمایش بیمار(Delta check):** در مورد بیماران بستری مورد استفاده واقع می‌گردد. وجود تغییرات شدید در مقایسه با نتایج قبلی باید مورد توجه و علت‌یابی قرار گیرد.
5. **بررسی هشداری(Alert check):** این نوع کنترل بیشتر مربوط به اشکالات تایپی می‌شود و می‌توان برنامه جواب‌دهی کامپیوتر را به‌نحوی تنظیم نمود که نسبت به اینگونه خطاها حساس باشد. خطاهایی که در محدوده این نوع کنترل قرار می-گیرند مانند: گزارش پتاسیم 40 meq/L یا کراتینین 120 mg/dl می‌باشد.
6. **تشخیص ازطریق الگوهای مورد انتظار(Pattern recognition):** مثل تطابق اوره و کراتینین, کلر و بیکربنات و ... .
7. **بررسی راندمی و دوتایی نمونه(Randomazide duplicate sample):** می‌توان یک نمونه خون را در دو لوله تقسیم کرده و با دو اسم مختلف در اختیار تکنسین قرار داد و نتیجه را بررسی نمود. همچنین می‌توان نمونه‌ای را که روز قبل انجام شده(در مورد مواد پایدار) امروز با نام دیگر در اختیار تکنسین جهت آزمایش قرار داد.
8. **کنترل کیفی خارجی:** آزمایش انجام شده در یک آزمایشگاه با آزمایش انجام شده بر روی همان نمونه در آزمایشگاه دیگر مقایسه شود. از نظر قانونی آزمایشگاه رفرانس(مرجع), متولی کنترل کیفی خارجی می‌باشد.

تهیه منحنی کنترل کیفی(Levey-Jenninges) و طریقه استفاده از سرم‌کنترل:

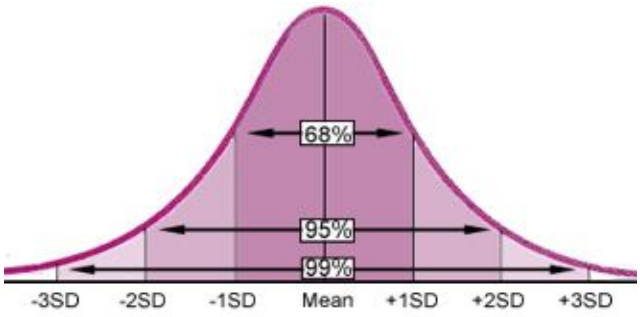
حدود کنترل‌کیفی منبع سرم آزمایشگاه جهت کنترل هرماده, بدین طریق محاسبه میگردد:

1. غلظت ماده موردنظر را بطور مکرر درحالات مختلف طی روزهای کاری بمدت یک‌ماه در شرایط یکسان بدست می‌آورند.
2. میانگین(X) تمام اندازه‌گیری‌ها را جهت ماده مورد نظر محاسبه می‌نمایند.
3. انحراف استاندارد(SD) را محاسبه می‌نماییم(رابطه زیر).
4. 2SD به میانگین اضافه تا بالاترین حد کنترل‌کیفی بدست آید.
5. 2SD از میانگین کم تا پایین‌ترین حد کنترل‌کیفی بدست آید. یعنی:

حد بالای کنترل‌کیفی= X + 2SD

حد پایین کنترل‌کیفی= X - 2SD

با فرض اینکه پراکندگی داده‌های کنترل‌کیفی بصورت زنگوله‌ای یا گوسی(Gaussian) باشد, 95 درصد تمام نتایج کنترل‌کیفی بعدی یا 19 جواب از 20 جواب در داخل حدود کنترل‌کیفی قرار می‌گیرند(شکل زیر). برای مثال می‌توان حدود کنترل را برای کلسیم در یک نمونه معین با 95 درصد اطمینان با توجه به اینکه میانگین 9/0 mg/dl و SD برابر با 0/22 mg/dl باشد بصورت زیر محاسبه نمود:



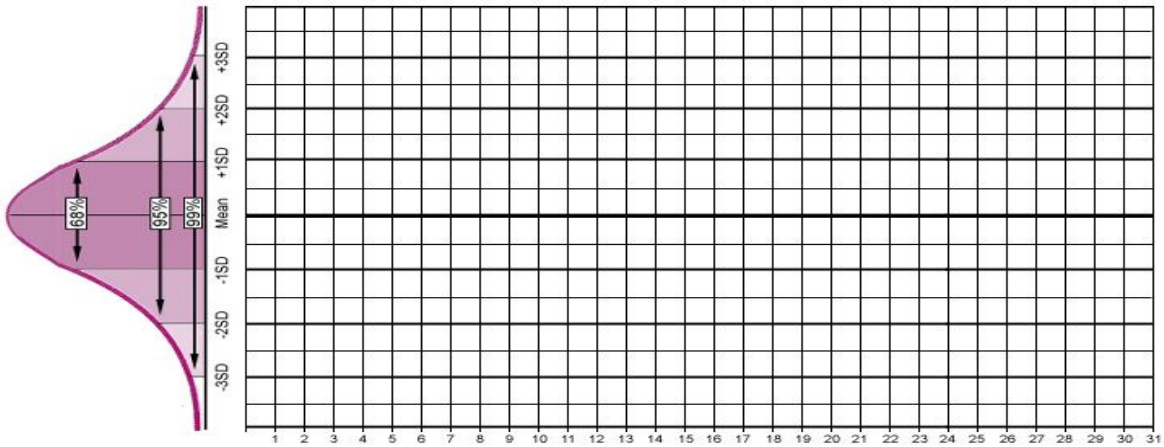
حد بالای کنترل = X + 2SD = 9/0 + 2 (0/22) = 9/4 mg/dl

حد پایین کنترل = X - 2SD = 9/0 - 2 (0/22) = 8/6 mg/dl

نتایج بالاتر از 9/4 یا پایین‌تر از 8/6 نشانگر روش خارج از کنترل می‌باشد. به عبارت دیگر فقط 5 درصد شانس وجود دارد که یک کنترل خارج از حدود 95 درصد قرار گیرد و روش قابل قبول در کنترل باشد.

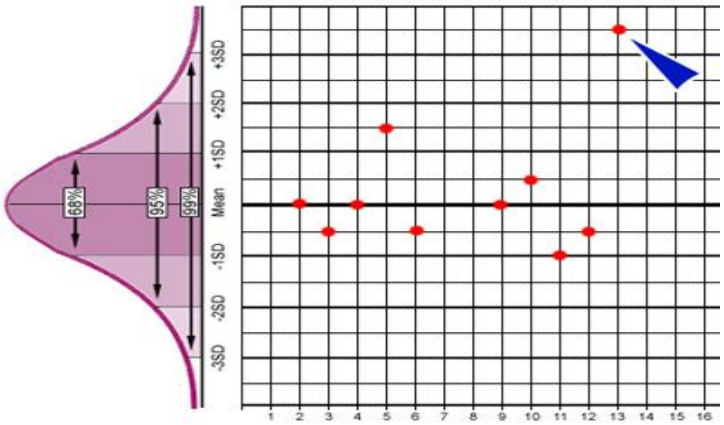
ارزیابی نتایج:

جهت ارزیابی دقت, برای هر ماده تحت بررسی نیاز به قرار دادن یک کنترل با هر سری از نمونه بیماران در آزمایش می‌باشد. نتایج حاصله را از روی منحنی که میانگین و محدوده کنترل نتایج حاصل از آزمایشات انجام شده روی همان کنترل در ماه گذشته بدست آمده و بر روی منحنی رسم گردیده, مشخص می‌گردند(چارت Levey-Jenning).

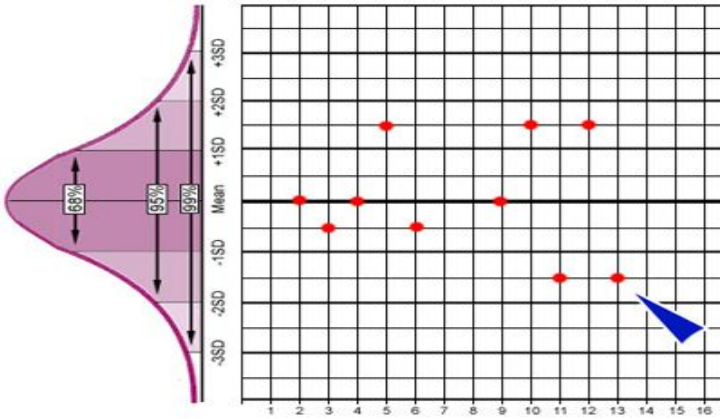


تا آنجائیکه نقاط رسم‌شده به صورت پراکنده در بالا و پایین میانگین درون محدوده کنترل قرار گیرند, روش را رسما تحت کنترل نامیده و نتایج بیماران را می‌توان گزارش نمود. در صورت وجود مسائل نامبرده زیر, روش آزمایش تحت کنترل نبوده و نتیجه بیماران را نمی‌توان گزارش کرد (قوانین وستگارد):

1. اگر یک نتیجه خارج از محدوده ±2SD باشد به معنی یک **اخطار** است تا روش بکار رفته مجددا مورد بررسی قرار گیرد(قانون 1_{2S}).
2. وقتی که یک نتیجه خارج از محدوده ±3SD باشد(قانون 1_{3S}).



3. وقتی که دو نتیجه متوالی خارج از محدوده 2SD+ یا خارج از محدوده 2SD- باشد(قانون 2_{2S}).
4. وقتی که یک کنترل بالای 2SD+ و کنترل دیگر پایین 2SD- باشد(قانونR_{4S}).
5. وقتی که چهار نتیجه متوالی خارج از محدوده 1SD± باشد(قانون 4_{1S}).



6. وقتی که ده نتیجه متوالی در یک طرف میانگین قرار داشته باشد(قانون10_X).

نحوه بررسی چارت Levey-Jenning:

هنگامی که مقادیر کنترل در محدوده بین 2SD± قرار دارد, نتایج بیماران قابل گزارش‌کردن می‌باشد.هنگامی که یکی از کنترلها خارج از محدوده 2SD± واقع شد, باید به عنوان هشدار تلقی گردد(قانون 1_{2S}), و نمونه بیمار برای بررسی بیشتر نگه داشته شود(قوانین دیگر نیز بررسی گردد). هنگامی که همه این قوانین نشان دادند که نتایج **در محدوده کنترل(In control)** قرار دارند, آنگاه نتایج قابل پذیرش و گزارش می‌باشند. ولی هنگامی که هرکدام از قوانین مذکور رای به **خارج از کنترل(Out of control)** بودن نمونه داد, آنگاه نباید نتایج بیماران گزارش گردد.

اقدامات لازم در صورت خارج از کنترل بودن یک متد:

1. بررسی مجدد محاسبات. اگر نتایج بعد از بررسی مجدد, خارج از کنترل باقی بماند, کل سری آزمایشات برای ماده تحت نظرهمراه با سرم کنترل تازه بایستی تکرار گردد.
2. اگر نتایج حاصل برای دومین سرم کنترل شده نیز خارج از محدوده کنترل قرار گیرد, استاندارد, معرفها, نظافت لوازم شیشه‌ای, پیپتها, دستگاهها(شامل کنترل کردن فیلتر, طول موج و ...) شرایط آزمایش از قبیل حرارت انکوباسیون, pH آب مقطر و غیره بایستی تماما تحت کنترل قرار گیرند. نتیجه بیماران را فقط در صورت شناسایی منبع خطا و رفع آن می‌توان گزارش نمود.

توجه: تحت هیچ شرایطی استفاده از سرم کنترل به عنوان استاندارد جهت محاسبه یا برای تصحیح نتایج بیماران مجاز نمی‌باشد.

برخی اشکالات قابل تشخیص بر روی نمودار L-J:

الف- Trends: افزایش یا کاهش در یک جهت در چند روز متوالی. علت: تجزیه تدریجی معرفها و استانداردها, رسوب ناقص پروتئینها و اشکال در وسایل.

ب- Shift: تغییر ناگهانی به یک سمت میانگین و ثابت ماندن داده‌ها در یک سطح. علت: استاندارد جدید, تغییر حساسیت معرف, جوشیدن طولانی بخاطر اشکال در تایمرو ... .

ج- Dispersion: تغییر شدید مقادیر کنترل و گاها خروج آن از محدوده $\pm 2SD$. علت: بی‌دقتی و خطاهای اتفاقی.

ضریب تغییرات(CV):

هرگاه آزمایشگاه برای اندازه‌گیری یک ماده خاصی روش آزمایش را تعویض نماید, دقت آزمایش جدید بایستی نسبت به روش قبلی مورد بررسی قرار گیرد. اما از آنجایی که دو انحراف استاندارد(SD) را بدلیل متفاوت بودن داده‌های هر سری نمی‌توان با همدیگر مقایسه نمود, این عمل را می‌توان با محاسبه ضریب تغییرات انجام داد. این ضریب از لحاظ آماری حدسی از دقت اندازه‌گیری بوده و هر چقدر این عدد کوچکتر باشد نشانه دقت بیشتر است(بطور معمول کمتر از 5 درصد دقت قابل قبول می‌باشد). برای محاسبه ضریب تغییرات از فرمول ..... استفاده می‌گردد.

مثال: در اندازه‌گیری گلوکز به دو روش مختلف, داده‌های زیر بدست آمده است. ضریب تغییرات بین دو روش را محاسبه نمایید.

	روش A :	روش B:
میانگین(X):	98/5 mg/dl	78 mg/dl
انحراف استاندارد(SD):	2/5 mg/dl	2 mg/dl
ضریب تغییرات:	**% 2/5**	**% 2/6**

چون در هر دو روش ضریب تغییرات نزدیک به یکدیگرند دقت هر دو آزمایش قابل قبول است, ولی صحت آزمایشها بایستی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد ضد انعقاد و محافظ(نگهدارنده)خون:

چنانچه خون تام (Whole blood) یا پلاسما جهت آزمایش لازم باشد, ضد انعقاد را حین جمع‌آوری نمونه اضافه می‌نمایند. خون تام به ندرت مورد نیاز آزمایشات شیمی کلینیکی و در حقیقت فقط مورد نیاز جهت اندازه‌گیری گازهای خون و اندازه‌گیری آمونیاک می‌باشد. گرچه ممکن است از آن جهت سنجش گلوکز, نیتروژن اوره و لاکتات نیز استفاده شود. سرم حاصل از خون لخته, نمونه انتخابی جهت بسیاری از سیستمهای سنجش می‌باشد ولی پلاسمای بدست‌آمده با ضد انعقاد مناسب نیز نمونه با ارزشی است و در بعضی از شرایط نسبت به سرم ترجیح داده می‌شود. چون جهت تهیه سرم نیاز به 15 تا 30 دقیقه انعقاد کامل خون قبل از سانتریفوژ می‌باشد, استفاده از پلاسما باعث تسریع آنالیز در حالتهای اورژانس میشود. بعلاوه پلاسمای بدست‌آمده از یک حجم معین خون همیشه در مقایسه با سرم بیشتر است. عیب پلاسما تشکیل لخته فیبرین هنگام ذخیره آن و خطر بعدی در انسداد لوله‌ها در دستگاه خودکار(اتوآنالایزر) می‌باشد. همچنین پلاسما نمونه مناسب جهت الکتروفورز نمیباشد, زیرا حضور فیبرینوژن باعث تفسیر غلط طرح الکتروفورزی می‌گردد.

از جمله مهمترین ترکیبات ضد انعقاد و محافظ(نگهدارنده)خون عبارتند از: هپارین, EDTA , سیترات, اگزالات, فلورید-سدیم(نگهدارنده) و یدواستات‌سدیم(نگهدارنده).

هپارین:

بطور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد و حداقل تداخل را با تستهای آزمایشگاهی دارد. این ترکیب بصورت نمکهای سدیم, پتاسیم, لیتیوم و آمونیوم موجود می‌باشد. این ترکیب باعث تسریع عمل آنتی‌ترومبین III (که باعث خنثی شدن یا بی‌اثر شدن ترومبین و جلوگیری از تشکیل فیبرین از فیبرینوژن می‌گردد) می‌شود. عیب هپارین گرانی آن و اثر زودگذر آن بوده و در اسمیر خون خون رنگ‌آمیزی شده با روش رایت ایجاد زمینه آبی می‌نماید. هپارین همچنین در بعضی از آزمایشات تداخل نموده و باعث ایجاد خطا در نتیجه می‌گردد. به عنوان مثال این ترکیب باعث مهار فعالیت اسیدفسفاتاز می‌گردد. همچنین باعث تاثیر بر اتصال تری‌یدوتیرونین(T_3) و تیروکسین به پروتئینهای حامل آنها گردیده و بدین‌ترتیب باعث افزایش در شکل آزاد (غیر متصل به Carrier protein) آنها می‌گردد.

EDTA:

یک عامل شلاته‌کننده می‌باشد که تشکیل کمپلکسی با Ca^{2+} می‌نماید و بدین‌ترتیب از انعقاد خون جلوگیری مینماید(Ca^{2+} مورد نیاز برای عمل انعقاد می‌باشد). EDTA بیشتر بصورت نمکهای دی‌سدیم, دی‌پتاسیم یا تری‌پتاسیم مورد استفاده قرار می‌گیرد که این ترکیبات به‌راحتی حل می‌گردند. غلظتهای زیاد (بالاتر از 2 mg/ml) آن باعث چروکیدگی گلبولهای‌قرمز می‌گردد. این ترکیب جهت آزمایشات هماتولوژی مناسب است زیرا اجزای سلولی خون را حفظ می‌نماید.

EDTA باعث مهار آلکالین‌فسفاتاز, کراتین‌کیناز, لوسین‌آمینوپپتیداز و لاکتات‌دهیدروژناز ازطریق شلاته‌کردن کوفاکتورهای فلزی آنها می‌گردد. EDTA همچنین نباید در اندازه‌گیری Ca^{2+} و Fe^{2+} مورد استفاده قرارگیرد(در روشهای فتومتری). همچنین این ترکیب به دلیل داشتن نیتروژن در سنجش نیتروژن اوره خون(BUN) تداخل می‌نماید. از طف دیگر در سنجش سدیم و پتاسیم(الکترولیتهای خون) نیز نباید از نمکهای سدیم و پتاسیم آن استفاده نمود.

فلوریدسدیم:

بیشتر به عنوان عامل مهارکننده گلیکولیز مورد استفاده قرار می‌گیرد, زیرا خاصیت ضد انعقادی ضعیفی دارد. این ترکیب(بعنوان نگهدارنده) به همراه ضدانعقادهای دیگر از قبیل اگزالات‌پتاسیم مورد استفاده قرار می‌گیرد. در دمای 25^{o} C (دمای اتاق) پایداری مقدار قند به مدت 8 تا 24 ساعت می‌باشد و در دمای 4^{o} C پایدارآن به مدت 48 تا 72 ساعت می‌باشد. بدون استفاده از ماده نگهدارنده, غلظت گلوکز

خون تقریبا 10 mg/dl در هر ساعت در دمای $25^{o}C$ کاهش می‌یابد. میزان کاهش در نوزادان بخاطر بالابودن فعالیت متابولیکی اریتروسیتهای آنها و در بیماران مبتلا به لوسمی به علت فعالیت متابولیکی زیاد گلبولهای سفید, بیشتر اتفاق می‌افتد(با سرعت بیشتری غلظت گلوکز کاهش می‌یابد).

فلورید سدیم بعلت اینکه دارای حلالیت کمی می‌باشد باید بخوبی مخلوط شده و با نمونه میکس شود و تا بتواند اثر مهارکنندگی خود را اعمال نماید. برای استفاده آن به تنهایی به عنوان یک ترکیب ضد انعقاد باید غلظت آن را سه یا چهار برابر حد معمول در نظر گرفت که البته در این حالت نیز ممکن است تغییر در غلظت بعضی از آنالیتها ایجاد شود زیرا در این حالت ممکن است جریان مایع از سلولها بدرون خون ایجاد شود و سلولها همانند مورد قبل که توضیح داده شد, چروکیده شوند و از طرف دیگر غلظت بعضی از ترکیبات تغییر نماید.

فلورید در غلظتهای بالا همچنین بر بعضی از آنزیمها ازجمله اوره‌آز (مورد استفاده در سنجش نیتروژن اوره خون) می‌تواند موثر بوده و آنها را مهار نماید.

سیترات:

از محلول سیترات سدیم بطور وسیعی در مطالعات مربوط به انعقاد و مکانیسمهای دخیل در آن استفاده می‌گردد زیرا اثر آن به آسانی با افزودن $Ca2+$ قابل برگشت می‌باشد. از آنجایی که سیترات باعث شلاته شدن کلسیم می‌گردد, بنابراین در اندازه‌گیری این عنصر نمیتوان از آن استفاده نمود. سیترات باعث مهار آمینوترانسفراز و آلکالین‌فسفاتاز و تحریک فعالیت اسیدفسفاتاز (هنگامی که فنیل‌فسفات به عنوان سوبسترا مورد استفاده قرار می‌گیرد) می‌گردد. بعلت اینکه سیترات با مولیبدات تشکیل کمپلکس می‌دهد, باعث تداخل در اندازه‌گیری آن می‌گردد.

اگزالات:

نمکهای سدیم, پتاسیم, آمونیوم و لیتیوم اسید اگزالیک باعث مهار واکنشهای انعقاد از طریق تشکیل کمپلکسهای نا محلول با یونهای $Ca2+$ می‌گردد. غلظت اگزالات مورد استفاده به ازای هر ml خون برابر با 2 mg تا 1 می‌باشد. در غلظتهای بالاتر از 3 mg/ml , ممکن است همولیز رخ دهد. اگزالات باعث مهار آنزیمهایی از قبیل اسیدفسفاتاز, آلکالین‌فسفاتاز و لاکتات‌دهیدروژناز می‌گردد.

یدواستات:

این ترکیب در غلظت 2 mg/ml به عنوان عامل مهارکننده گلیکولیز و جانشینی برای فلورید سدیم عمل می‌نماید و بنابراین به عنوان یک نگهدارنده محسوب می‌گردد. از آنجایی که *هیچ اثری روی اوره‌آز ندارد* بنابراین از این ماده می‌توان در اندازه‌گیری گلوکز و اوره بهره جست. این ترکیب تنها کراتین‌کیناز را مهار می‌نماید.

آزمایشات ارزیابی وضعیت قند خون

اندازه‌گیری میزان قند در مایعات بدن از جنبه‌های گوناگون حائز اهمیت می‌باشد. تشخیص بیماری دیابت یکی از اهدافی است که در بررسی‌های آزمایشگاهی قند در مایعات بدن مورد توجه قرار می‌گیرد. بطور کلی می‌توان گفت که مجموعه آزمایشات اندازه‌گیری میزان قند در ارتباط با بیماری دیابت به دو گروه قابل تقسیم هستند:

1. **آزمونهای تشخیص دیابت:**
   - ✓ **آزمایش قند ناشتای خون(FBS) :**
   - ✓ **آزمایش تحمل گلوکز خوراکی (OGTT):**
2. **آزمونهای کنترل دیابت:**
   - ✓ **اندازه‌گیری گلوکز در نمونه‌ها و زمانهای مختلف** [مانند: گلوکز پلاسمایی ناشتا, 2 ساعت پس از صبحانه, 4 یا 5 بعدازظهر]
   - ✓ **اندازه‌گیری هموگلوبین گلیکوزیله (HbA_{1c})**
   - ✓ **اندازه‌گیری گلوکز ادرار** (که در گذشته انجام می‌گردید و ارزش چندانی ندارد).

آزمایش قند خون (Blood sugar):

در بعضی از شرایط بنا به ضرورت طبیب معالج بدون توجه به وضع تغذیه‌ای بیمار درخواست قند خون می کند (که به دلیل نامشخص بودن وضعیت تغذیه‌ای بیمار, ارزش تشخیصی کمی برای دیابت دارد) که دو مورد مهم آن عبارت است از:

1) در موارد اورژانس بخصوص هنگامیکه مریض به حالت شوک است.
2) جهت تعیین انسولین تزریقی.

آزمایش قند ناشتای خون (Fasting blood Sugar):

نحوه انجام این آزمایش بدین صورت است که بیمار بعد از یک شب ناشتا بودن (حدود 12 ساعت) جهت تعیین قند خون به آزمایشگاه مراجعه می‌کند. مدت ناشتا بودن در مقدار جواب تأثیر دارد. در زمان ناشتا بودن شخص باید در حال استراحت باشد و نباید فعالیت بدنی داشته باشد. این آزمایش متداولترین روش تشخیصی می‌باشد که براساس مقادیر آن بیماران در سه گروه قرار می‌گیرند:

A. مقادیر کمتر از 110 mg/dL : که فرد **طبیعی** می‌باشد.

B. مقادیر بین 110 تا 125 mg/dL : که شامل افراد دارای **گلوکز ناشتای مختل** (Impaired Fasting Glucose) بوده که این افراد نیاز به انجام آزمایش تحمل گلوکز خوراکی (OGTT) دارند.

C. مقادیر برابر یا بیشتر از 126 mg/dL : که بعد از تایید برای بار دوم **دیابت** را مطرح می‌نماید.

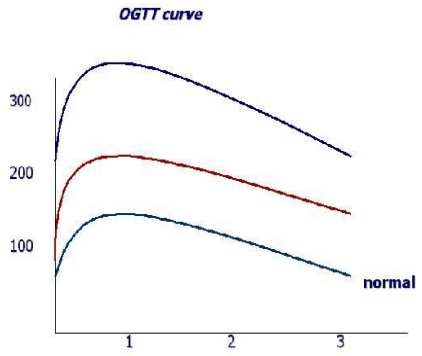
مقادیر طبیعی:

- برای سرم یا پلاسما به روش اختصاصی 70-110 mg/dl
- برای خون تام به روش اختصاصی 60-100 mg/dl

قند خون پایین تراز 40 mg/dl سبب صدمات مغزی شده و نیز قند خون بالاتر از 700 mg/dl نیز سبب کمای دیابتی گردد.

- o مقدار گلوکز در مایع مغزی- نخاعی حدود دو سوم یا 60-70% مقدار پلاسما است.
- o مقدار قند خون جنین حدود دو سوم الی سه چهارم قند خون مادر است.

آزمایش تحمل گلوکز خوراکی Oral Glucase Tulerance Test (OGTT) :



- در مبتلایان به **تحمل مختل گلـوکز (Impaired Glucose Tolerance)** مقـادیر بـه بـالاتر از 200 mg/dL تجـاوز نموده و بعد از 2 ساعت بین 140 تا 199 باقی می‌ماند.

- در افراد **دیابتی** مقادیر به بالای 200 رفته و بعد از 2 ساعت همچنان بالا باقی می‌ماند.

جهت انجام آزمایش تحمل گلوکز باید به موارد زیر توجه نمود:

1) متعادل بودن رژیم غذایی شخص از نظر کربو هیدرات چنانکه حداقل سه روز قبل از انجام آزمایش شخص روی رژیمی باشـد کـه روزانه حداقل 150 گرم کربوهیدرات در رژیم وی باشد.
2) این آزمایش برای بیماران بستری توصیه نمی‌شود چون منحنی آنها شبیه به اشخاص دیابتی می‌گردد.
3) عدم مصرف داروهایی که روی قند خون تأثیر دارند. مانند سالیسیلات‌ها، دیورتیک ها، داروهای ضدصرع در صورت مصرف این داروها باید سه روز قبل از آزمایش آنها را قطع نماید. خانمی که قرص ضدبار داری مصرف می‌کند باید در یک دوره ماهیانه آنـرا مصرف ننماید.
4) قبل از انجام آزمایش باید حداقل 10 ساعت ناشتا باشد اما بیشتر از 16 ساعت هم نباید ناشتا باشد.
5) در حین انجام آزمایش بیمار باید به حالت نشسته باشد و از کشیدن سیگار نیز خودداری نماید.
6) در حین انجام آزمایش بیمار تنها می‌تواند آب بنوشد.

در منحنی تحمل طبیعی مقدار قند خون ناشتا در حد طبیعی بوده که در مورد سرم یا پلاسـما 70-110 mg/dl اسـت. حـداکثر افـزایش گلوکز خون بعد از 30 الی 60 دقیقه بوده و از سطح آستانه کلیوی بالاتر نیست.

بنابراین در ادرار قند دیده نمی‌شود. در حدود 2 ساعت میزان قند خون کمی پایین‌تر از مقدار ناشتا بوده و سپس به آرامی به سطح حالت ناشتا باز می‌گردد.

آزمایش قند دو ساعت بعد از غذا (2hour PPBS) [Two-Hour postprandial Blood Sugar]

هموگلوبین گلیکوزیله (Glycosylated hemoglobin):

هموگلوبین موجود در گلبولهای قرمز خون بالغین و بچه‌ها شامل هموگلوبین A (90-95%)، هموگلوبین A_2 (کمتر از 2/5%)، هموگلوبین F (کمتر از 0/5%)، هموگلوبین A_{1a} (1/6%)، هموگلوبین A_{1b} (0/8%)، هموگلوبین A_{1c} (3-7%) می‌باشد.

به مجموع **HbA_{1a}، HbA_{1b} و HbA_{1c}، هموگلوبین سریع (Fast) ، هموگلوبین گلیکوزیله** یا **گلیکو هموگلوبین (Gly-Hb)** گفته می‌شود.

این سه نوع هموگلوبین در اثر اتصال قند به HbA بوجود می‌آیند. عمل گلیکوزیلاسیون بعد از ساخته شدن هموگلوبین به طور آهسته و پیوسته و غیر آنزیماتیک در دوران حیات گلبول قرمز (RBC) صورت می‌گیرد. با توجه به وجودآمدن یک ساختمان کتامین (Ketamine) پایدار، این عمل نسبتاً برگشت ناپذیر می‌باشد. کربوهیدرات به اولین اسید آمینه (Val) موجود در انتهای آمین زنجیره‌های گلوبین β (بتا) متصل می‌گردد. عقیده بر این است که سرعت تشکیل گلیکو هموگلوبین در صورت افزایش قند خون بیشتر خواهد بود. بیماران دیابتی که به خوبی وضعیت خود را کنترل نمی‌کنند دارای دو تا سه برابر مقدار طبیعی هموگلوبین گلیکوزیله می‌باشند. اندازه‌گیری قند در خون و ادرار نشان دهندهٔ سطح گلوکز خون در همان زمان است در حالیکه اندازه‌گیری هموگلوبین گلیکوزیله نشان دهندهٔ وضعیت بیمار در طی 8 الی 10 هفته قبل است و فاکتور خوبی جهت کنترل می‌باشد.

جهت اندازه‌گیری می‌توان از نمونه غیر ناشتا استفاده نمود. از ماده ضد انعقاد EDTA و نگهدارندهٔ فلورید سدیم استفاده کرد. نمونه‌ها در دمای ^0c 6-2 به مدت 5 روز قابل نگهداری می‌باشند. یکی از روشهای مورد استفاده، به کارگیری ستونهای کوچک تعویض یونی می‌باشد. از ستون تعویض یونی کاتیونی جهت جداسازی استفاده می‌گردد و بر اساس pH ستون هموگلوبین گلیکوزیله جدا می‌گردد. همچنین از روشهای الکتروفورز، رادیو ایمونواسی (RIA)، HPLC و ... نیز می‌توان استفاده نمود.

- مقدار هموگلوبین گلیکوزیله(مجموع انواع آن) در **حالت طبیعی**: 5-8%
- مقدار هموگلوبین گلیکوزیله در **بیماران دیابتی** که از انسولین استفاده می‌کنند: 10-22%

تست تحمل لاکتوز: (Lactose Tolerance Test)

از این آزمایش جهت ارزیابی نقص آنزیم لاکتاز استفاده می‌کنند، آنزیم لاکتاز (Lactase) سبب هیدرولیز لاکتوز به گلوکز و گالاکتوز می‌گردد. در صورت فقدان این آنزیم، لاکتوز در دستگاه گوارش باقیمانده و ایجاد اسهال نموده و در اثر عمل متابولیسم باکتریها ایجاد گاز نیز می‌نماید. جهت انجام آزمایش ابتدا یک آزمایش تحمل گلوکز خوراکی (OGTT) گرفته می‌شود. روز بعد به بیمار 100g لاکتوز به صورت شربت داده می‌شود و نمونه‌ها همانند آزمایش تحمل گلوکز خوراکی جمع‌آوری شده و میزان گلوکز آنها تعیین می‌گردد. در صورت وجود آنزیم لاکتاز هر دو منحنی تحمل مشابه می‌باشند. ولی در غیاب لاکتاز منحنی تحمل لاکتوز هموار (Flat) خواهد بود.

نمونه مصرفی جهت آزمایشات اندازه‌گیری قند خون:

نمونه مناسب جهت سنجش گلوکز، پلاسما یا سرم است. در بعضی از سنجشها می‌توان از خون تام استفاده نمود اما در این حالت مقدار گلوکز بستگی به هماتوکریت دارد. گلوکز خون تام از سرم یا پلاسما کمتر است. مقدار گلوکز پلاسما 1/11 برابر مقدار گلوکز خون تام

می‌باشد. (به عبارت دیگر گلوکز خون تام حدود 10% کمتر از گلوکز سرم است). در مورد نوزادان هنگامیکه مقدار نمونه کم است می‌توان از خون تام استفاده نمود.

به هنگام مجاورت سرم یا پلاسما با گلبولها در هر ساعت به میزان 7 درصد از مقدار قند کاسته می‌شود. در سرم غیر همولیزی که سلولها جدا شده‌اند معمولاً مقدار گلوکز بین 48 تا 72 ساعت در یخچال (4^0c) پایدار می‌ماند؛ در دمای اتاق (25^0c) مقدار قند تا 8 ساعت پایدار است. در دمای اتاق در نمونه غیر استریل باکتریها سبب کاهش گلوکز می‌شوند. در حالت لیوفیلیزه (Leuphilize) نمونه تا سه ماه قابل نگهداری می‌باشد.

جهت بدست آوردن نتایج نزدیک به مقدار واقعی باید به فاصله نیم ساعت بعد از نمونه‌گیری سرم یا پلاسما جدا گردد یا از ماده نگهدارنده‌ای مثل فلوئورید سدیم (NaF) استفاده کنیم که مهار کننده گلیکولیز بوده و تا حدودی خاصیت ضد انعقادی نیز دارد. یونهای فلوئورید آنزیم انولاز (Enolase) را مهار می‌نماید. توصیه می‌شود که برای جلوگیری از عمل انعقاد NaF را همراه با نمک سدیم EDTA یا اگزالات پتاسیم استفاده نماییم.

مقدار گلوکز در خون شریانی (Arterial Blood) و مویرگی (Capillary Blood) بیشتر از خون وریدی (Venus Blood) است. در حالت غیرناشتا این اختلاف خیلی بیشتر می‌گردد (حدود 20-30 mg/dl). بنابراین در آزمایش تحمل گلوکز تمام نمونه‌ها باید از یک نوع محل جمع‌آوری شود. به هنگام جمع آوری خون مویرگی در این آزمایش این مطلب باید در برگهٔ جواب آزمایش قید شود تا پزشک بتواند بدرستی نتایج را ارزیابی نماید.

هیپرگلیسمی (Hyperglyremia) در موارد زیر نیز دیده می‌شود:

- کاهش انسولین به دلیل التهاب پانکراس (pancreatitis)، سرطان پانکراس، هموکروماتوز (Haemochromatosis) و یا برداشتن کامل پانکراس.
- افزایش هورمون رشد (آکرومگالی)
- افزایش ACTH و کورتیزول
- افزایش اپی نفرین (فئو کروموسیتوما)
- افزایش تیروکسین (تیروتوکسیکوز)
- اثر بعضی از داروها (استروئیدها، دیورتیک‌های تیوآزیدی، پروپرانولول، فنیتوئین)
- افزایش گلوکاگون (glucagonoma)
- وجود آنتی بادی تحریک کننده گیرنده انسولین

کاهش قند خون (Hypoglysemia):

در هیپوگلیسمی قند خون شخص پایینی‌تر از حد نرمال می‌باشد (کمتر از 60 mg/dl) . نشانه‌های همراه با هیپوگلیسمی بستگی به سرعت شروع حالت هیپوگلیسمی دارد. اگر هیپوگلیسمی سریع رخ دهد، نشانه‌ها عبارتند از :لرزش، رعشه، عرق سرد، ضعف و اضطراب و اگر در بالغین مقدار قند به زیر 40 mg/dl و در نوزادان به زیر 25 mg/dl برسد حالت اغما (Coma) دست می‌دهد. اگر هیپوگلیسمی آهسته رخ دهد نشانه ها شامل : سردرد، زودرنجی و بیحالی می‌باشد.

هیپوگلیسمی در موارد زیر دیده می‌شود:

- افزایش انسولین (که می‌تواند به علت تزریق بیش از حد انسولین به یک فرد مبتلا به بیماری قند باشد و یا در اثر تومور پانکراس باشد)
- کاهش گلوکاگن
- کاهش اپی نفرین

- کاهش کورتیزول (بیماری آدیسون)
- کاهش ACTH
- کاهش هورمون رشد
- آسیب سلولهای کبدی، نقص در آزادسازی گلیکوژن کبدی
- اختلال در متابولیسم گالاکتوز
- مصرف اتانول

روشهای آنالیز کمی گلوکز:

روشهای اندازه‌گیری گلوکز در مایعات بیولوژیک را می‌توان به صورت زیر تقسیم بندی نمود:

الف- روشهای شیمیایی (Chemical methods):

(1) روشهایی که بر پایه خاصیت احیا کنندگی گلوکز می‌باشد:

1-1- استفاده از Cu^{2+} به عنوان اکسید کننده

* روش Folin-wu
* روش Somogyi-Nelson
* روش Benedict

1-2- استفاده از اکسنده‌هایی به جز Cu^{2+} مانند فری سیانید.

(2) روشهای تراکمی (Condensation)

* روش ارتوتولوئیدین (O-Toluidine)

ب) روشهای آنزیمی (Enzymatic method):

* روش گلوکز اکسیداز
* روش هگزوکیناز
* روش گلوکز دهیدروژناز

روش فولین - وو (Folin-Wn)

اساس این روش بدین صورت است:

$$\text{گلوکز} + Cu^{2+} \xrightarrow{\text{محلول قلیایی گرم}} \text{گلوکونات} + Cu^{+}\ (Cu_2o)$$

$$Cu^{+} + Mo\ (VI) \text{ معرف فسفومولیبدات حاوی} \rightarrow \text{blue molybdenum complex}$$

عوامل موثر در مقدار Cu^{+} بدست آمده عبارتند از:

دما، زمان انجام واکنش، میزان قلیایی بودن محیط واکنش، غلظت معرف، مقداری گلوکز

تداخل کننده منفی:

- اکسید اسیون مجدد Cu^{+} توسط اکسیژن

تداخل کننده مثبت:

- اجسام احیاکننده موجود در سرم که می‌توانند سبب کاهش Cu^{2+} گردند از جمله: قندهای‌احیاکننده دیگر، کراتینین، اسیداوریک، ترکیبات سولفیدریل دار، اسیدآسکوربیک

روش Somogyi-Nelson:

اساس این روش بدین صورت است:

$$Cu^{2+} + \text{گلوکز} \xrightarrow{\text{محلول قلیایی گرم}} Cu^{+} + \text{گلوکونات}$$

$$Cu^{+} + \text{آرسنومولیبدات} \rightarrow \text{کمپلکس آبی مولیبد نیوم}$$

- مواد تداخل کننده این روش مانند روش Folin-wu است.

روش اورتوتولوئیدین (Ortho-Toluidine):

برخی از آمین های آروماتیک می‌توانند در محیط اسیدی با گروه آلدئیدی قندها وارد واکنش تراکمی شده و ایجاد گلیکوزیل آمین نمایند که این ماده بعد از تغییر آرایش و ایجاد Schiff base، ایجاد مشتقات رنگ می‌نمایند.آمین‌های مورد استفاده عبارتند از آنیلین، بنزیدین، 2-آمینو بی فنیل، اورتوتولوئیدین که اکثر این مواد سرطان زا می‌باشند. معمولاً در اندازه‌گیری قند خون شدت رنگ در طول موج 630nm سنجیده می‌شود. چون در این طول موج جذب ترکیبات رنگی حاصل از واکنش آلدوپنتوزهای با معرف کم بوده لذا خطای حاصل از وجود آنها حداقل می‌شود.

تداخل کننده ها: قندهای دیگر به **ویژه مانوز و گالاکتوز، بیلی روبین**، هموگلوبین به میزان کم، اوره ، EDTA در غلظت بیش از 1 mg/dl، فلوئورید سدیم در غلظت بیش از 5 mg/dl

روش گلوکز اکسیداز/پراکسیداز:

این روش آنزیمی بر پایه واکنش‌های زیر می‌باشد:

$$\alpha \text{ - گلوکز} \xrightarrow{\text{موتاروتاز}} \beta \text{ - گلوکز}$$

$$\beta \text{ - گلوکز} + O_2 \xrightarrow{\text{گلوکز اکسیداز}} \text{گلوکونات} + H_2O_2 \quad \text{(واکنش اختصاصی)}$$

$$H_2O_2 + \text{(بی رنگ) کروموژن احیاشده} \xrightarrow{\text{پر اکسیداز}} H_2O + \text{کروموژن اکسید شده (غیر اختصاصی)}$$

مواد تداخل کننده منفی: اسیداوریک، اسیدآسکوربیک، بیلی روبین، گلوتاتیون (به دلیل واکنش با H_2O_2)، ناخالصی کاتالاز موجود در آنزیم پراکسیداز مصرفی (به دلیل تجزیه H_2O_2) هموگلوبین (به دلیل خاصیت پراکسیدازی)، تیمول (به دلیل مهار آنزیم‌ها).

معمولاً تا غلظت گلوکز 500 mg/dl منحنی استاندارد خطی است.

در روش گلوکز اکسیداز O_2 با استفاده از الکترود اکسیژن میزان مصرف اکسیژن سنجیده می‌شود و از روی آن مقدار گلوکز تعیین می‌گردد. در این روش جهت از بین بردن H_2O_2 ایجاد شده از اتانل یا I^- استفاده می‌شود. هموگلوبین در این روش به دلیل جذب O_2، ایجاد تداخل مثبت می کند.

روش هگزوکیناز:

$$\text{گلوکز} + ATP \xrightarrow{\text{هگزوکیناز}} ADP + \text{گلوکز 6- فسفات}$$

$$\text{گلوکز 6- فسفات} + NADP^{+} \text{ یا } NAD^{+} \xrightarrow{G6PD} \text{6-فسفوگلوکونات} + NADPH \text{یا} NADN$$

$$INT + PMS + NADPH \text{یا} NADN \rightarrow \text{ترکیبات رنگی } (\lambda_m=520)$$

به دلیل عدم تداخل کراتینین و اسیداوریک از این روش می‌توان جهت سنجش گلوکز در ادرار بهره جست. **روش رفرانس(مرجع)** جهت اندازه‌گیری گلوکز سرم استفاده از روش هگزوکیناز روی صاف شده عاری از پروتئین Somogyi-Nelson است.

از فلوئورید سدیم با غلظت 2mg/ml خون به عنوان نگهدارنده و نیز نمک سدیم EDTA با غلظت 1mg/ml چون به عنوان ماده ضدانعقاد بهره جست. از مواد ضدانعقاد دیگر مثل هپارین، اگزالات و سیترات نیز می‌توان استفاده کرد. نمونه‌های همولیزی که شامل بیش از 0/5 gr/dl هموگلوبین باشند نا مناسب هستند. چون استرهای فسفات و آنزیمهای آزاد شده از گلبولهای قرمز دارای اثر تداخلی می‌باشند. در این روش اسید آسکوربیک و اوریک اسید تداخل نمی‌کنند از روش هگزوکیناز جهت تعیین قند ادرار نیز می‌توان استفاده نمود.

جهت تبدیل این روش به روش رنگ سنجی می‌توان از واکنش سومی نیز استفاده کرد. در این واکنش از فنازین متو سولفات (PMS) و یک ترکیب تترازولیوم استخلافی به نام 2-(پارایدوفنیل) – 3-پارانیتروفنیل -5- فنیل تترازولیوم کلرید (INT) جهت واکنش با NADPH و ایجاد ترکیب رنگی که دارای حداکثر جذب در طول موج 520nm است استفاده می‌شود. معرف PMS-INT باید در یخچال نگهداری شود و بدور از نور باشد.

روش گلوکز دهیدروژناز (Glucose Dehydrogenase):

آنزیم گلوکز دهیدروژناز واکنش اکسیداسیون گلوکز و تبدیل آن به D-گلوکونو-4-لاکتون را کاتالیز می‌کند.

$$\text{گلوکز-D-}\beta\text{+}NAD^{+} \xrightarrow{\text{گلوکز دهیدروژناز}} \text{D-گلوکونو-4-لاکتون} + NADH + H^{+}$$

جهت کم شدن زمان رسیدن به پایان واکنش آنزیم موتاروتاز نیز اضافه می شود. مقدار NADH تولید شده متناسب با غلظت گلوکز است. این واکنش برای گلوکز بسیار اختصاصی بود. و جواب حاصل از این روش، توافق خوبی با جواب حاصل از روش هگزوکیناز دارد. مواد نگهدارنده و ضدانعقاد فلوئورید، بدواستات، هپارین، EDTA، سیترات و اگزالات در این روش تداخل ایجاد نمی نمایند .

لیپیدها ، اختلالات متابولیسم و روشهای اندازه‌گیری آنها

مقدمه:

لیپیدها از ترکیبات آلی و معمولا نامحلول در آب و مایعات بیولوژیک بوده که در سرم به صورت امولسیون (شیلومیکرونها) ویا به صورت ترکیب با سایر پروتئینها (لیپوپروتئین) یافت شده و به عنوان ذخایر اصلی انرژی در بدن بکار می‌روند. لیپیدهای پلاسما از نظر زمینه ابتلا به آترواسکلروز و بیماریهای کرونر قلبی حائز اهمیت هستند. با مطالعات زیادی که در زمینه متابولیسم چربی‌ها و ارتباط آن با سلامت و طول عمر صورت گرفته، درخواست وارزیابی چربی‌های خون در آزمایشگاههای بالینی بیش از پیش صورت می‌پذیرد و بخش مهمی از روشهای بیوشیمی را به خود اختصاص می‌دهد. لیپیدهای اصلی پلاسما شامل کلسترول ، تری‌گلیسریدها و فسفولیپیدها بوده و مقادیر کمتری نیز به صورت اسیدهای چرب آزاد (FFA) ، منو و دی گلیسریدها، استرولها و ویتامینهای محلول در چربی یافت می‌شوند، که نقش حساس آنها را در متابولیسم کلی بدن مشخص می‌سازد. ارزیابی لیپیدهای سرم با روش مستقیم سنجش و الکتروفورز لیپیدهای سرم صورت می‌گیرد.

لیپیدهای عمده پلاسما:

کلسترول: هر ملکول کلسترول از استروئیدهای الکلی اشباع نشده تشکیل شده است که در ساختمان غشاء سلولی بکار رفته و از ترکیبات پیش‌ساز در بیوسنتز اسیدهای صفراوی ، هورمونهای استروئیدی و ویتامین D به شمار می‌آید . مقدار قابل توجهی از آن از طریق رژیم غذایی جذب بدن شده و یا توسط بافتهای مختلف نظیر کبد سنتز می‌گردد. استریفیکاسیون کلسترول در کبد صورت می‌گیرد. حدودا دو سوم (70%) از آن به صورت استریفیه (به همراه اسیدهای چرب با زنجیره سنگین) در سرم وجود داشته و مابقی به صورت آزاد و یا غیر استریفیه یافت می‌شود. در آزمایشگاه کلسترول استر و آزاد به نام کلسترول تام به طور روتین اندازه‌گیری می‌شود. سنجش کلسترول از نظر پاتوژنز آترواسکلروز و بیماریهای قلبی حائز اهمیت هستند. مقادیر نسبی کلسترول‌های استریفیه و آزاد از معیار مناسبی در ارزیابی عملکرد کبد به شمار می‌آید. 70-60 درصد از کلسترول تام سرم در لیپوپروتئینهای با دانسیته کم (LDL) ، و 35-20 درصد آن به صورت (HDL) ، و 15-12 درصد آن در لیپوپروتئینهای VLDL موجود می‌باشند. از علل مهم **افزایش کلسترول سرم(هیپرکلسترولمی یا Hypercholestrolemia)** سرم به قرار زیر است:

1- *هیپرلیپوپروتئینمی اولیه:* نقص‌های ارثی در لیپوپروتئینها (نقص در مرحله تشکیل، انتقال یا تخریب آنها).
2- *سندرم نفروتیک:* هنگامی که ادم وجود داشته باشد ، که در گلومرولونفریت مزمن تا 600-700 mg/dl افزایش می‌یابد.
3- *هیپوتیروئیدیسم (مثلا در میکزودم):* که در این حالت گیرنده‌های LDL در سلولهای کبدی کاهش می یابد.
4- *در یرقان انسدادی (کلستاز):* هنگامی که انسداد مجاری صفراوی بزرگ(ازجمله بدلیل وجود سنگهای صفراوی و ...) وجود دارد.
5- *در دیابت ملیتوس:* به علت افزایش استیل‌کوآنزیمA که باعث افزایش کلسترول می‌گردد. همچنین به دلیل اینکه در این بیماری گیرنده‌های LDL گلیکوزیله می‌گردند و ویژگی خود را از دست می‌دهند منجر به افزایش LDL در خون می‌گردند.
6- *سیروز صفراوی اولیه .*

از علل مهم **کاهش کلسترول سرم (هیپوکلسترولمی یا Hypocholestrolemia)** سرم به قرار زیر است:

1- هیپرتیروئیدیسم .
2- سوءتغذیه شدید (Sever malnutrition) .
3- سندرم سوءجذب (Malabsorption syndrome) .
4- آسیب پارانشیم کبدی .
5- کم خونی شدید یا بدخیم (Pernicious anemia) .
6- یرقان همولیزی .

7- هیپوبتالیپوپروتئینمی و آبتالیپوپروتئینمی .
8- کاهش در دوره درمان با کولوفیبرات ، کلستیرامین و نیکوتینیک‌اسید .

تری‌گلیسریدها (TG): یا تری‌آسیل‌گلیسرولها استرهای گلیسرول هستند که دارای زنجیره‌های بلند اسید چرب بوده و معمولا سه اسید چرب مختلف در آنها موجود است. این ترکیبات پس از هیدرولیز در دستگاه گوارش به منوگلیسرید و اسیدهای چرب و گلیسرول تجزیه می‌شوند و پس از جذب و سنتز مجدد در سلولهای مخاطی به جریان خون راه می‌یابند. همچنین 95 درصد از مواد چربی بدن را تشکیل می‌دهند. اکثرا به صورت شیلومیکرون و VLDL در پلاسما حل شده و در عین حال LDL و HDL نیز حاوی مقادیر جزئی از آن است. **افزایش تری‌گلیسریدهای سرم (هیپرتری‌گلیسریدمی)** در موارد زیر دیده می‌شود:

1- *هیپرلیپیدمی‌خانوادگی*: افزایش متوسط تری‌گلیسریدها (250-500 mg/dl) در موارد هیپرلیپوپروتئینمی مشاهده می‌شود که با افزایش خطر ابتلا به انفارکتوس قلبی همراه است .
2- *بیماریهای کبدی و الکلیسم* .
3- *دیابت شیرین*: به ویژه در موارد کنترل نشده و همراه با هیپرگلیسمی .
4- *پانکراتیت* .
5- *انفارکتوس میوکارد*.
6- *داروها* : قرصهای ضد حاملگی ، استروژنها ، بتابلوکرها و ... .
7- *عوامل متفرقه دیگر* : مانند نقرس ، سندرم نفروتیک و هیپوتیروئیدیسم .

کاهش تری‌گلیسریدهای سرم (هیپوتری‌گلیسریدمی) در مواردی مانند هیپوبتالیپوپروتئینمی ، آبتالیپوپروتئینمی مادرزادی ، سوءتغذیه و سوءجذب دیده می‌شود .

نکته1: باید در نظر داشت که سنجش تری‌گلیسریدها در شرایط ناشتای 12-24 ساعته صورت می‌گیرد.
نکته2: افزایش تری‌گلیسریدها به تنهایی عامل تعیین‌کننده در بروز بیماریهای آترواسکلروزی نبوده و مستقلا به عنوان عامل خطر (Risk factor) شناخته نمی‌شود.

فسفولیپیدها (PL) : از مهمترین فسفولیپیدهای خون میتوان به لسیتین(فسفاتیدیل‌کولین) و اسفنگومیلین اشاره نمود. فسفولیپیدها عمدتا در سلولهای مخاطی روده و سپس در کبد سنتز می‌شوند و از اجزای مهم سلولها به ویژه سلولهای عصبی می باشند. فسفولیپیدهای پلاسما به صورت لیپوپروتئینها جریان دارند که 25% از حجم توده‌های LDL و 30% HDL را تشکیل می‌دهد. فسفولیپیدها در اختلالاتی مانند **بیماری گوشه** و **تی‌ساکس** به جریان خون راه می‌یابند.

اسیدهای چرب (Fatty acid) : اسیدهای چرب آزاد از منابع بسیار مهم تامین انرژی هستند. از نظر کمی جزء بسیار کوچکی از لیپیدهای تام پلاسما را تشکیل می‌دهند.

نکته1: منظور از اسیدهای چرب آزاد ، اسیدهای چرب غیر استریفیه می‌باشد.
نکته2: اسیدهای چرب آزاد پلاسما عمدتا به وسیله آلبومین انتقال می‌یابد.

لیپوپروتئینها (Lipoproteins)

همانطور که قبلا اشاره شد لیپیدها در آب و مایعات بیولوژیکی نامحلول‌اند و انتقال آنها در خون به واسطه لیپوپروتئینها که ترکیبی از مواد لیپیدی با پروتئینها ی محلول در آب می‌باشند، صورت می گیرد. لیپوپروتئینها را بر حسب اندازه، خصوصیات فیزیکوشیمیایی، و نیز تحرک الکتروفورزی، وزن مخصوص و میزان شناوری (Floatation rate) تقسیم‌بندی می کنند. چگالی چربی خالص از آب کمتر است ، هر چه نسبت لیپید به پروتئین در یک لیپوپروتئین بیشتر باشد چگالی آن کمتر است. از این خاصیت برای تفکیک انواع لیپوپروتئینهای پلاسما با **اولتراسانتریفوژ** استفاده می‌شود. علاوه بر FFA ، چهار گروه اصلی لیپوپروتئینها شناسایی شده‌اند که ازنظر فیزیولوژیکی و در تشخیص بالینی مهمند:

1) **شیلومیکرونها** که از جذب تری‌آسیل گلیسرولها در روده بوجود می‌آیند،
2) **لیپوپروتئینهای بسیار کم‌چگالی** (VLDL یا لیپوپروتئینهای پرهβ) که حاصل صدور تری‌آسیل گلیسرول از کبد هستند،
3) **لیپوپروتئینهای کم‌چگالی**(LDL یا لیپوپروتئینهای α) که نمایانگر مرحله نهایی کاتابولیسم VLDL هستند،
4) **لیپوپروتئینهای پرچگالی**(HDL یا لیپوپروتئینهای α) که در متابولیسم شیلومیکرونها و VLDL و نیز انتقال کلسترول دخیلند.

نکته: لیپید بارز شیلومیکرونها و VLDL تری‌آسیل گلیسرول ، لیپید بارز LDL کلسترول و لیپید بارز HDL فسفولیپید است .

علاوه بر تکنیکهای مبتنی بر چگالی که برای جداسازی لیپوپروتئینها بکار می‌روند، از روی خاصیت الکتروفورزی هم می‌توان آنها را به لیپوپروتئینهای α ، پرهβ ، β تفکیک کرد و با روشهای ایمونوالکتروفورز به طور دقیقتر شناسایی نمود.

شیلومیکرونها Chilomicrones :

شیلومیکرونها در مقایسه با لیپوپروتئینهای دیگر، کمترین وزن مخصوص (0/95) را دارند، که بصورت ذرات درشت در سلولهای مخاطی روده تشکیل شده و به جریان خون راه می‌یابند. از خصوصیات مهم شیلومیکرونها ، *انتقال تری‌آسیل گلیسرولهای اگزوژن (یا منشاء خارجی)* از دستگاه گوارش می‌باشد ، که به علت وزن مخصوص کم ، بصورت ذرات درشت در پلاسما شناور هستند و در صورت افزایش **حالت شیری رنگ** به آن می‌دهند. ذرات شیری رنگ پلاسما در افزایش شیلومیکرونها ، در صورت رکود، به صورت مایع کرم رنگ غلیظ ظاهر می‌شوند، و در عرض چند ساعت در سطح آب تجمع می‌یابند. آپولیپوپروتئینهای شیلومیکرونها از نوع Apo A , Apo C , Apo E Apo B-48 هستند. تری‌آسیل گلیسرولهای موجود در شیلومیکرونها ، تحت تاثیر لیپازهای لیپوپروتئینی خون بتدریج هیدرولیز شده و حذف می گردند و ذرات کوچکی به نام بازمانده لیپوپروتئین یا Lipoprotein remnants را از خود به جای می گذارند.

لیپوپروتئینهای بسیار کم‌چگالی (VLDL):

لیپوپروتئینهای این گروه کوچکتر از شیلومیکرون بوده و حاوی مقادیری کمتری از تری‌گلیسریدهای خنثی (50%) می‌باشند که بصورت ذرات درشت معلق در پلاسما شناورند و در صورت افزایش حالت **کدورت (Turbidity)** بدان میدهند. لیپوپروتئینهای VLDL تری-گلیسریدهای اندوژن (یا منشا داخلی) را از کبد به سایر سلولهای بدن انتقال می‌دهند. 40% از حجم آنها را کلسترول و فسفولیپیدها تشکیل داده و 10% بقیه را آپولیپوپروتئینهای Apo E , Apo C, Apo B-100 می‌باشد. وزن مخصوص متوسط VLDL 1/006 و کمتر می‌باشد، که در الکتروفورز چربی‌ها در گروه پرهβ قرار می‌گیرند. ذرات مزبور تحت تاثیر لیپوپروتئین لیپاز ، بتدریج هیدرولیز شده و تری-گلیسریدهای کوچکتر آن جدا می گردند. بازمانده آنها ذرات کوچکتر با دانسیته متوسط می‌باشند که در مجموع VLDL remnants و یا لیپوپروتئینهای با دانسیته متوسط Intermediate Density نامیده می‌شوند.

لیپوپروتئینهای با چگالی متوسط (IDL):

لیپوپروتئینهای با دانسیته متوسط ، ترکیب واسطه در تبدیل VLDL به LDL می‌باشند که متعاقب کاتابولیسم VLDL پدیدار شده و به علت تبدیل شدن به LDL در خون مشخص نمی‌شوند.

لیپوپروتئینهای کم‌چگالی (LDL):

این لیپوپروتئینهای با دانسیته کم Low Density Lipoprotein حاوی مقادیر بیشتر (حدودا 50%) کلسترول ، بخصوص کلسترول استریفیه بوده ، و 50% از کل لیپوپروتئینهای سرم را تشکیل می‌دهند. اینها ذرات در مقایسه با ذرات قبلی بسیار کوچکتر هستند و حاوی مقادیر بیشتری از پروتئین (حدود 25%) و عمدتا از نوع Apo B-100 می‌باشند. وزن مخصوص LDL در مقایسه با گروههای قبلی بیشتر است(1/063-1/019). افزایش آن باعث کدورت پلاسما نمی‌گردد. این لیپوپروتئینها در الکتروفورز همراه با IDL در باند β نوار الکتروفورز قرار می‌گیرند. مقدار طبیعی کلسترول آن کمتر از 160 mg/dl میباشد و افزایش آن با احتمال بروز بیماریهای کرونر قلبی نسبت مستقیم دارد. علل مختلف افزایش آن را میتوان بصورت زیر خلاصه نمود:

1) هیپرکلسترولمی و هیپرلیپیدمی فامیلی
2) دیابت شیرین و هیپوتیروئیدیسم
3) بیماریهای مزمن کلیه و سندرم نفروتیک
4) رژیم غذایی پرچربی (به خصوص اسیدهای چرب اشباع شده و پر کلسترول)
5) حاملگی و تاثیر داروها (استروژن ، استروئیدهای آنابولیک و داروهای بتابلوکر)
6) مالتیپل میلوما

لیپوپروتئینهای با چگالی بالا (HDL):

نقش این نوع از لیپوپروتئینها انتقال کلسترول از سلولهای بدن (بافتهای خارج کبدی) به کبد می‌باشد. نسبت به سایر لیپوپروتئینها مقدار آنها در پلاسما کمتر است. HDL از لحاظ محتوا ، حاوی 50 درصد پروتئین (با ارجحیت: آپو A-I و آپو A-II و مقداری آپو C و آپو E)، 20 درصد کلسترول (اکثرا به صورت استریفیه)، حدود 30 درصد فسفولیپید و مقادیر جزئی تری‌گلیسرید می باشد. HDL را میتوان به دو زیرگروه اصلی HDL_2 و HDL_3 تقسیم نمود. این لیپوپروتئین توسط سلولهای کبد و بافت مخاطی روده سنتز میشوند و در الکتروفورز لیپیدها در منطقه α1 تحرک دارند. بعلت کاهش HDL در موارد استرس ، تروما و نیز بیماری و اعمال جراحی ، انجام آزمایش در بیماران بستری جهت هیپرلیپیدمی توصیه نمیگردد. کلسترول HDL با احتمال بروز بیماریهای کرونر قلبی ارتباط معکوس دارد، به عبارت دیگر هرچقدر میزان HDL کاهش یابد میزان خطر افزایش می یابد و بالعکس.

علل مختلف افزایش کلسترول HDL عبارتند از:

1) ورزش و فعالیتهای بدنی .
2) افزایش کلیرانس تری‌گلیسریدهای موجود در VLDL و نیز مصرف متعادل الکل.
3) استروژن و موارد درمان با انسولین.

علل مختلف کاهش کلسترول HDL عبارتند از:

1) استرس و بیماریهای جدید (انفارکتوس میوکارد ، تروما و اعمال جراحی).
2) گرسنگی شدید (Starvation) ، چاقی ، فقدان فعالیت و استعمال دخانیات.
3) دیابت شیرین(ملیتوس) ، هیپوتیروئیدیسم و افزایش تری‌گلیسرید سرم.
4) بیماریهای کبد و کلیه (نفروز و اورمی).
5) برخی از داروها (استروئیدهای آنابولیک، پروژسترون و داروهای فشار خون از انواع بتابلوکر.
6) هیپوآلفالیپوپروتئینمی فامیلیال و اختلالات ژنتیکی نادر.

روشهای شیمیایی اندازه‌گیری تری‌گلیسرید(TG):

مراحل این روشها عبارت است از:

1) استخراج TG از نمونه بوسیله حلالهای آلی
2) هیدرولیز(صابونی نمودن) TG
3) تبدیل گلیسرول به فرمالدئید بوسِله پریدات
4) تعیین مقدار فرمالدئید.

فرمالدئید از طریق واکنش با اسید سولفوریک ایجاد رنگ صورتی می‌نماید که با اندازه‌گیری شدت رنگ, میزان TG بدست می‌آید.

روشهای آنزیمی اندازه‌گیری تری‌گلیسرید(TG):

در این روشها از روی مقدار گلیسرول حاصل از هیدرولیزTG مقدار تری‌گلیسرید محاسبه می‌گردد که روش متداول بصورت زیر است:

اسید چرب + گلیسرول ---------- 3H2O + تری‌گلیسرید

ADP + گلیسرول3- فسفات ---------- ATP + گلیسرول

H2O2 + دی هیدروکسی استون فسفات ---------- O2 +گلیسرول3-فسفات

(λ =500 nm) ترکیب رنگی + H2O ---------- کروموژن + H2O2

گلیسرول آزاد موجود در پلاسما (که مقدار آن ناچیز است) و بیلیروبین در این روش تداخل ایجاد می‌نمایند. در صورت استفاده از پلاسمای تهیه شده با EDTA باید نتایج در 1/03 ضرب شود. میزان طبیعی تری‌گلیسرید کمتر از 165 mg/dl می‌باشد.

آنالیز کمّی کلسترول:

بطور کلی شیوه های متفاوتی برای اندازه‌گیری لیپیدهای پلاسمایی وجود دارد که عبارتند از:

1) شیوه مستقیم(direct) یا سنجش تک مرحله‌ای:

در این شیوه از سرم یا پلاسما مستقیما جهت اندازه‌گیری لیپید استفاده می‌گردد. اشکال عمده این روش حضور مواد تداخل‌کننده در نمونه می‌باشد.

2) شیوه غیر مستقیم(indirect) یا سنجش چند مرحله‌ای که به روشهای مختلف انجام میشود:

الف- استخراج لیپیدها(روش دو مرحله‌ای).

با استفاده از حلال مناسبی مانند ایزوپروپانل لیپیدها استخراج و سپس سنجش میشوند.

ب- استخراج همراه با هیدرولیز(روش سه مرحله‌ای).

جهت هیدرولیز می‌توان از مواد شیمیایی یا آنزیمها استفاده نمود.

پ- استخراج همراه با هیدرولیز و راسب نمودن(روش چهار مرحله‌ای).

بعد ازاستخراج و هیدرولیز بوسیله افزایش دیژیتونین, کلسترول راسب می‌گردد.بعد از جداسازی و شستشوی رسوب حاصل بوسیله هیدرولیز اسیدی کلسترول از دیژیتونین جدا و سنجش می‌شود.

دیژیتونین با استروئیدهایی که در موقعیت کربن سه دارای گروه هیدروکسیل به حالت بتا باشند واکنش می‌دهد.

روش آنزیمی اندازه‌گیری کلسترول:

اسید چرب + کلسترول ---------- H2O + استرهای کلسترول

در پاره‌ای از موارد هیدرولیز آنزیمی استرهای حاوی ریشه آسیل بزرگ مانند آراشیدونات بخوبی انجام نمیشود.

کلسترول + O2 ---------- Cholest-4-ene-one + H2O2

ترکیب رنگی (λ =510 nm) + H2O ---------- کروموژن + H2O2

روش شیمیایی لیبرمن-بورچارد (Libermann-Burchard) :

در این روش کلسترول با اسید قوی و غلیظ واکنش داده و ایجاد محصولات رنگی مینماید. اسید استیک و آنیدرید استیک در این روش به عنوان حلال و آبگیرنده عمل نموده و اسید سولفوریک به عنوان آبگیرنده و اکسنده می‌باشد. در این روش کلسترول آزاد و استریفیه به یک نسبت ایجاد رنگ نمی‌نمایند. بیلیروبین ایجاد تداخل مثبت میکند.

روش شیمیایی هنلی یا واکنش اسیدی نمک آهن(Iron salt acid reaction):

معرف مورد استفاده در این روش حاوی اسید سولفوریک غلیظ , اسید استیک و محلول کلرید آهنIII است. رنگ حاصل در این روش دارای شدت و پایداری بیشتری نسبت به لیبرمن-بورچارد است.

میزان طبیعی کلسترول تام: 150-220 mg/dl (بعد از 14-12 ساعت ناشتایی) می‌باشد. عوامل موثر در میزان طبیعی کلسترول : سن , جنس , رژیم غذایی , زمان نمونه‌گیری.

اندازه‌گیری لیپوپروتئینهای پلاسمایی:

اضافه نمودن هپاران سولفات و Mn^{2+} به سرم سبب راسب شدن لیپوپروتئینهای شامل آپوB (یعنی LDL , VLDL) می‌گردد. با اندازه‌گیری میزان کلسترول در مایع روی رسوب می‌توان مقدار HDL-کلسترول را بدست آورد. هنگامی که مقدار TG کمتر از 400 mg/dl باشد مقدار VLDL حدود یک پنجم مقدار TG میباشد:

LDL کلسترول = کلسترول تام - HDLکلسترول - VLDLکلسترول

نکات مورد توجه در نمونه‌گیری, آماده‌سازی بیمار و نگهداری نمونه:

1. ناشتا بودن.
2. وضعیت قرارگیری فرد.
3. عدم تغییر عادات غذایی به مدت دو هفته قبل از آزمایش و نیز ثابت نگهداشتن وزن بدن.
4. عدم انجام ورزش.
5. عدم وجود هیپرشیلومیکرونمی.
6. عدم مصرف الکل.
7. عدم وجود استرس و هیجانات روحی.
8. عدم استفاده طولانی مدت از تورنیکه(گارو).
9. عدم نگهداری نمونه در دمای اتاق به مدت طولانی(باعث افزایش فعالیت LCAT می‌گردد). نمونه‌ها در دمای یخچال(4 درجهC) فقط برای چند روز و در دمای منفی 20 درجه C برای چند ماه پایدار می‌باشد.
10. عدم مصرف داروهای پایین‌آورنده لیپیدهای خون و داروهای استروئیدی.
11. شیفت آب از RBC بدرون پلاسما ودر نتیجه رقیق شدن آن در صورت استفاده از ضد انعقادهایی مانند اگزالات, سیترات و فلوئورید.

مقادیر طبیعی در سرم (برحسب mg/dl):

- تری‌گلیسرید(TG): در مردان: 160- 40
  در زنان: 135- 35
  (در سیاهپوستان مقدار آن mg/dl 20-10 بالاتر است)
- کلسترول تام(Total): 220- 140
- HDL-C : در مردان: 70-30
  در زنان: 85-30
  (در سیاهپوستان مقدار آن mg/dl 10 بالاتر است)
- VLDL-C : کمتر از 40
- LDL-C : 175-65 (در زنان مقداری پایین‌تر است)

پروتئین های پلا سما

صدها پروتئین مختلف درپلاسمای خون حضوردارند که مجموعا بنام Plasma Proteins معروفند. غلظت این پروتئینها حاصل تعادل بین سنتز(Anabolism) وکاتابولیسم(Catabolism) میباشد. این پروتئینها شامل: پروتئینهای فازحاد (Acute Phase Proteins) یا APPs پروتئینهای ناقل، فیبرینوژن وفاکتورهای انعقادی دیگر ، اجزای کمپلمان ، ایمونوگلبولینها(Ig) ، مهارکننده های آنزیمی و... میباشد. سنتز اکثر این پروتئینها درکبد صورت میگیرد و به درون جریان خون وارد می‌گردند و همچنین تخریب(کاتابولیزه شدن) این پروتئینها درکبد صورت میگیرد.

این پروتئین ها اعمال بسیار متنوعی دارند که از آن جمله میتوان به عمل **انتقال مواد** و ترکیبات مختلف درخون ، **برقراری فشار انکوتیک، عمل تامپونی، عمل دفاعی، واکنشهای انعقادی** و **فیبرینولیز** و اعمال متفرقه اختصاصی دیگر اشاره نمود. حرکت پروتئین ها به خارج از عروق نه تنها به وسیله ی انتشار غیرفعال که بوسیله انتقال فعال و پینوسیتوز و اگزوسیتوز نیز صورت میگیرد.

پروتئینها در جریان الکتریکی در محیطهای پایه نظیر ژل آگارز ، استات سلولز و. . . وحرکت کرده و برحسب خصوصیات فیزیکی و میزان و نوع بار الکتریکی به طرف آند یا کاتد حرکت می‌نمایند. در صورت استفاده از محیط اسیدی گروه آمین ($-NH_2$) اسیدهای آمینه یونیزه شده و بعلت وجود بار الکتریکی مثبت به طرف کاتد حرکت می‌کنند. در محیطهای قلیایی عامل کربوکسیل یونیزه شده ملکولهای حامل بارمنفی به طرف آند حرکت می‌کنند. در محیط استات سلولز در pH=8/6 پروتئینهای حامل بار الکتریکی زیاد با سرعت بیشتر و پروتئینهای حامل بار الکتریکی کم با سرعتی کمتر به سمت قطب مثبت حرکت کرده و تفکیک آنها را بصورت باندهای مختلف : **Prealbumine , Albumine , α_1 , α_2 , β (β_1, β_2) , γ** میسر میسازند. پس از اتمام الکتروفورز، نوار مزبور را در محلول رنگ‌آمیزی و سپس در فیکساتور(Fixator) قرار داده، پس از شستشو با اسید استیک رقیق بوسیله دستگاه دانسیتومتر غلظت هر یک از اجزا که در ژل به صورت باندهایی ظاهر شده‌اند اندازه‌گیری و طرح مزبور با طرح(یا الگوی) طبیعی مورد مقایسه قرارمیگیرد. تفسیر الکتروفورز پروتئینهای سرم که با استفاده از الگوهای خاص صورت میگیرد ویژگیهایی را در ارتباط با بیماریهای مختلف (سیروز ، مالتیپل میلوما ، سندرم تفروتیک و . . .) نشان میدهد که از نظر تفسیر شرایط بالینی از اهمیت خاصی برخوردار میباشد و برای بدست آوردن نتایج دقیقتر از روشهای ایمونولوژیک (مانند: **Enzyme Linked Immunosorbent Assay** یا **ELISA**) میتوان استفاده نمود.

مقدار پروتئین تام سرم 6-8 gr/dl می باشد که از این مقدار 3/5-5/5 gr/dl مربوط به آلبومین می‌باشد و مقدار گلبولینها بین 2-3/5 gr/dl میبا شد. از جمله پروتئینهایی که در دسته α_1-گلبولینها قرار دارد: **α_1-اسیدگلیکوپروتئین(AAG)** ، **α_1-آنتی-تریسپین(AAT)** و **α_1-فیتوپروتئین(AFP)** می باشد. از دسته α_2-گلبولینها می‌توان به **α_2-ماکروگلبولین(AMG)** ، **سرولوپلاسمین(Cp)** و **هاپتوگلوبین(Hp)** اشاره نمود. از دسته β_1 : **ترانسفرین TRF (سیدروفیلین)** و **فاکتورکمپلمان C_4** و از گروه β_2 میتوان به **β_2- میکروگلبولین(BMG)** و **C_3** اشاره نمود. از جمله پروتئینهایی که در ناحیه γ ظاهر میشوند: انواع مختلف **γ-گلبولینها** (آنتی بادیها) از قبیل IgG, IgM و . . . و همچنین **پروتئین واکنشگر C** یا **CRP** را می‌توان نام برد. همچنین در ناحیه پره آلبومین پروتئینهایی مانند : **پروتئین باند شونده به رتینول(RBP)** و **ترانس تایرتین(TTR)** را می توان نام برد. غلظت تمام یا بعضی از پروتئینهای مذکور در شرایط پاتولوژیکی مختلف ممکن است تغییر نماید. معمولترین تغییرات در غلظت پروتئینها در حالات بیماری که عموما به نام **پاسخ فاز حاد(APR) یا Acute Phase Response** معروف هستند دیده میشود که یک پاسخ غیراختصاصی در حالت التهابی (مانند: عفونت ، بیماری های ایمنی و. . .) و آسیب بافتی (مانند : تروما ، جراحی ، انفارکتوس میوکارد، تومورها و . . .) میباشد. پروتئینهایی که متاثر از این پاسخ (پاسخ فاز حاد) هستند معروف به **پروتئینهای فاز حاد(APP) یا Acute Phase Protein** میباشند. غلظت بعضی از آنها در پاسخ به APR افزایش می‌یابد که به نام *Positive APPs (پروتئینهای فاز حاد مثبت)* معروف هستند. ازجمله پروتئینهایی که در این دسته جای میگیرند می‌توان از: α_1- اسیدگلیکوپروتئین(AAG) ، α_1- آنتی-تریسپین(AAT) ، سرولوپلاسمین(Cp) و هاپتوگلوبین(Hp) ، C_4 ، C_3 و CRP نام برد. غلظت گروه دیگری از پروتئینها در پاسخ به APR کاهش میابد که به نام *Negative APPs (پروتئینهای فاز حاد منفی)* معروفند. مانند : TTR ، آلبومین و ترانسفرین(TRF) .

آلبومین

یک پروتئین گلبولی کوچک ، با وزن ملکولی 66 KDa می‌باشد. ***پروتئین عمده پلاسما* محسوب می‌گردد** و بیشتر از نیمی از پلاسما را تشکیل می‌دهد. به همین علل این پروتئین جزو پروتئین عمده و اصلی در مایعا ت خارج عروقی بدن از قبیل مایع بینابینی، ادرار و مایع آمنیوتیک میباشد ***تقریبا 60%آلبومین تام بدن در فضاهای خارج عروقی حضور دارد. این ترکیب فاقد زنجیره جانبی کربوهیدراتی میباشد*** ولی به میزان زیاد درآب محلول می‌باشد و این حلالیت به علت بار خالص منفی زیادی است که درpH فیزیولوژیکی در سطح آن وجود دارد.

بیو شیمی و عملکرد آلبو مین

افزایش میزان آلبومین در سلولهای پارانشیم کبدی سنتز می گردد و در مواردی مانند **سندرم نفروتیک** ممکن است میزان تولید آن تا 300 درصد یا بیشتر از آن، از حد معمول(طبیعی) آن صورت گیرد. کنترل میزان سنتز آلبومین توسط فشار اسمزی کلوئیدی (Colloidal Osmotic Pressure) و نیز توسط میزان دریافت پروتئین صورت میگیرد. نیمه عمر پلاسمایی آلبومین 20- 15 روز است. **از اعمال اصلی آلبومین حفظ فشار اسمزی در فضاهای عروقی و خارج عروقی می‌باشد** که تعادل مداومی بین آن دو ایجاد می‌نماید. آلبومین همچنین به بسیاری از ترکیبات باند شده و انها را انتقال می‌دهد که عمدتا عبارتند از: اسیدهای چرب آزاد (Free Fatty Acids) ، فسفولیپیدها(PL) ، یونهای فلزی، اسیدهای آمینه ، هورمونها ، بیلی‌روبین و. . . .

اهمیت بالینی

افزایش میزان آلبومین تنها در حالتهایی مانند دهیدراسیون حاد(Acute dehydration) و بستن طولانی مدت تورنیکه(گارو) و . . . مشاهده میگردد و دارای ارزش بالینی زیادی نمی باشد، اما کاهش آن عمدتا حائز اهمیت بوده و در شرایط زیر دیده می شود:

آنالبومینمی(Analbuminemia): افرادی که این نقص ژنتیکی نادر را دارا هستند ، سطح پلاسمایی آلبومین انها کمتراز0/5 gr/l می باشد اما اگر ادمی هم در این افراد وجود داشته باشد خفیف میباشد.

التهاب(Inflammation): التهاب حاد و مزمن از رایجترین علل هیپوآلبومینمی میباشد که این امر منتج از افزایش مصرف آن توسط سلولها ، کاهش سنتز آن و ورود آن به درون فضای خارج عروقی می‌باشد .

بیماری کبدی(Hepatic disease) : کاهش آلبومین در اکثر موارد بیماری سلول کبدی، ناشی از افزایش سطح ایمونوگلبولینها ، خروج آن از عروق به فضای خارج عروقی ، مهار مستقیم سنتز آلبومین به وسیله توکسینها و الکل می‌باشد.

دفع ادراری(Urinary loss): گلومرول کلیوی به عنوان یک غربال ملکولی عمل می‌کند و مواد را با توجه به شعاع (اندازه) ملکولی آنها عبور میدهد که اندازه آنها ارتباط معکوس با میزان دفع آنها دارد. با توجه به کوچک بودن نسبی آلبومین، مقادیر قابل توجهی از آن به درون توبولها فیلتره می‌گردد. به ازای هرگرم کراتینین 20mg آلبومین در ادرار طبیعی وجود دارد. دفع بیشتر از این مقدار نشان‌دهنده افزایش میزان فیلتراسیون و وجود آسیب توبولی می‌باشد. هر چند افزایش میزان فیلتراسیون در ***تمرینات ورزشی*** و در***تب*** نیز ممکن است صورت گیرد بنابراین آلبومین ادراری باید تحت شرایط کنترل شده و به صورت تکراری سنجش گردد و مشخص گردد که آیا این افزایش به علل بالینی می‌باشد یا خیر. **به استثنای حالت آنالبومینمی ارثی، پایین ترین سطح البومین پلاسمایی در افراد مبتلا به سندرم نفروتیک دیده میشود.**

اتلاف از طریق دستگاه گوارش (Gastrointestinal loss): بیماری التهابی دستگاه گوارش و انتروپاتی‌های از دست-دهنده پروتئین ، با اتلاف آلبومین همراه می باشد.

سؤ تغذیه ی پروتئین(Malnutrition) : توجه به میزان آلبومین سرم می‌تواند در تعیین و ارزیابی وضعیت تغذیه‌ای پروتئینی مفید باشد هرچند در اغلب موارد به ویژه در کشور های توسعه یافته کاهش میزان البومین به APR (واکنش فاز حاد) نسبت داده می‌شود.

α_1- اسید گلیکوپروتئین (AAG) :

به نام **اوروسموکوئید** نیز معروف بوده و در کبد سنتز می شود. بخش عمده(45%) ساختار آن را کربو هیدرات(اسید سیالیک12%) تشکیل میدهد. درAPR افزایش و در سندرم نفروتیک کاهش می یابد (به دلیل وزن ملکولی پایین) .

α_1- آنتی تریپسین (AAT) :

از دسته Serpinها یا مهارکننده‌های پروتئیناز دارای Ser در جایگاه فعالشان می‌باشد. در کبد سنتز می گردند و مهمترین مهارکننده الاستاز (آنزیم تجزیه کننده الاستین که به عروق و برنش در شش خاصیت ارتجاعی می بخشد) لکوسیتی می‌باشد. ***فقدان یا کاهش آن باعث از بین رفتن خاصیت ارتجاعی برنشها و ایجاد آمفیزم می گردد.*** جرم ملکولی آن 52 KDa است. پس در ناهنجاریهای از دست دهنده پروتئین مقدار آن کاهش می یابد. در APR افزایش ان دیده می‌شود.

α_1- فیتوپروتئین (AFP) :

آنالوگی از آلبومین بوده و تقریبا 4% کربوهیدرات دارد و ***در دوران زندگی جنینی به عنوان پروتئین سرمی غالب*** محسوب میگردد. افزایش آن در مرگ جنینی، خونریزی‌های جنینی- مادری و کارسینومای سلول کبدی دیده می‌شود. *کاهش آن در زنان حامله‌ای که دارای جنین مبتلا به سندرم داون (تری‌زومی21) و یا تری‌زومی18 هستند دیده می شود .*

α_2- ماکروگلبولین (AMG) :

مهارکننده پروتئیناز پلاسمایی محسوب شده و در کبد سنتز می گردد. ***وزن آن 725 KDa بوده و به همین علت در سندرم نفروتیک دفع آن صورت نمیگیرد*** و از طرف دیگر سنتز آن به همراه بسیاری از پروتئینهای دیگر برای جبران پروتئین از دست رفته صورت میگیرد .

سرولو پلاسمین (Cp) :

یک گلبولین حاوی 95% مس تام پلاسما میباشد. در APR افزایش می‌یابد. ***دربیماری ویلسون و منکه کاهش آن دیده میشود،*** نیز دراثر از دست رفتن خون و یا در سندرمهای اتلاف کننده پروتئین از کلیه و دستگاه گوارش مقدار آن کاهش میابد. این پروتئین ***دارای خاصیت فرواکسیدازی*** می باشد .

β_2- میکروگلبولین (BMG) :

بدون کربوهیدرات بوده و به عنوان بخشی از آنتی‌ژنهای لکوسیت انسانی(HLAs) محسوب میگردد. به دلیل اندازه کوچک (11/8 KDa) از غشای گلومرولی عبور می‌نماید اما به طور طبیعی تقریبا به طور کامل(99%) بازجذب و کاتابولیزه میگردد (در توبول پروگزیمال کلیه). ***ارزش بالینی آن در تست کردن عملکرد توبول کلیوی به ویژه در افراد پذیرنده کلیه برای بررسی رد پیوند آلوگرافت (که به صورت کاهش عملکرد توبولی ظاهرمیگردد) میباشد .***

هاپتوگلوبین (Hp) :

یک α_2-گلبولین میباشد و درکبد سنتز میشود. این گلبولین سریعا به هموگلوبینهای آزادشده از اریتروسیتها و RBCهایی که لیز شده-اند متصل می‌گردد و باعث جلوگیری از دفع Fe , Hb می‌گردد و کمپکس تشکیل شده(Hp-Hb) توسط سلولهای کوپفر کبدی برداشته میشوند. ***کاهش Hp اندیکاتور مهم و حساس برای همولیز محسوب میگردد.*** (به طور طبیعی ، تقریبا1% RBC از گردش خون

برداشته میشوند یا به طور روزانه در داخل عروق خونی تخریب میگردند. افزایش تخریبRBC ها تنها تا 2% در روز ، پلاسما را به طور کامل و در غیاب یک تحریک مانند التهاب و . . . تخلیه خواهد کرد) .

ترانس تایرتین(TTR) :

که نام سابق آن **پره‌آلبومین** میباشد. پروتئین ناقل T_4 , T_3 میباشد. افزایش آن در بعضی از تومورها مانند لنفوم هوچکین (Hodgkin Lymphoma) و کاهش آن در بیماری کبدی و سوء تغذیه پروتئینی دیده میشود. اغلب *از کاهش آن برای شناسایی وضعیت تغذیه پروتئینی استفاده میگردد.*

پروتئین باند شونده به رتینول(RBP) :

این پروتئین در انتقال رتینول (ویتامین A) نقش دارد. کمپلکس آن با TTR باعث جلوگیری از فیلتره شدن آن و همچنین پایدار شدن تعامل بین رتینول و RBP می‌گردد و بعد از جدا شدن از TTR بوسیله کلیه‌ها از گردش خون حذف می‌گردد. RBP در آسیب توبول پروگزیمال کلیوی افزایش و در APR و بیماریهای کبدی و سوء تغذیه کاهش می‌یابد.

پروتئین واکنشگر C (C-Reactive Protein) :

پروتئین متصل شونده به پلی‌ساکارید می باشد. ابتدا در سال 1930 مشخص گردید که این پروتئین به پلی ساکارید C در دیواره سلولی باکتری *استرپتوکوکوس پنومونیه (Streptococcus Pneumoniae)* متصل می‌گردد. سنتز آن در کبد صورت می‌گیرد و قادر به اتصال به ترکیباتی مانند: فسفریل‌کولین ، فسفاتیدیل‌کولین و پلی‌آنیونهایی(مانند DNA و . . .) علاوه بر پلی‌ساکارید موجود در دیواره باکتریها ، قارچها و پارازیتهای پروتوزوآیی می‌باشد. *CRP باعث فعال نمودن مسیر کلاسیک کمپلمان و مشابه با آنتی‌بادیها باعث اپسونیزاسیون، فاگوسیتوز و لیز ارگانیسمهای مهاجم می‌گردد.* CRP به عنوان یکی از حساس‌ترین APP ها شناخته شده است و *سطح آن در پلاسما در شرایطی مانند :آنفارکتوس میوکارد (MI) ، استرس، تروما، عفونت، التهاب، جراحی، تکثیر نئوپلاستیک و . . .افزایش می یابد.*

PROTEIN ANALYSIS

روشهای متنوعی برای مطالعه و تعیین مقدار پروتئینها ابداع شده‌اند که این روشها را میتوان در چهار گروه تقسیم‌بندی نمود :

- اندازه‌گیری مستقیم فیزیکی و شیمیایی (مانند متدهای: فتومتری مستقیم، بیوره، Dye-binding و . . .)
- اندازه گیری پروتئینها بعد از جدا کردن. مانند :

  - جداسازی به روش الکتروفورز و سپس تعیین غلظت توسط دانسیتومتر.
  - جداسازی آلبومین از گلبولینها ، سپس تعیین غلظت آلبومین به روشهای شیمیایی مختلف.
- اندازه گیری فعالیت بیولوژیکی پروتئینها. (اندازه گیری فعالیت آنزیمها).
- روشهای ایمونولوژیکی:

  a- روش ایمونوالکتروفورز (Immunoelectrophoresis)

  b- روش ایمونودیفیوژن (Immunodiffusion)

  c- روش آنزیم ایمونو اسی (Enzyme Immunoassay)

  d- روش رادیو ایمونو اسی (Radio Immunoassay)

الف- روش فتو متری مستقیم (Direct photometry) :

از طول موجهای نورUV (Ultra Violet) میتوان برای سنجش میزان پروتئینها دریک نمونه میتوان استفاده نمود. معمولا از طول موجهای 270-290 nm و 200-225 nm استفاده می‌گردد. جذب در 280 nm و در pH=8 عمدتا به حلقه‌های آروماتیک مربوط به آمینو اسیدهای Tyr, Trp بستگی دارد. که در این حالت آمینو اسیدهای آزاد موجود در نمونه و نیز ترکیباتی مانند اسیداوریک و بیلی‌روبین به علت اینکه در چنین طول موجی دارای جذب هستند می‌توانند باعث تداخل گردند. جذب در 200-225 nm عمدتا به وسیله باندهای پپتیدی صورت میگیرد به طوری که مقدار جذب باندهای پپتیدی در این محدوده طول موج، 30-10 برابر مقدار آن در 280 nm میباشد و تقریبا 70% میزان جذب در 205 nm مربوط به باندهای پپتیدی می‌باشد، نتیجه اینکه در چنین طول موجی تداخل حاصل از Tyr , Trp ناچیز می باشد. از جمله ترکیبات مهم دیگری که در محدوده طول موج UV دارای جذب می‌باشند اسیدهای نوکلئیک (N.A) میباشد. برای تعیین غلظت پروتئین تام در طول موجهای UV و نیز حذف تداخل مربوط به اسیدهای‌نوکلئیک از رابطه زیر میتوان استفاده نمود :

$$C_{protein\ (mg/ml)} = 1.55\ A_{280} - 0.76A_{260}$$

ب- روش کجدال (Kjeldahl) :

روش کجلدال به عنوان یک **روش مرجع** در اندازه‌گیری پروتئین مطرح می‌باشد. از این متد جهت آنالیز محتوای نیتروژن (N) موجود در پروتئینها استفاده میگردد. ابتدا پروتئینها تحت تاثیر اسیدیته محیط هضم می‌گردند و نیتروژن موجود در آنها به صورت یون آمونیوم (NH_4^+) آزاد می‌گردد. سپس غلظت یون آمونیوم آزاد شده به وسیله روش‌هایی مانند **تیتراسیون** و **نسلریزاسیون** تعیین می-گردد. میزان آمونیاک به دست آمده در 25/ 6 ضرب می‌گردد و بدین‌ترتیب مقدار عددی بدست آمده میزان پروتئین موجود در نمونه را نشان خواهد داد. از این متد به علت زمان بر بودن استفاده زیادی نمی‌گردد.

$NH_3 + KHgI$ (معرف نسلر) ⟶ ترکیب قهوه ای رنگ

ج- روش فولین- سیوکالتو Folin-Ciocalteu (یا لوری):

در این روش از معرف فولین- سیوکالتو (فسفوتنگستیک ـ فسفومولیبدیک اسید) استفاده میگردد که ترکیبات پروتئینی به علت داشتن ترکیبات آمینو اسیدی حاوی حلقه‌های آروماتیک (Trp, Tyr) باعث احیای این معرف و تولید رنگ آبی میگردد.

د- روش بیوره (Biuret) :

در این روش از معرف بیوره(یون Cu^{++} در یک محلول قلیایی حاوی تارتارات سدیم پتاسیم) استفاده می‌گردد. تارتارات سدیم پتاسیم با یونهای Cu^{++} ایجاد کمپلکس نموده و از رسوب آن جلوگیری مینماید. ترکیباتی که حداقل دارای دو اتصال یا پیوند پپتیدی باشند(حداقل تری‌پپتید باشند) با یون مس در چنین محیطی کمپلکس بنفش‌رنگ مینماید. شدت رنگ ایجاد شده با تعدادی پیوندهای پپتیدی نسبت مستقیم دارد. نام این آزمایش از نام ترکیب بیوره که با یون Cu^{++} کمپلکس میدهد گرفته شده است. رنگ حاصل به دلیل تولید پیوند کئوردینانس بین Cu^{++} و چهار نیتروژن (2 نیتروژن از هر پلی پپتید) بوجود می‌آید. رنگ تولید شده بوسیله تارتارات (یا سیترات) پایدار می‌گردد. از سرم یا پلاسما می‌توان استفاده نمود، هرچند میزان پروتئین اندازه‌گیری شده در پلاسما نسبت به سرم مقداری بیشتر می‌باشد (به علت وجود فیبرینوژن در پلاسما) که این مقدار تقریبا 0/4 gr/dl – 0/2 بیشتر از سرم است. پروتئین تام در دمای اتاق به مدت 1 هفته ، در دمای یخچال ($4^{\circ}C$) به مدت 1 ماه و در دمای $-20^{\circ}C$ به مدت 2 ماه در سرم یا پلاسما پایدار است. از سرم لیپمیک و همولیز نباید استفاده قرار گیرد.

DYE-BINDING METHODS

در متدهای Dye-binding از توانایی پروتئینها در اتصال به رنگهایی مانند کوماسی‌بریلیانت‌بلو (CBB) و برم‌کرزول‌گرین (BCG) استفاده میگردد. یکی از محدودیتهای این روشها، تمایل نامساوی پروتئینها برای باندشدن به این رنگها می‌باشد بنابراین از این روشها در سنجش پروتئینهای توتال (به ویژه در سرم) استفاده زیادی نمیگردد. هر چند در بعضی موارد از اختلاف زیاد رنگ پذیری پروتئینهای مختلف و همچنین میزان غلظت آنها می توان در جهت سنجش پروتئین تام بهره جست.

م- روش برادفورد Bradford (CBB) :

از آنجایی که بخش عمده‌ای از **پروتئینهای مایع مغزی- نخاعی Crebrospinal Fluid (CSF)** را آلبومین تشکیل می‌دهد و همچنین پروتئین عمده موجود در ادرار عموما آلبومین می‌باشد می‌توان از کوماسی بریلیانت بلو جهت سنجش پروتئین توتال استفاده نمود. در این روش در مقایسه با روش توربیدیمتری(که در آن میزان انکسار نور حاصل از کدورت یا توربیدیتی پروتئین موجود نمونه مورد سنجش قرار می گیرد) به نمونه کمی(25 µl) نیاز می باشد.

ن- روش برم کرزول گرین (BCG):

از این روش **جهت سنجش آلبومین** استفاده می گردد. زیرا رنگ برم کرزول گرین (BCG) تمایل زیادی برای باند شدن با آلبومین دارد. استفاده از سرم توصیه می‌گردد زیرا در حضور فیبرینوژن و هپارین، مقدار آلبومین بیش از مقدار واقعی برآورد می‌گردد. همچنین اگر الگوی پروتئین سرم غیرطبیعی باشد باز احتمال اشتباه بیشتر می‌گردد. هر چند لیگاندهایی مانند داروها ، متابولیتها و . . . به آلبومین باند می‌گردند ولی تداخلی در این واکنش ایجاد نمی‌نماید مگر اینکه غلظت آنها خیلی زیاد باشد.

از روش دیگری نیز می‌توان جهت سنجش آلبومین استفاده نمود. در تعیین افتراقی آلبومین وگلبولینها جهت به دست آوردن رسوب آنها استفاده می‌گردد. به علت اینکه پروتئینها دارای وزن ملکولی بالاتری نسبت به آلبومین هستند، با افزودن **سولفیت سدیم28%** ، رسوب مینمایند و محلول رویی (Supernatant) حاوی آلبومین میباشد که با استفاده از روش بیوره مورد سنجش قرار میگیرد و شدت رنگ بنفش ایجاد شده مورد اندازه‌گیری قرار میگیرد. سپس می‌توان مقدار گلبولینها را نیز محاسبه نمود:

غلظت آلبومین ــ غلظت پروتئین تام = غلظت گلبولین ها

ترکیبات نیتروژن‌دار غیر پروتئینی
(Non-Protein Nitrogenous Compounds)

کاتابولیسم پروتئینها و اسیدهای نوکلئیک منجر به تشکیل ترکیباتی تحت عنوان ترکیبات نیتروژن‌دار غیرپروتئینی(NPN) می‌گردد. بیش از 15 نوع ترکیب ازت‌دار(نیتروژن‌دار) غیرپروتئینی(NPN) در پلاسما وجود دارد که مهمترین آنها (به ترتیب کاهش غلظت پلاسمایی) عبارتند از: *اوره، اسیدهای‌آمینه، اسید اوریک، کراتینین، کراتین و آمونیاک*.

Protein	Amino acids	Ammonia	Urea

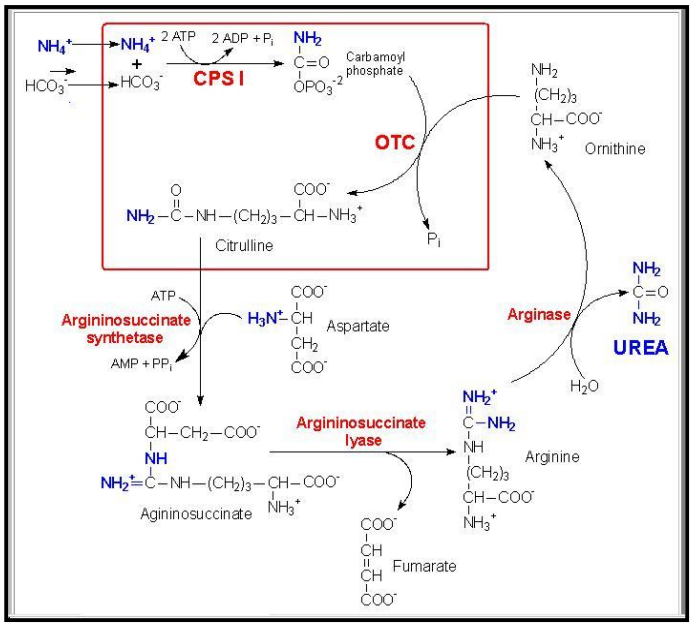
جدول زیر ترکیبات نیتروژن‌دار-غیرپروتئینی اصلی، منشاء آنها و موقعیتهایی که در آن سنجش این مواد کاربرد بالینی قابل توجهی دارد را بصورت خلاصه نشان می‌دهد. مجموع غلظت ترکیبات نیتروژن-دارغیرپروتئینی 250-400 mg/dl می‌باشد. قابل توجه اینکه میزان NPN موجود در خون حدود 75 درصد بیش از NPN پلاسماست که علت عمده آن وجود مقادیر زیاد گلوتاتیون در اریتروسیتهاست. قسمت عمده NPN پلاسما را اوره (Urea) تشکیل می‌دهد که حدود 45 درصد آن را شامل می‌شود. اندازه‌گیری میزان NPN قبلا به عنوان شاخصی جهت سنجش کارکرد کلیه بکار می‌رفت که اکنون یک شاخص نسبتا غیر اختصاصی جهت تشخیص بیماریهای کلیه محسوب می‌گردد، زیرا سایر بیماریها نیز می‌توانند سبب تغییرات مهمی در غلظت پلاسمایی مواد مختلف شوند (به عنوان مثال وجود بیماری نقرس ، بیماریهای کبدی و ... سبب تغییر غلظت NPN می‌گردند). به همین دلیل در آزمایشگاهها اندازه‌گیری NPN انجام نمی‌گیرد بلکه به جای آن از سنجش مقادیر اوره(یا نیتروژن اوره خون یا BUN[1]) و کراتینین سرم که شاخصهای حساستر و اختصاصی‌تری می‌باشد برای نشان دادن چگونگی کارکرد کلیه استفاده می‌گردد.

Metabolite	Biochemical origin	Clinical utility of measurement	Percent of urine NPN
Amino acids	**Proteins:** **endogenous** **exogenous**	**Liver** disease: inborn errors of metabolism **Tubular** disorders	**< 1**
Ammonia	**Amino acids**	**Liver** disease: **renal** disease, congenital & aquired inborn errors of metabolism	**10 - 20**
Urea	**Ammonia**	**Liver** disease: **renal** disease	**55 - 90**
Creatinine	**Creatine**	**Renal** function	**2 - 3**
Uric acid	**Purine nucleotides**	**Marker** for cell turnover, disorders of **purine** synthesis	**1 – 1.5**

[1] BUN = Blood Urea Nitrogen

اوره و نیتروژن اوره خون (Blood Urea Nitrogen) BUN

اوره محصول عمده کاتابولیسم پروتئینها و پورینها بوده که در چرخه اوره(Urea cycle) در کبد و طی واکنشهایی که در دو بخش میتوکندریایی و سیتوزولی صورت می‌گیرد(شکل زیر)سنتز می‌گردد و سپس آزادانه بدرون مایعات خارج و داخل سلولی انتشار می‌یابد (اوره دارای نفوذپذیری بالایی میباشد). اوره عمدتا از طریق کلیه‌ها دفع می‌گردد و مقدار کمی نیز از طریق تعریق ترشح شده و یا توسط باکتریهای روده‌ای تجزیه می‌گردد. این ترکیب **تقریبا نصف مواد جامد ادرار** را تشکیل می‌دهد و **همچنین 90-80 درصد نیتروژن ادراری** را تشکیل می‌دهد. غلظت آن منعکس کننده تعادل بین کاتابولیسم اسیدهای آمینه و دفع آن توسط کلیه می‌باشد. مقدار طبیعی اوره در سرم 15-45 mg/dl می‌باشد. فیلتراسیون آن در گلومرولهای کلیوی به راحتی صورت می‌گیرد. بسته به وضعیت هیدراتاسیون بدن 80-40



درصد آن از لوله‌های پروگزیمال(Proximal tubule) به صورت **غیرفعال(passive)** بازجذب می گردد. مقدار اوره در مردان کمی بیش از مقدار آن در زنان بوده و با گذشت سن به تدریج افزایش می‌یابد. مقدار آن با یک وعده غذایی پرپروتئین و هورمونهای کاتابولیک(مانند: هورمونهای تیروئیدی و گلوکوکورتیکوئیدی) افزایش محسوسی می‌یابد و تحت تاثیر هورمونهای آنابولیک(مانند آندروژنها و هورمون رشد) کاهش می‌یابد.

ازتمی (Azotemia) و سندرم اورمیک:

افزایش ترکیبات ازته غیر پروتئینی (به ویژه اوره و کراتینین) ، **ازتمی** نامیده می‌شود. موارد طولانی مدت و شدید ازتمی که با نیتروژن اوره خون (BUN) فراتر از 100 mg/dl و تظاهرات بالینی نارسایی کلیه مشخص می گردد را **سندرم اورمیک** می‌نامند. ازتمی ممکن است علل پیش کلیوی(Pre-renal) ، کلیوی(Renal) و پس کلیوی(Post-renal) داشته باشد. از *علل پیش کلیوی* می‌توان به افزایش تولید اوره و یا کاهش جریان خون کلیوی اشاره نمود. افزایش تولید اوره به عللی مانند: رژیم پرپروتئین ، افزایش کاتابولیسم پروتئینها ، تحلیل ماهیچه‌ای و بازجذب پروتئینهای خون به دنبال خونریزی گوارشی می‌تواند صورت گیرد که عوامل مذکور ممکن است به تنهایی باعث افزایش کمی در میزان سرمی اوره گردد. وجود عوامل و اختلالات دیگری مانند آسیب به پارانشیم کلیه ، انسداد مجاری ادراری و کاهش جریان خون کلیوی (از جمله به علل شوک و کاهش برونده قلبی Cardiac output) می‌تواند موجب افزایش بسیار بیشتر اوره سرم گردد. اختلال در جریان خون کلیه منجر به کاهش سرعت فیلتراسیون گلومرولی یا GFR (Glumerolar Filtration Rate) می گردد که علل این اختلال در جریان خون کلیه می‌توان موارد زیر باشد:

1) کاهش نمک و آب بدن (Dehydration) که می‌تواند به علت استفراغ ، اسهال ، شوک ، دیورز شدید و تعریق مفرط باشد.
2) خونریزی شدید از دستگاه گوارش (که طی آن حجم خون کاهش و بازجذب آمینو اسیدها افزایش می‌یابد).
3) کاهش برونده قلبی و نارسایی احتقانی قلبی (Congestive heart failure) و انفارکتوس میوکارد (MI) .
4) افزایش کاتابولیسم پروتئینها (در طی دوره تب ، استرس و سوختگی).

باتوجه به تمامی موارد مذکور ، مشخص میگردد که ارتبط خطی بین غلظت اوره (و یا BUN) با GFR وجود ندارد که نشاندهنده این موضوع می‌باشد که اوره (BUN) شاخص دقیقی در بررسی عملکرد کلیه نمی‌باشد و ممکن است عوامل پیش‌کلیوی برروی غلظت آن تاثیر بگذارند. بنابراین ارزیابی اوره (BUN) وقتی ارزشمند است که به همراه ارزیابی میزان کراتینین(Creatinine) صورت گیرد. در این صورت می‌توان فعالیت یا عملکرد کلیه را بهتر مورد آنالیز قرار داد که افتراق ازتمی پیش‌کلیوی و پس‌کلیوی را از یکدیگر میسر می‌سازد. اگر میزان اوره سرم افزایش یابد و تغییری در غلظت کراتینین ایجاد نشده باشد نشانگر ازتمی پیش‌کلیوی می‌باشد. در صورتی که میزان اوره و کراتینین سرم توام با هم افزایش یابد نوع ازتمی موجود ، از نوع کلیوی و پس‌کلیوی خواهد بود. *ازتمی کلیوی* بیشتر به علت اختلال در عملکرد کلیه (در نارسایی حاد و مزمن کلیه Acute and Chronic Renal Failure) می‌باشد که باعث کاهش GFR و در نتیجه باعث احتباس ترکیبات ازته غیر پروتئینی یا NPN (Non Protein Nitrogen) می گردد. *ازتمی پس‌کلیوی* به علت انسداد در مجاری

ادراری و بازجذب اوره به جریان خون و ارتشاح به نسوج نرم اطراف ایجاد می‌گردد. **(نکته:** اوره از جمله ترکیبات دارای ضریب نفوذپذیری بالا می باشد به همین دلیل به راحتی از غشای سلولی عبور می‌نماید).

از جمله علائم آزمایشگاهی مهم سندرم اورمیک می‌توان به این موارد اشاره نمود: اسیدوز متابولیک ، عدم تعادل آب و الکترولیت (مانند افزایش فسفات خون ، کاهش کلسیم خون ، افزایش پتاسیم خون) ، افزایش فشار خون ، کم خونی ، غلظتهای افزایش یافته ترکیبات ازته غیر پروتئینی(NPN) . که افزایش غلظت ترکیبات ازته غیر پروتئینی(NPN) در سندرم اورمیک با علائمی مانند : ضعف پیشرونده ، بی‌اشتهایی ، تهوع و استفراغ ، تحلیل ماهیچه‌ای ، رعشه و اختلالات عصبی و روانی و نیز تنفس تند و سطحی همراه می‌باشد که اگر میزان BUN به بیش از 200 mg/dl برسد ایجاد حالت اغما نموده و در نهایت منجر به مرگ خواهد شد.

علل عمده کاهش اوره خون (BUN) :

1) کاهش سنتز اوره ; که می‌تواند به علت نارسایی و یا آسیب پارانشیم کبد ، هپاتیت و عوامل دارویی باشد.
2) افزایش سنتز مواد پروتئینی ; که بیشتر در اواخر دوران بارداری ، در آکرومگالی ، در اثر هورمونهای آنابولیک و در نوزادان (به طور طبیعی) وجود دارد.
3) رژیم غذایی کم پروتئین و غنی از کربوهیدرات (نیز در سوءتغذیه و سوءجذب).
4) سندرم نفروتیک ، نکروز حاد توبولی ، ترشح نابجای هورمون ADH ، تجویز سرم و مایعات.

از جمله **هورمونهاي آنابوليك** ، آندروژنها (تستوسترون و...) و هورمون رشد(GH) را مي‌توان نام برد كه داراي اثر سنتزي بوده و باعث كاهش BUN مي‌گردند در حالي كه گلوكوكورتيكوئيدها و هورمونهاي تيروئيدي بيشتر داراي اثرات آنتي آنابوليكي يا **كاتابوليكي** (تجزيه‌اي) هستند و باعث افزايش BUN مي‌گردند.

روشهای اندازه‌گیری مقدار اوره خون:

دو متد کلی برای اندازه‌گیری مقدار اوره خون وجود دارد:

1. استفاده از معرفهای آنزیمی (روش غیر مستقیم Indirected method)
   - الف- روش نسلر (Nessler)
   - ب- روش برتلوت (Berthelot)
   - ج- روش گلوتامات دهیدروژناز (GLDH)
2. استفاده از معرف شیمیایی (روش مستقیم Direct method)
   - روش دی استیل منواکسیم (DAM)

****

الف- روش نسلر (Nessler)

اوره بر طبق واکنش زیر و تحت تاثیر آنزیم اوره‌آز (Urease) به آمونیاک (NH_3) و CO_2 تبدیل می‌گردد. آمونیاک حاصل با معرف نسلر که یدیدپتاسیم جیوه (Potassium mercuric iodide) می‌باشد وارد واکنش شده و ایجاد ترکیب قهوه‌ای رنگی می‌نماید که در 450 nm دارای ماکزیمم جذب می‌باشد.

$$Urea + H_2O \xrightarrow{\text{اوره آز}} 2NH_3 + CO_2$$

$$NH_3 + Hg, KI \longrightarrow \text{ترکیب قهوه ای رنگ}$$

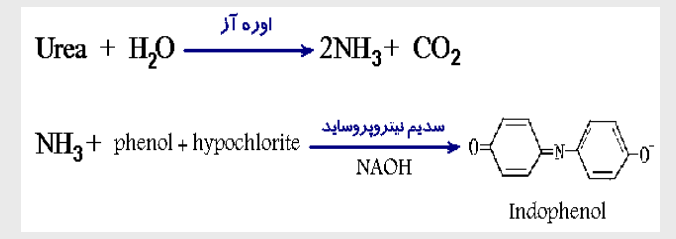
(یدید پتاسیم جیوه)
معرف نسلر

نکته1: اپتیمم فعالیت آنزیم اوره‌آز در دمای 55 درجه سانتیگراد و pH = 7-8 می‌باشد.

نکته2: آنزیم اوره‌آز توسط یونهای فلوئورید (F^-)، سیترات و آمونیوم(در غلظت بالا) مهار می‌گردد. بنابراین از ترکیبات نگهدارنده و ضد انعقاد حاوی یونهای فلوئورید (F^-)، سیترات نمی‌توان استفاده نمود. از معایب این روش می‌توان به اثر کدورت (Turbidity) نمونه و نیز ناپایداری رنگ ایجاد شده اشاره نمود.

ب- روش برتلوت (Berthelot)

همانند روش قبل اوره بر طبق واکنش زیر و تحت تاثیر آنزیم اوره‌آز (Urease) به آمونیاک (NH_3) و CO_2 تبدیل می‌گردد. سپس آمونیاک حاصل با هیپوکلریت‌سدیم (NaOCl) و فنل در یک محیط قلیایی ترکیب شده و ایجاد اندوفنل (Indophenol) آبی رنگ خواهد کرد. در این واکنش نیتروپروسایدسدیم $[Na_2Fe(CN)_5NO]$ به عنوان کاتالیزور عمل خواهد نمود. میزان رنگ ایجاد شده به مقدار اوره بستگی دارد. این روش نسبت به روش نسلر دارای حساسیت بیشتری می‌باشد. با استفاده از این روش می‌توان نیتروژن اوره پلاسما ، سرم ، ادرار و سایر مایعات بیولوژیکی را اندازه‌گیری نمود.



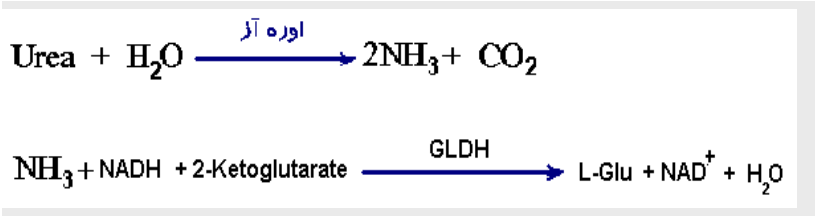
نکته1: پروتئین خون باید رسوب داده شود زیرا رنگ هموگلوبین(Hb) بر رنگ تولید شده در واکنش تاثیر می‌گذارد.

نکته2: در صورت استفاده از خون یا پلاسما نباید از ماده ضد انعقادی که دارای نیتروژن است (مانند: EDTA) استفاده نمود. همانند روش نسلر ، چون در این روش نیز از آنزیم اوره‌آز استفاده می‌گردد نباید از فلوئورید سدیم(NaF) به عنوان ماده نگهدارنده استفاده نمود.

نکته3: به علت اینکه ممکن است اوره موجود در نمونه در اثر رشد باکتریها از بین برود باید خون را بلافاصله مورد آزمایش قرار داد، در غیر این صورت بایستی نمونه در یخچال نگهداری شود که در این حالت برای مدت چند روز پایدار خواهد بود. برای محافظت نمونه می‌توان از تیمول استفاده نمود.

ج- روش گلوتامات دهیدروژناز (GLDH)

در اینجا نیز مرحله اول واکنش مشابه روشهای آنزیمی قبلی است. ولی در مرحله دوم واکنش α-کتوگلوتارات به عنوان یکی از معرفها به همراه معرف آنزیمی گلوتامات دهیدروژناز (GLDH) به محیط واکنش افزوده شده و تحت تاثیر آنزیم مذکور با آمونیاک حاصل از مرحله اول واکنش ترکیب شده و ایجاد گلوتامات خواهد نمود.

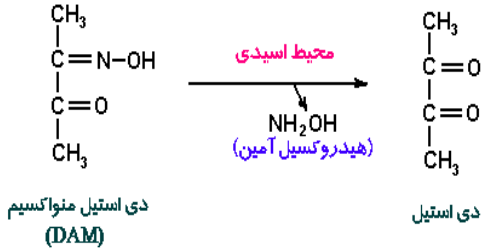


آنزیم گلوتامات دهیدروژناز (GLDH) نیازمند کوآنزیم NADH برای عمل خود می‌باشد. بنابراین از تغییر جذب مربوط به تبدیل NADH به NAD^+ در طول موج 340 nm می‌توان به عنوان معیاری برای سنجش اوره استفاده نمود.

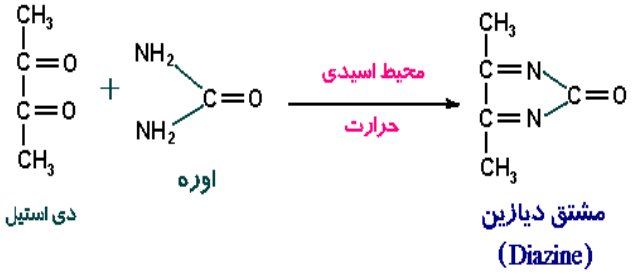
(توجه: هر ملکول از اوره دو ملکول NAD^+ می‌نماید به علت اینکه هر ملکول اوره دو ملکول NH_3 ایجاد می‌نماید) .

روش دی استیل منواکسیم (DAM)

در این روش آمونیاک تولید نمیشود ، بلکه اوره با **دی‌استیل‌منو اکسیم (DAM)** واکنش می‌دهد. در واقع اوره با دی استیل واکنش می‌دهد. از آنجاییکه دی استیل ناپایدارتر می‌باشد از DAM استفاده می‌گردد که در هنگام انجام آزمایش ، DAM تحت شرایط اسیدی محیط تبدیل به دی استیل می‌گردد و این ترکیب با اوره وارد واکنش می‌گردد و ایجاد



مشتق دیازین(Diazine) می‌نماید که یک ترکیب رنگی می‌باشد (زرد رنگ) که ماگزیمم جذب آن در 540 nm می‌باشد.



نکته1: تیوسمی کاربازید(Thiosemicarbazide) و **یون Fe^{3+}** که به محیط واکنشی افزوده می گردد ، باعث *پایداری رنگ* و نیز *افزایش شدت رنگ* می گردد و همچنین باعث *کاهش حساسیت آن نسبت به نور* می گردد.

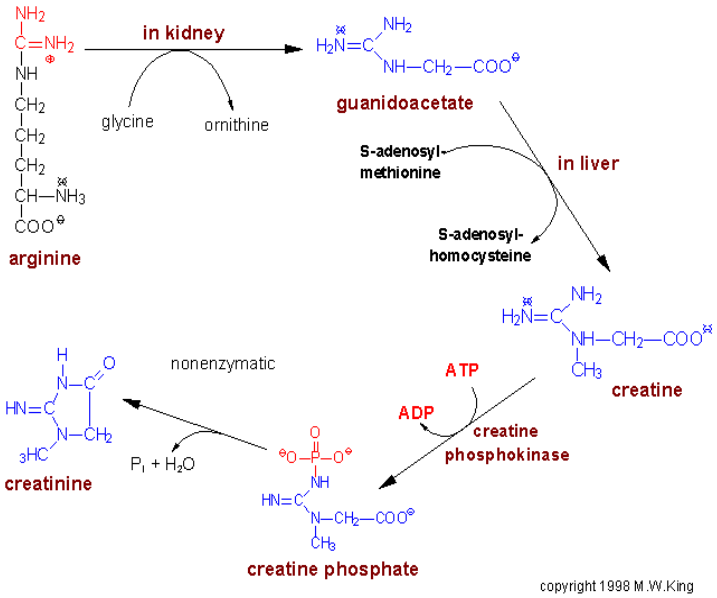
نکته2: تداخل ناشی از هیدروکسیل آمین (NH_2OH) با استفاده از مواد اکسیدان(مانند سولفات پتاسیم) برطرف می گردد.

نکته3: در غلظتهای بالای اوره حساسیت روش کاهش می‌یابد.

از این روش می‌توان هم برای ارزیابی میزان اوره در پلاسما و هم در ادرار استفاده نمود.

اندازه‌گیری کراتینین(Creatinine)

کراتین ترکیبی است که محصول واکنشهای آنزیماتیک متوالی بر روی اسیدهای آرژینین و گلایسین می‌باشد که در طی دو مرحله و به ترتیب در کلیه و کبد (و پانکراس) سنتز می گردد و از طریق جریان خون به بسیاری از سلولها (به ویژه عضله) وارد می گردند و در آنجا تحت تأثیر آنزیم کراتین کیناز (CK) تبدیل به کراتین فسفات می گردد. مقدار کراتین متناسب با وزن عضله (توده عضلانی) بدن می‌باشد. روزانه 2-1 درصد کراتین در اثر دهیدراسیون غیرآنزیمی در عضله تبدیل به کراتینین(Creatinine) می گردد و تولید آن در هر فرد با سرعت ثابت صورت گرفته و میزان آن بستگی به توده عضلانی دارد. این ترکیب محلول در آب بوده و به آسانی از کلیه‌ها دفع می‌شود و برخلاف اوره ، باز جذب نمی‌شود و نیز تحت تأثیر رژیم غذایی طبیعی قرار نمی گیرد (به طور محسوس) و در غیاب بیماری کلیوی میزان دفع آن ثابت می‌باشد .



اندازه‌گیری آن ، جهت اطمینان از صحیح بودن جمع‌آوری ادرار 24 ساعته کمک‌کننده می‌باشد. یعنی اگر ادرار 24 ساعته کامل باشد میزان کراتینین آن در حد طبیعی gr/24h 2-1 می‌باشد.(به عنوان شاخص جمع‌آوری ادرار 24 ساعته). میزان طبیعی کراتینین سرم mg/dl 0/6-1/3 می‌باشد. مقداری کراتینین در شرایط طبیعی از طریق توبولهای کلیوی ترشح می‌گردد که مقدار آن می‌تواند تحت تأثیر عواملی تغییر نماید.

افزایش غلظت کراتینین پلاسما باعث افزایش ترشح و داروهایی مانند پروبنسید، تری‌متوپریم و سایمتیدین باعث کاهش ترشح کراتینین می‌گردند و همچنین کاهش GFR (به دلایل مختلف) منجر به افزایش سهم ترشح کراتینین می‌گردد، بنابراین تغییر غلظت آن ممکن است بازتاب مناسبی از تغییر GFR نباشد بطوریکه ممکن است حتی میزان GFR به نصف مقدار طبیعی آن کاهش یافته باشد ولی میزان کراتینین همچنان طبیعی باشد (به علت اینکه ترشح آن افزایش می‌یابد). بنابراین میزان کراتینین خون افزایش نمی‌یابد مگر اینکه نارسایی اساسی در کار کلیه پیش آید. معمولاً در کنار اندازه‌گیری کراتینین، BUN نیز مورد ارزیابی قرار می‌گیرد که نسبت [BUN/Creatinine] به عنوان شاخصی از عملکرد کلیه‌ها و وضعیت متابولیسمی بدن مورد توجه قرار می‌گیرد. محدوده طبیعی [BUN/Creatinine] بین 10 –20 می‌باشد. در ازتمی پیش کلیوی (Pre-renal) که ممکن است به علت افزایش سنتز اوره یا کاهش جریان خون کلیوی (که متعاقب آن جریان ادرار کاهش یافته و باز جذب توبولی اوره افزایش می‌یابد) میزان BUN افزایش یافته و نسبت [BUN/Creatinine] افزایش می‌یابد در این حال غلظت کراتینین تغییر چندانی ندارد چون کراتینین پس از فیلتراسیون باز جذب نمی‌گردد (البته در حالاتی مانند نارسایی قلبی و دیابت بازجذب توبولی کراتینین تا حدودی افزایش می‌یابد). در ازتمی پس کلیوی به علت انسداد مکانیکی، سرعت فیلتراسیون گومرولی GFR کاهش می‌یابد و در این صورت هم BUN و هم کراتینین به یک نسبت تحت تأثیر قرار می‌گیرند، در نتیجه نسبت [BUN/Creatinine] تغییری نمی‌نماید.

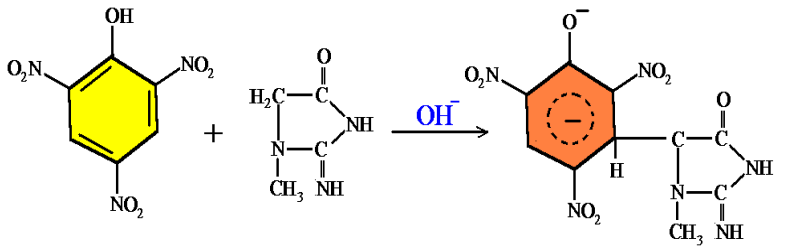
در خونریزی از دستگاه گوارش، خون توسط لوله گوارشی (روده‌ها) جذب می‌گردد و در کبد، بسیاری از این ترکیبات کاتابولیزه شده و میزان آمونیاک افزایش می‌یابد که متعاقب آن میزان تولید اوره افزایش یافته و نتیجتاً نسبت [BUN/Creatinine] افزایش می‌یابد. در شرایطی مانند افزایش آب بدن(هیدراسیون)، کاهش مصرف پروتئین و بیماریهای شدید کبدی و ... میزان BUN کاهش یافته و نسبت [BUN/Creatinine] کاهش می‌یابد. درشرایطی که کاهش وزن عضله اتفاق افتاده است میزان تولید کراتینین پایین‌تر از حد طبیعی بوده و [BUN/Creatinine] افزایش می‌یابد.

روشهای آنالیز کراتینین:

- **واکنش ژافه:**

اکثر روشهای متداول برای تعیین کراتین و کراتینین بر اساس واکنش ژافه استوار می‌باشند در این واکنش کراتینین تحت تأثیر یک محلول قلیایی پیکرات قرار گرفته و کمپلکس نارنجی متمایل به قرمز روشنی را ایجاد می‌نماید:

ترکیباتی مانند گلوکز ، پروتئین‌ها ، استو استات ، پیروات و اسید اوریک ، فروکتوز ، اسیدآسکوربیک می‌توانند در این روش تداخل ایجاد نمایند. نیز این روش به تغییرات دما و pH حساس می‌باشد .



Picrate Creatinine Picrate-Creatinine Complex

به منظور افزایش ویژگی، اصلاحات زیر را می‌توان در روش ژافه (واکنش ژافه) اعمال کرد:

1) می‌توان از **معرف لوید(Loyd) یا سیلیکات آلومینیوم** برای جداسازی کراتینین از سایر ترکیبات رنگزا استفاده نمود. در محیط اسیدی کراتینین جذب معرف لوید می‌شود، سپس در محلول قلیایی حل می‌گردد و پس از آن با استفاده از واکنش ژافه مقدار تعیین می‌گردد. این روش به عنوان **روش مرجع** اندازه‌گیری کراتینین محسوب می‌گردد.

2) استفاده از **آنزیم باکتریایی کراتینیاز:** در این روش تغییر شدت رنگ واکنش پیکرات ، قبل و بعد از تجزیه کراتینین توسط آنزیم باکتریایی ، مورد سنجش (توسط روش فوق) قرار می‌گیرد.

3) استفاده از **رزین‌های تعویض کاتیون:** توسط این رزین‌ها کراتینین جداسازی گردیده و در مرحله بعد می‌توان از واکنش ژافه استفاده نمود و یا مقدار آن را مستقیماً در طول موج 234 nm (طیف UV) اندازه‌گیری نمود.

4) **روش pH دوتایی ژافه:** در این روش میزان جذب مخلوط واکنش در دو pH مختلف اندازه‌گیری می‌شود. یکبار در pH قلیایی میزان جذب سنجیده می‌شود و سپس در مرحله بعد محیط را با افزودن استیک اسید، اسیدی می‌نماییم. اسیدی شدن باعث از بین رفتن رنگ ایجاد شده توسط کراتینین می‌شود، در حالیکه رنگ حاصل از مواد تداخل‌کننده از بین نمی‌رود و در این حالت نیز میزان رنگ را اندازه‌گیری می‌نماییم. اختلاف دو جذب ثبت شده متناسب با مقدار غلظت کراتینین در نمونه خواهد بود.

- **واکنش‌های آنزیمی:**

این روش معمولاً در آنالیزرها مورد استفاده قرار می‌گیرد، اساس این روش ، واکنش کراتینین با آنزیم کراتینین آمیدوهیدرولاز و ایجاد N-متیل هیدانتوئین و یون آمونیوم می‌باشد که در مرحله بعد آمونیوم با معرف **برموفنل‌بلو** ایجاد رنگ آبی می‌نماید، برای حذف تداخل مربوط به آمونیاک (آمونیوم) موجود در نمونه بیمار از شاهدی استفاده می‌گردد که حاوی تمامی عناصر نمونه بیمار بوده ولی فاقد آنزیم کراتینین ایمیدوهیدرولاز می‌باشد.

$$\text{کراتینین} \xrightarrow{\text{کراتینین ایمیدوهیدرولاز}} \text{N–متیل هیدانتوئین} + NH_4^+$$

$$NH_4^+ + \text{برم فنل بلو} \longrightarrow \text{کمپلکس رنگی}$$

توجه: در روش شیمیایی دیگری از معرف **3 و 5- دی نیترو اسیدبنزوئیک** استفاده میشود. از این روش به خصوص به هنگام استفاده از نوار معرف (strip) جهت اندازه‌گیری کراتینین استفاده میشود.

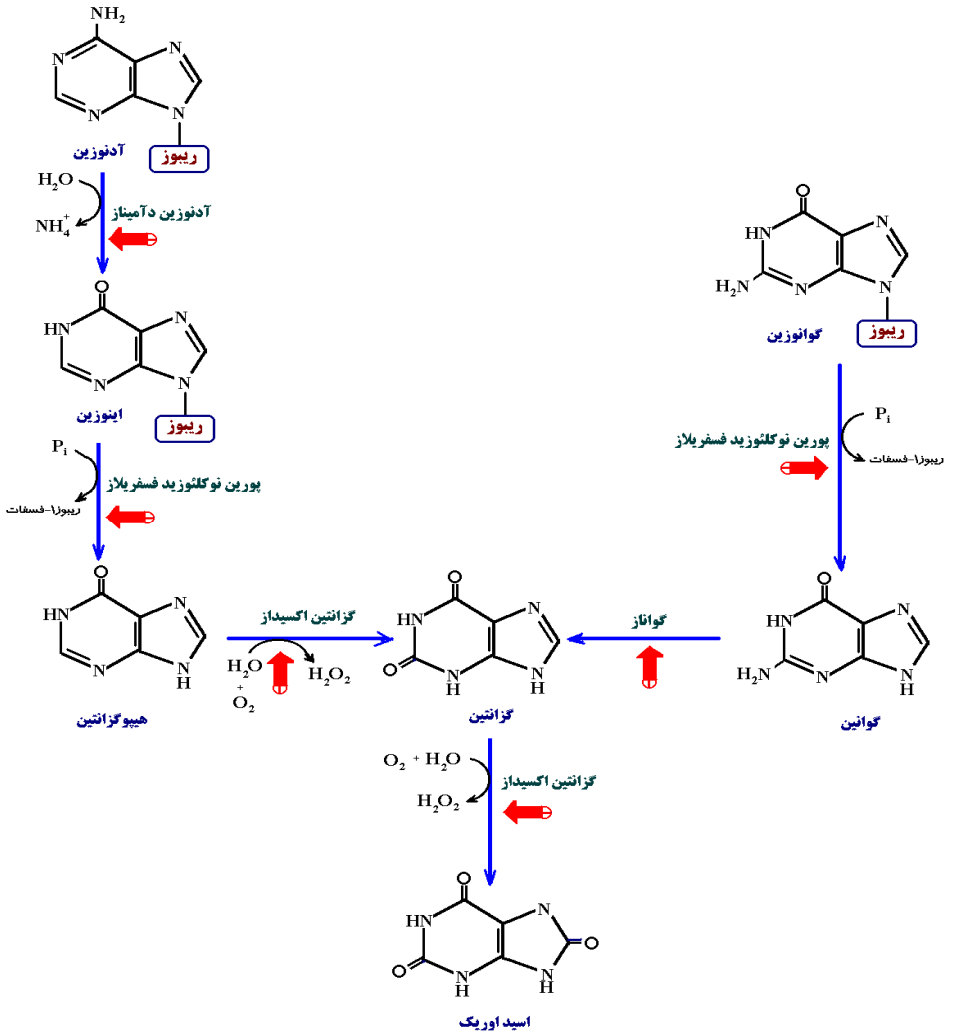
محدوده طبیعی مقدار کراتینین mg/dl 1/3-0/6 می‌باشد.

- **اندازه‌گیری مقدار کراتین :**

اگر نمونه سرم را اسیدی نماییم و حرارت دهیم ، کراتین به کراتینین تبدیل می‌شود. با محاسبه تفاضل مقادیر کراتینین قبل و بعد از تبدیل کراتین به کراتینین، مقدار کراتین بدست می‌آید.

اسیداوریک(Uric acid)

اسید اوریک از جمله ترکیبات ازت‌دار غیرپروتئینی محسوب می‌گردد که در بدن حاصل کاتابولیسم (تخریب) نوکلئوتیدهای پورینی می‌باشد. اندازه‌گیری این ترکیب درخون عمدتا به عنوان شاخصی برای Turn over سلول و نیز مفید در بررسی ناهنجاریها در مسیر بیوسنتزی پورین‌ها محسوب می‌گردد. این ترکیب همچنین 1/5-1 درصد نیتروژن ادراری را تشکیل میدهد. این ترکیب در طی واکنشهای کاتابولیسمی که توسط آنزیمهایی مانند آدنوزین‌دآمیناز(ADA) ، پورین نوکلئوزید فسفریلاز(PNP) گزانتین‌اکسیداز(XO) و نیز گواناز (در مسیر کاتابولیسم نوکلئوتید گوانین) صورت میگیرد به اسیداوریک تبدیل میگردد. سپس این ترکیب وارد جریان خون شده و به کلیه‌ها میرسد و فیلتره میگردد. وضعیت اسید اوریک در کلیه را میتوان به 4 مرحله تقسیم نمود:



1. فیلتراسیون گلومرولی همه اسیداوریک موجود در پلاسمای مویرگی به درون گلومرول.
2. بازجذب 100-98 درصد اسید اوریک فیلتره شده در لوله پیچیده نزدیک.
3. سپس ترشح اسید اوریک در بخش دورتر لوله پیچیده نزدیک به درون لومن(نفرونها).
4. بازجذب آن در لوله دیستال یا دور(Distal).

نتیجه اینکه دفع ادراری نهایی (خالص) اسید اوریک برابر با 12-6 درصد مقدار فیلتره شده میباشد. با توجه به اینکه pk_{a1} اسیداوریک برابربا 5/8 میباشد و pk_{a2} آن برابر با 10/3 (یعنی خارج از محدوده فیزیولوژیک میباشد و بنابراین فقط اولین پروتون اسیداوریک نفکیک

میگردد) میباشد، بنابراین فقط اسیداوریک و نمک اورات منوسدیم آن در مایعات بدن وجود دارد. اوراتها بسیار محلولتر از اسید اوریک میباشند. در pH = 5 کل اورات قابل حل درادرار (15 mg/dl) تنها یک دهم اورات قابل حل در pH = 7 (150-200 mg/dl) میباشد و pH ادرار طبیعی بعضا کمتر از 5/8 می‌باشد. لذا بلورهای دستگاه ادراری در قسمتهای پیش از محل اسیدی شدن ادرار (توبول دیستال و مجاری جمع‌کننده ادرار) از نوع اورات سدیم هستند در حالی که در قسمتهای دیستال از نوع اسیداوریک می‌باشند.

افزایش اسید اوریک در سرم هیپراوریکمی(هیپراوریسمی) و کاهش آن هیپواوریکمی(هیپواوریسمی) نامیده می‌شود.

هیپراوریکمی

هیپراوریکمی در بیماریهایی مانند: لش-نیان(Lesh-nyhan) ، نقرس(Goat) ، فون ژیرکه(Von Gierke) ، کمبود ارثی(نقص) آنزیم پیروات‌دهیدروژناز ، مسمومیت با ترکیباتی مانند سرب ، آرسنیت و جیوه ، در حالت الکلیسم(اعتیاد به الکل) ، در سندرمهای - میلوپرولیفراتیو (افزایش تکثیر سلولهای مغز استخوان) و شیمی‌درمانی تومورهای بدخیم که در آنها اسیدهای‌نوکلئیک افزایش می‌یابد، دیده می‌شود.

- در **بیماری لش نیان** که بر اثر نقص کامل آنزیم HGPRT (هیپوگزانتین‌گوانین فسفوریبوزیل‌ترانسفراز) ایجاد می‌گردد، تولید داخلی پورینها و در نهایت تولید اسیداوریک افزایش می‌یابد که از علائم آن سنگهای اسیداوریکی و سندرم قطع عضو، عقب‌ماندگی ذهنی، رفتار تهاجمی، جویدن غیر اختیاری اعضای بدن، سنگ کلیه و نفروپاتی از علائم آن است.
- ***بیماری نقرس*** نیز با هیپر اوریکمی ، آرتریت التهابی حاد، تجمع بلورهای کریستالهای اورات سدیم (که توفوس نامیده می‌شود) و سنگهای کلیوی اسید اوریکی مشخص می‌گردد. علت هیپراوریکمی و نقرس می‌تواند اولیه (نقصهای ژنتیکی و آنزیمی) یا ثانویه (اکتسابی) باشد. مهمترین علل اولیه در ایجاد هیپراوریکمی نقرس، افزایش تولید به علت افزایش فعالیت آنزیم PRPP-سنتتاز ، کمبود(نقص) نسبی آنزیم HGPRT و کاهش ترشح کلیوی به علل ناشناخته می‌باشد. از علل ثانویه در ایجاد هیپراوریکمی و نقرس، افزایش ساخت و تخریب اسید نوکلئیک (به عنوان مثال در همولیز مزمن، بیماریهای لنفوپرولیفراتیو یا میلوپرولیفراتیو) ، کمبود آنزیم گلوکز6-فسفاتاز ، نارسایی حاد یا مزمن کلیه و اختلالات توبولی ناشی از دارو یا فراورده‌های متابولیک درون‌زا می‌باشد.

همچنین بعضی از اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک، β-هیدروکسی‌بوتیرات و استو استات با اسیداوریک در دفع کلیوی رقابت نموده و از دفع اسید اوریک جلوگیری می‌نمایند و باعث افزایش مقدار آن در سرم می‌گردند. بنابراین کلیه عواملی که باعث افزایش میزان اسید لاکتیک و ... گردند به نوعی باعث افزایش سرمی اسید اوریک و نیز باعث تشدید بیماریهایی مانند نقرس می‌گردند:

- **بیماری فون ژیرکه** که علت آن نقص در آنزیم گلوکز6-فسفاتاز می‌باشد افزایش میزان گلوکز6-فسفات و لاکتات خون دیده می‌شود. افزایش گلوکز6-فسفات با فعال سازی مسیر پنتوز فسفات ، تولید پورینها را تحریک نموده که در نهایت افزایش تولید اسید اوریک را بدنبال دارد. از طرف دیگر افزایش لاکتات خون ناشی از این نقص منجر به افزایش آستانه کلیوی دفع اسید اوریک و نهایتا هیپراوریکمی می‌گردد.
- در **کمبود ارثی پیروات دهیدروژناز** ، مسمومیت با **یونهای آرسنیت و جیوه** (بدلیل مهار پیروات دهیدروژناز) و **درحالت الکلیسم** (بدلیل کمبود تیامین و مهار پیروات دهیدروژناز) نیز افزایش لاکتات و نهایتا هیپراوریکمی رخ می‌دهد.
- **افزایش Turn over اسیدهای نوکلئیک** در سندرمهای میلوپرولیفراتیو(افزایش تکثیر سلولهای مغز استخوان) و شیمی درمانی تومورهای بدخیم میزان تولید اسید اوریک افزایش می‌یابد.
- از علل دیگر افزایش اسید اوریک می‌توان به دریافت زیاد پورین از طریق غذا ، نارسایی‌های حاد و مزمن کلیوی و داروهای سیتوتوکسیک اشاره نمود.

هیپواوریکمی

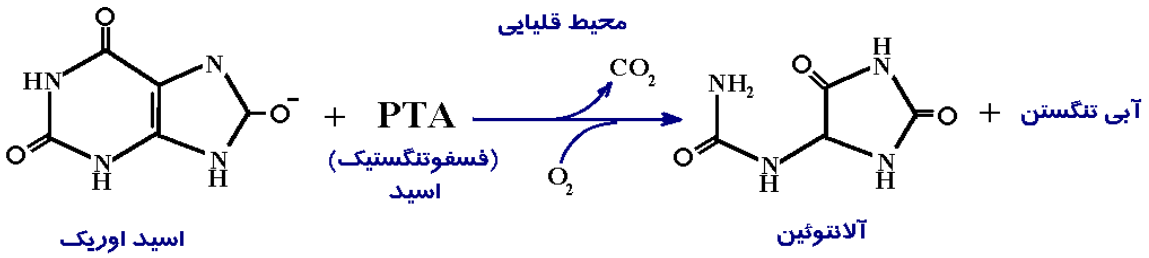
هیپواوریکمی به علل مختلفی از جمله نقص در آنزیم **پورین نوکلئوزید فسفریلاز(PNP)** ، **آدنوزین‌دآمیناز(ADA)** و **گزانتین اکسیدازXO** (که با گزانتینوری همراه بوده و ممکن است باعث تشکیل سنگهای گزانتینی گردد) و نیز **فسفوریبوزیل - پیروفسفاتاز** و در بیماریهای شدید کبدی و مصرف داروهایی مانند **آلوپورینول** (که مهار کننده آنزیم گزانتین اکسیداز میباشد) ، **سالیسیلاتها** و **پروبنسید** (با دوز بالا) که اوریکوزوریک می‌باشند، ایجاد میگردد.

روشهای اندازه گیری اسیداوریک : (urric acid)

دو روش اصلی اندازه‌گیری اسیداوریک عبارتند از: روش شیمیایی(روشCaraway) و روش آنزیمی (روش اوریکاز) .

الف- روش شیمیایی کاراوی (Caraway)

این روش مبتنی بر احیاء تنگستات و تبدیل آن به یک کمپلکس آبی رنگ (**آبی تنگستن**) می‌باشد. رایجترین ماده اکسیدان مصرفی فسفوتنگستات قلیایی است (به همین علت روش فسفوتنگستیک اسید PTA نیز نامیده می‌شود) که محصول احیاشدن آن، آتی-تنگستن(Tungsten blue) می‌باشد و به روش اسپکتروفتومتری قابل اندازه‌گیری میباشد (قرائت جذب در 650-700 nm).



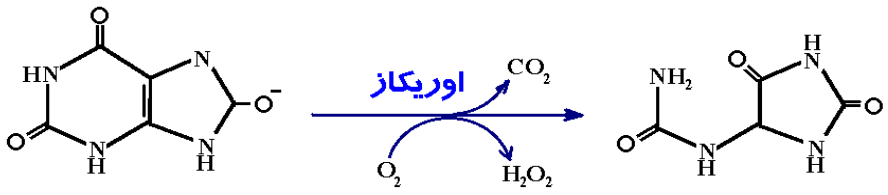
ترکیبات بسیاری ممکن است در این روش تداخل نمایند. ***حضور پروتئین سبب کدورت(Turbidity) و یا quenching می-گردد، بنابراین حذف پروتئین الزامی می‌باشد.*** حذف پروتئین در روشهای اتوماسیونی (دستگاهی) به وسیله دیالیز صورت می‌گیرد و در روشهای دستی به وسیله رسوب دادن با محلول $Ba(OH)_2/ZnSO_4$ صورت میگیرد (Protein free filtrate). همچنین در این روش ***نباید از محیط اسیدی استفاده نمود***، زیرا اورات هم به صورت اسید اوریک نامحلول در این شرایط همراه پروتئین رسوب مینماید.
ترکیبات اندوژن و اگزوژن دیگری هم در این روش (PTA) میتوانند تداخل نمایند که از آن جمله میتوان به گلوکز، اسید آسکوریک، گلوتاتیون، سیستئین، استامینوفن، استیل سالیسیلیک اسید (ASA)، ژانتیریک اسید(متابولیسمی از سالیسیلات)، پورین هایی از قبیل کافئین ، تئوبرومین و تئوفیلین اشاره نمود. همه ترکیبات مذکور باعث احیای PTA می‌گردند، بنابراین باعث خطای مثبت (Positive bias) می-گردند. استفاده از صاف‌شده بدون پروتئین، اکثر این تداخلات را از بین می‌برد.

نمونه مورد نیاز :

میتوان از پلاسما ، سرم و ادرار استفاده نمود. ***استفاده از هر یک از ضد انعقادها به جز اگزالات پتاسیم بلامانع است، زیرا این ترکیب ضد انعقاد باعث ایجاد فسفوتنگستات پتاسیم نامحلول مینماید.*** نمونه (اسید اوریک) به مدت 3 روز در حرارت آزمایشگاه پایدار میماند. برای نگهداری طولانی مدت باید آن را منجمد نمود. (افزودن فلوئورید F^- یا تیمول باعث پایداری بیشتر نمونه می گردد).

ب- روشهای آنزیمی:

این روشها بسیار اختصاصی برای اندازه‌گیری اسید اوریک می‌باشند و به دلیل عدم تداخل ترکیبات پروتئینی نیازی به جدا سازی پروتئینها نمی‌باشد. تنها ترکیباتی که در این روش تداخل مینماید گوانین، گزانتین و به طور کلی آنالوگهای ساختاری اسیداوریک می‌باشند. واکنش توسط آنزیم اوریکاز صورت میگیرد و اوریک اسید (اورات) به آلانتوئین تبدیل میگردد:



اورات　　آلانتوئین

به دو روش میتوان (در ادامه) مقدار اسید اوریک را مورد سنجش قرار داد :

1. میتوان کاهش جذب مربوط به اورات را در فاصله 282-292 nm (در محدوده طول موج UV) بوسیله اسپکتروفتومتر مورد ارزیابی قرار داد.
2. میتوان از یک واکنش جفت (Coupled Uricase method) استفاده نمود. که در این صورت از H_2O_2 تولید شده در واکنش بالا می‌توان جهت پی بردن به غلظت اورات استفاده نمود. به همین جهت از ترکیبات کروموژن استفاده می‌گردد (مانند: آمینوآنتی‌پیرین و دی‌کلرو فنوسولفونات). که این ترکیبات در حضور آنزیم پراکسیداز (Peroxidase) تبدیل به یک ترکیب رنگی می‌گردند که به روش رنگ‌سنجی قابل اندازه‌گیری هستند.

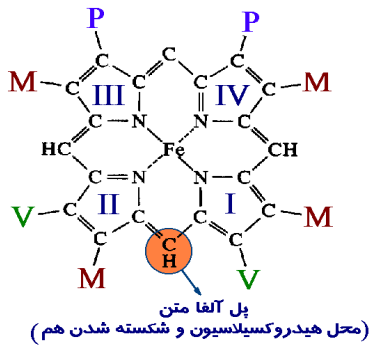
مقادیر طبیعی در سرم:

برای مردان: 3-9 mg/dl

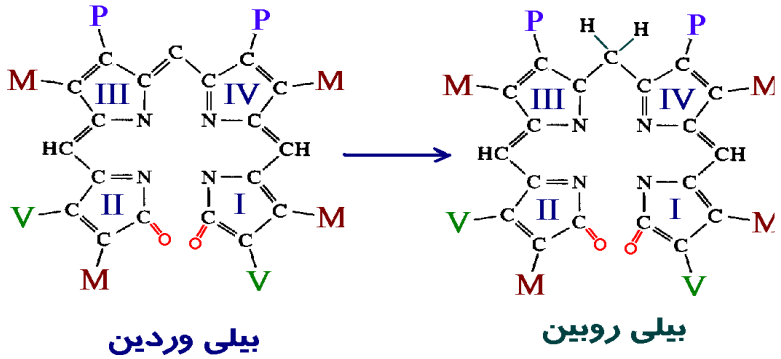
برای زنان: 2/5-7/5 mg/dl

بیلی روبین و روشهای اندازه‌گیری آن

بیلی‌روبین به عنوان یکی از رنگیزه‌های صفراوی بوده و به رنگ زرد-نارنجی می‌باشد. این ترکیب حاصل شکستن هم (Heme) در سیستم هم-اکسیژناز میکروزومی می‌باشد. این ترکیب(Heme) در ناحیه پل α-متن (بین حلقه‌های I , II) و با دخالت NADPH و O_2 ابتدا هیدروکسیله شده و سپس شکسته میشود (بطور همزمان آهن آن نیز اکسید شده و از آن جدا میگردد و وارد مخزن آهن بدن می‌گردد) و ایجاد بیلی‌وردین (سبزرنگ) مینماید که پس از هیدروژناسیون(احیا شدن بوسیله NADPH) تبدیل به بیلی‌روبین میگردد (اشکال بالا و پایین).



به طور متوسط روزانه 250-300 mg بیلی‌روبین تولید می‌گردد که از این میزان 85 درصد، مشتق از Heme مربوط به Hb (هموگلوبین) حاصل از RBC های فرسوده می‌باشد که در سیستم رتیکولواندوتلیال کبد ، طحال و مغز استخوان تخریب میگردند. 15 درصد باقیمانده مربوط به کاتابولیسم پروتئینهای هم‌دار دیگر نظیر میوگلوبین، سیتوکرومها، پراکسیدازها و همچنین حاصل از پیش‌سازهای RBCمی‌باشد که در مغز استخوان تخریب می‌گردند که به عنوان اریتروپوئز غیرموثر (Ineffective erythropoiesis) معروف میباشد.



بیلی‌روبین بعد از تولید در بافتهای محیطی وارد کبد می‌شود (به صورت **متصل به آلبومین** در خون انتقال می‌یابد و به کبد میرسد که به این شکل از بیلی-روبین، **α-بیلی‌روبین** یا **بیلی‌روبین غیر کنژوگه** یا **بیلی‌روبین غیرمستقیم** گفته می‌شود و در آب نامحلول است) و سریعا توسط هپاتوسیتها برداشت میگردد (به وسیله انتقال فعال وابسته به Carrier). سپس بیلی‌روبین به طور محکم (اما برگشت پذیر) به پروتئین های محلول متصل میگردد. ازجمله این پروتئین ها Z protein ,Ligandin میباشد. لیگاندین محکم‌تر به بیلی‌روبین متصل می‌گردد و باعث جلوگیری از بازگشت این ترکیب به پلاسما میگردد (برگشت آن را به تاخیر می اندازد). سپس توسط آنزیم(های) UDP-گلوکورونیل‌ترانسفراز، کنژوگاسیون صورت می‌گیرد و ایجاد دو نوع ترکیب به نامهای منوگلوکورونید بیلی‌روبین (**بیلی‌روبین نوع β**) و دی‌گلوکورونید بیلی‌روبین (**بیلی‌روبین نوع γ**) می‌نماید که 90 درصد آن بصورت γ- بیلی‌روبین و 10 درصد بصورت β- بیلی‌روبین می‌باشد. سپس ترشح آن به درون صفرا صورت می‌گیرد(تصور می-شود توسط یک سیستم انتقال فعال و برخلاف گرادیان غلظتی صورت می‌گیرد). بعد از ورود این ترکیبات به درون روده، تحت تاثیر آنزیمهای β-گلوکورونیداز کبدی ، روده‌ای و یا باکتریایی و pH قلیایی روده ، هیدرولیز می‌گردند و تبدیل به رنگدانه‌های غیرکنژوگه می-گردند. تحت اثر فلور میکروبی غیرهوازی روده‌ای، بیلی‌روبین غیرکنژوگه با احیا شدن به ترکیبات متنوعی از قبیل استرکوبیلینوژن، مزوبیلینوژن و اوروبیلینوژن تبدیل میگردد که مجموعا تحت عنوان **اوروبیلینوژن** از آنها نام برده می‌شود. در حدود 98 درصد از این ترکیبات باز جذب میگردند و وارد چرخه روده‌ای- کبدی(Entro-hepatic) می‌گردند. بخش عمده‌ای از اوروبیلینوژن‌های باز جذب شده به وسیله کبد برداشت شده و توسط صفرا دوباره دفع میگردند. 2-5 درصد از آن وارد جریان خون عمومی بدن شده و در ادرار ظاهر

میگردد. بنابراین میتوان گفت که در حال سلامت و شرایط طبیعی ممکن است مقادیر بسیار ناچیزی اوروبیلینوژن (0-24 mg در 24 ساعت) در ادرار مشاهده گردد.

ناهنجاریهای متابولیسم بیلی‌روبین

بیماری‌های ارثی و اکتسابی می‌توانند بر یک یا چند مرحله از مراحل درگیر در تولید، برداشت، ذخیره سازی و دفع بیلی‌روبین تاثیر بگذارند. افزایش میزان بیلی‌روبین در سرم تحت این شرایط به عنوان **هیپربیلی‌روبینمی** شناخته می‌شود و بسته به نوع ناهنجاری، نوع بیلی-روبین افزایش‌یافته می‌تواند متفاوت باشد. می‌توان هیپربیلی‌روبینمی را طبقه‌بندی نمود. بعنوان مثال هیپربیلی‌روبینمی را بسته به نوع بیلی‌روبین موجود در پلاسما (کنژوگه وغیرکنژوگه) می‌توان به **هیپربیلی‌روبینمی احتباسی** ناشی از اضافه تولید، و **هیپربیلی‌روبینمی برگشتی** ناشی از انسداد صفراوی و در نتیجه برگشت بیلی‌روبین به جریان خون طبقه‌بندی می‌نمایند. ازبین دو نوع کنژوگه و غیرکنژوگه بیلی‌روبین، تنها نوع کنژوگه است که بدلیل محلول بودن در آب می‌تواند وارد ادرار گردد. همچنین تنها نوع غیرکنژوگه بیلی‌روبین است که بدلیل هیدروفوب بودنش می‌تواند از سد خونی و مغزی بگذرد و وارد دستگاه اعصاب مرکزی شود بنابراین فقط هیپربیلی‌روبینمی غیرکنژوگه که در هیپربیلی‌روبینمی احتباسی یافت می‌شود می‌تواند موجب آنسفالوپاتی شود (کرنیکتروس). بر همین اساس **یرقان کولوریک**[1] فقط در هیپربیلی‌روبینمی برگشتی ایجاد می‌شود و **یرقان آکولوریک** صرفا در حضور مقادیر مازاد بیلی‌روبین غیرکنژوگه بوجود می‌آید.

کولوریک[1] به معنای وجود صفرا در

انواع هیپربیلی‌روبینمی‌ها عبارتند از:

الف- نوع غیرکنژوگه

ب- نوع کنژوگه

الف- هیپربیلی‌روبینمی نوع غیرکنژوگه

1) یرقان فیزیولوژیک:

رایجترین حالت دیده‌شده می‌باشد که در آن بیلی‌روبین‌غیرکنژوگه در نوزادان افزایش می‌یابد. بطوریکه در 50 درصد از نوزادان در 5 روز اول تولد این افزایش وجود دارد که علت آن، همولیز اریتروسیتها و ناقص بودن بعضی از مراحل درگیر درمتابولیسم بیلی‌روبین و دفع آن می‌باشد. در نوزادان Full-term مقدار بیلی‌روبین غیرکنژوگه 4-5 mg/dl می‌باشد و در درصد کمی از تولدها تا 48 ساعت پس از تولد مقدار آن به 10 mg/dl می‌رسد که 7-10 روز پس از تولد به مقدار طبیعی بر میگردد.

2) هیپربیلی‌روبینمی ناشی از عوامل پیش‌کبدی(Pre-hepatic) :

در غیاب بیماری های کبدی نوعی از هیپربیلی‌روبینمی مشاهده می‌شود که بیشتر ناشی از تخریب پیش از بلوغ اریتروسیتها و اریتروپوئز ناقص میباشد. از آنجایی که در این حالات سرعت تولید بیلی‌روبین بیش از ظرفیت دفعی آن می‌باشد، بیلی‌روبین غیرکنژوگه در سرم افزایش میابد.

3) سندرم‌های کریگلر- نجار (Crigler-Najjar):

بر دو نوع میباشد : *سندرم کریگلر- نجار I* و *سندرم کریگلر- نجار II* . که بر اثر نقص در آنزیم UDP-گلوکورونیل‌ترانسفراز ایجاد می‌گردند. در نوع *I* که ناشی از نقص کامل آنزیم می باشد، یرقان شدید مادرزادی دیده می‌شود و مقدار بیلی‌روبین غیرکنژوگه به 20-50mg/dl نیز میرسد و در 15 ماه اول زندگی معمولا مرگ حادث می‌شود. در نوع*II* که خوش‌خیم‌تر می‌باشد و ناشی از نقص نسبی در آنزیم فوق می‌باشد، افزایش بیلی‌روبین غیرکنژوگه تا 20 mg/dl مشاهده می گردد.

4) سندرم ژیلبرت(Gillbert):

حداکثر افزایش مشاهده شده در این سندرم 3 mg/dl میباشد. ممکن است به علت نقص در آنزیم UDP-گلورونیل‌ترانسفراز و یا نقص در انتقال غشایی ایجاد گردد .

5) هیپربیلی‌روبینمی سمی(Toxic) :

حاصل اختلال عمل کبد بر اثر سمومی مانند کلروفرم ، آرسفنامینها و استامینوفن و . . . می‌باشد.

6) هیپربیلی‌روبینمی بر اثر تغذیه از شیر مادر:

استفاده نوزادان از شیر مادر (به ویژه زمانی که مادر از قرصهای ضدحاملگی نیز استفاده نماید) باعث افزایش بیلی‌روبین می‌گردد. قسمت اعظم بیلی‌روبین از نوع غیرمستقیم می‌باشد. علت افزایش دقیقا مشخص نیست ولی گفته می‌شود که وجود FFA می‌تواند عمل برداشت Uptake بیلی‌روبین را کاهش دهد.

7) هیپربیلی‌روبینمی بر اثر گرسنگی: در گرسنگی سطح بیلی‌روبین سرم افزایش می‌یابد که می‌تواند نتیجه افزایش تولید آن یا کاهش کلیرانس آن باشد. همچنین در گرسنگی افزایش سطح FFA و بیلی‌روبین با هم اتفاق می‌افتد که نشان‌دهنده این است که FFA درمرحله برداشت Uptake کبدی با بیلی‌روبین در اتصال به پروتئینهای غشا یا پروتئین Z رقابت کند.

ب- هیپربیلی‌روبینمی نوع کنژوگه

1) انسداد مجاری صفراوی: *یا انسداد مجاری کبدی-صفراوی می‌تواند باعث جلوگیری از دفع بیلی‌روبین دی‌گلوکورونید و منوگلوکورونید و سایر ترکیبات دیگر گردد(یرقان کلستازی). این عامل باعث می‌گردد که این ترکیبات به درون وریدهای کبدی وارد شده و در خون و ادرار ظاهر گردند.*

2) سندرم دوبین-جانسون: به علت نقص در ترشح کبدی بیلی‌روبین‌کنژوگه به درون صفرا ایجاد می‌گردد. و یک ناهنجاری ژنتیکی خوش‌خیم می‌باشد که در آن میزان بیلی‌روبین تام (که شکل غالب آن از نوع کنژوگه می‌باشد) به 2-5 mg/dl می‌رسد.

3) سندرم روتور: این سندرم با هیپربیلی‌روبینمی مزمن کنژوگه و سلامت بافت‌شناختی کبد همراه است و ممکن است به دلیل نقص در انتقال یونهای آلی (از جمله بیلی‌روبین) در سلولهای کبدی ایجاد شود .

****

اثر فنوباربیتال بر میزان بیلی‌روبین: این دارو میزان بیلی‌روبین غیرکنژوگه را کاهش می‌دهد. علت آن القای بیان آنزیم UDP-گلوکورونیل‌ترانسفراز (UDP-GT) می‌باشد. (نکته: در بیماران مبتلا به سندرم کریگلرنجارI ، فنوباربیتال هیچ تاثیری در غلظت بیلی‌روبین سرم ندارد. چرا؟)

اثر نور بر میزان بیلی‌روبین: نور مستقیم یا نور چراغ فلورسنت بطور قابل ملاحظه‌ای باعث کاهش بیلی‌روبین پلاسما می‌گردد که از این خاصیت برای درمان هیپربیلی‌روبینمی نوزادان استفاده میگردد (فتوتراپی). در این حالت جذب نور در طول موج 425-475 nm توسط بیلی‌روبین باعث تجزیه آن شده و به سرعت از طریق صفرا ، مدفوع و ادرار می‌گردد.

روشهای اندازه‌گیری بیلی‌روبین

1) **روش آنزیمی:** با استفاده از آنزیم بیلی‌روبین‌اکسیداز میتوان بیلی‌روبین را به بیلی‌وردین تبدیل نمود. با استفاده از میزان کاهش جذب نمونه در محدوده طول موج 460-405 nm بعد از اثر آنزیم روی نمونه می‌توان مقدار بیلی‌روبین را محاسبه نمود.

بیلی وردین $\xrightarrow{\text{بیلی روبین اکسیداز}}$ بیلی روبین

2) **روش مستقیم یا روش استفاده از بیلی‌روبینومتر (برای نوزادان):**

از این روش برای سنجش میزان بیلی‌روبین تام نوزادان استفاده می‌گردد. به علت اینکه اکسی‌هموگلوبین(HbO_2) دارای جذب قوی در طول موج 454 nm می باشد (که ماگزیمم جذب بیلی‌روبین در این طول موج می باشد)، ضروری است که تداخل مربوط به HbO_2 حذف شود، برای این امر مقدار جذب بدست آمده در طول موج 454 nm از مقدار جذب به دست آمده در طول موج 540nm کم می‌شود، به علت اینکه HbO_2 در هر یک از این دو طول موج دارای جذب یکسانی می‌باشد، بنابراین بوسیله یک اسپکتروفتومتر و یا فتومتر بی‌کروماتیک (بیلی‌روبینومتر) مقدار آنها در هر دو طول موج قابل سنجش می‌باشد. در صورت وجود کاروتنوئیدها در نمونه نمی‌توان از این روش استفاده نمود زیرا این ترکیبات در 454 نانومتر دارای جذب میباشند و باعث ایجاد خطا میگردند، بنابراین روشهای اسپکتروفتومتری مستقیم برای اندازه‌گیری میزان بیلی‌روبین در افراد بالغ مورد استفاده قرار نمی‌گیرد. از آنجائیکه معمولا نوزادان تا سه ماهگی هیچگونه کاروتنوئیدی مصرف نمی‌نمایند بنابراین برای سنجش بیلی‌روبین تام آنها می‌توان از این روش استفاده نمود . سرعت و نیاز به حجم نمونه کم از مزیت‌های مهم این روش می‌باشد. همچنین از این روش برای تعیین میزان بیلی‌روبین مایع‌آمینوتیک میتوان استفاده نمود که به عنوان شاخصی برای بیماری همولیزی در جنین‌ها استفاده می‌گردد.

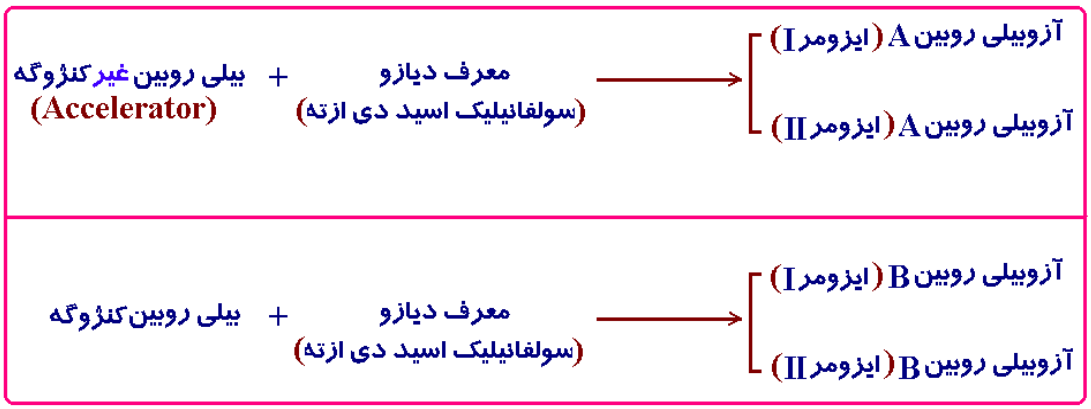
$$\text{جذب مربوط به بیلی روبین تام} = A_{454} - A_{540}$$

روش شیمیایی: مبنای روشهای شیمیایی بر واکنش معرف **دیازو (سولفانیلیک‌اسید دی‌ازته)** با بیلی‌روبین (کنژوگه و غیرکنژوگه)، شکستن آن (با تاثیر بر کربن متیلن مرکزی ملکول بیلی‌روبین) و ایجاد 2 ملکول **آزوبیلی‌روبین** می‌باشد. با افزایش الکل به محیط واکنش میتوان بیلی روبین تام را اندازه گیری نمود. واکنش های کلی در زیر آورده شده است.

در روش Evelyn-Malloy از محیط اسیدی که pH آن برابر با 1/2 است استفاده می‌گردد و رنگ ایجاد شده (آزوبیلی-روبین) قرمز یا ارغوانی می‌باشد و با اندازه‌گیری میزان رنگ در طول موج 560 nm غلظت بیلی‌روبین کنژوگه بدست می‌آید. برای بدست آوردن میزان غلظت بیلی‌روبین تام از متانول به عنوان حلال (Accelerator) استفاده می‌گردد و در این‌حالت بیلی‌روبین غیرکنژوگه نیز به حالت محلول در آمده و مقداری که مورد سنجش قرار می‌گیرد مربوط به بیلی‌روبین‌تام خواهد بود. با محاسبه ساده می‌توان مقدار بیلی‌روبین غیرکنژوگه را محاسبه نمود. **در روش Jenderassik-Grof** از محلول سدیم بنزوات-کافئین به عنوان حلال(Accelerator) استفاده می‌گردد و محیط واکنش، قلیایی یا خنثی میباشد (که بعد از واکنش قلیایی می‌گردد pH=13) و سپس جذب اندازه‌گیری می‌شود. در این pH ، طیف‌جذبی آزوبیلی‌روبین به آبی شدید تبدیل می‌گردد که در طول موج 600 نانومتر مورد سنجش قرار میگیرد.

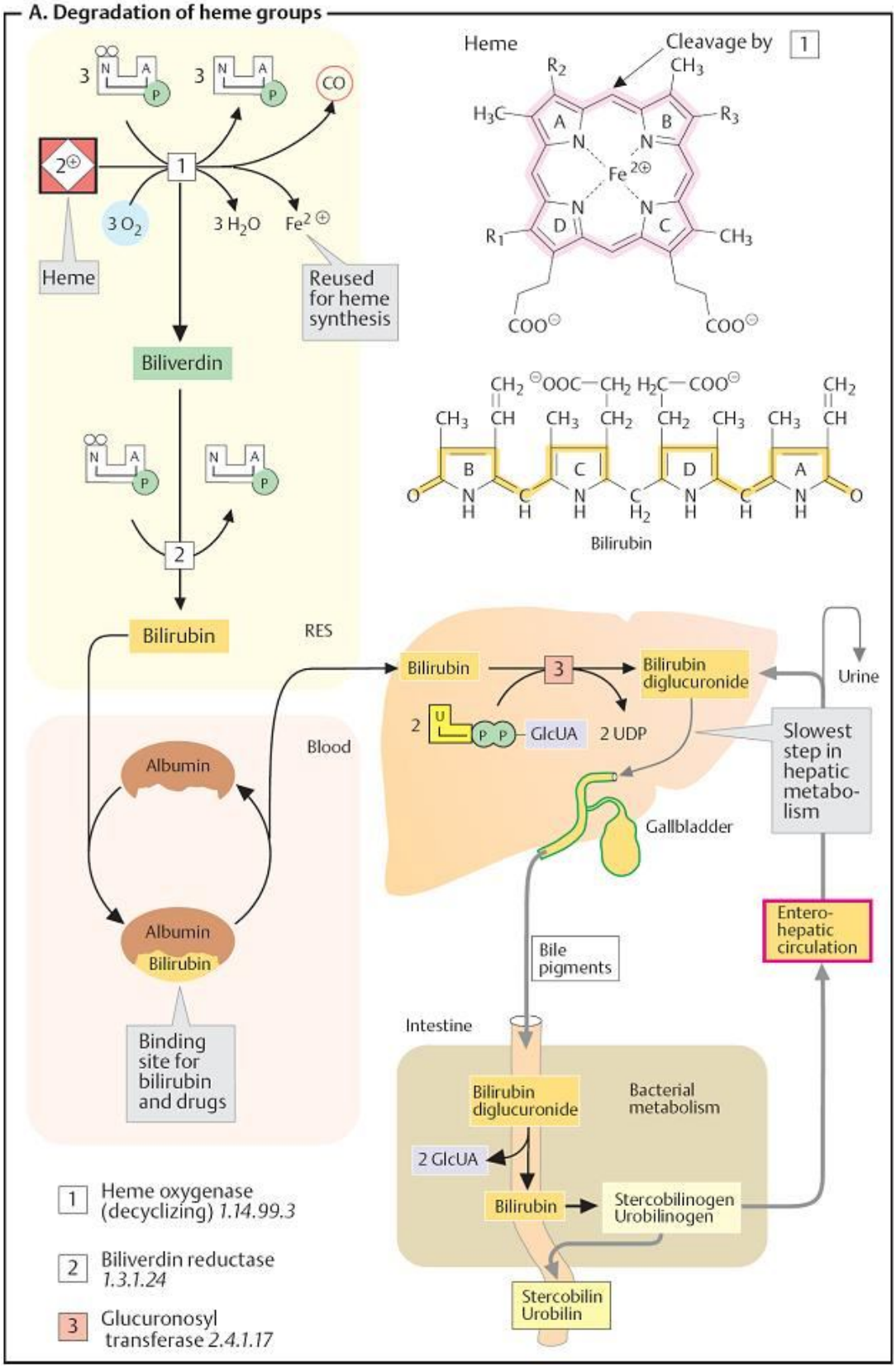
کافئین و سدیم بنزوات باعث جداسازی بیلی‌روبین از آلبومین و حل شدن آن می‌گردد. استات سدیم مورد استفاده در آزمایش نقش بافر را داشته، از اسید آسکوربیک برای از بین بردن معرف دی آزوی اضافه و توقف واکنش استفاده میشود و تارترات پتاسیم نیز محیط را قلیایی نموده و باعث تشدید رنگ آزوبیلی‌روبین می‌گردد.

بیلی روبین کنژوگه + بیلی روبین غیرکنژوگه = بیلی روبین تام



نمونه مورد نیاز:

باید از سرم یا پلاسما (ناشتا) استفاده گردد بعلت اینکه لیپمی وجود نداشته باشد. همچنین نمونه نباید همولیز باشد (مهمترین تداخل کننده منفی در این روش هموگلوبین است) و باید دور از نور سفید و UV و در دمای پائین نگهداری شود چون هر دو نوع بیلی‌روبین در این شرایط اکسید می گردند. نمونه‌ها در دمای یخچال تا سه روز و در دمای 70- تا سه ماه پایدارند.


A. Degradation of heme groups
Heme
Cleavage by 1
Fe 2⊕
COO⊖
Bilirubin
3
CO
2⊕
1
3 O2
3 H2O
Fe2 ⊕
Heme
Reused for heme synthesis
Biliverdin
2
Bilirubin
RES
Blood
Albumin
Albumin
Bilirubin
Binding site for bilirubin and drugs
Bilirubin
3
Bilirubin diglucuronide
2
U
P P
GlcUA
2 UDP
Urine
Slowest step in hepatic metabo-lism
Gallbladder
Entero-hepatic circulation
Bile pigments
Intestine
Bilirubin diglucuronide
Bacterial metabolism
2 GlcUA
Bilirubin
Stercobilinogen Urobilinogen
Stercobilin Urobilin
1 Heme oxygenase (decyclizing) 1.14.99.3
2 Biliverdin reductase 1.3.1.24
3 Glucuronosyl transferase 2.4.1.17

اصول سنجش کلسیم و فسفر

کلسیم(Ca^{2+}) :

این عنصر فراوان‌ترین عنصر معدنی در بدن می‌باشد. مقدار ان در افراد بالغ در حدود 1200-1000 گرم می‌باشد. 98% آن به صورت هیدروکسی آپاتیت در استخوانها موجود بوده و مابقی در بخشهای دیگر بدن حضور دارد . یعنی 1 درصد آن در مایعات خارج سلولی و 1 درصد در سایر بافتها (از جمله عضلات) وجود دارد . کلسیم موجود در استخوانها به صورت املاح نامحلول فسفات و بیکربنات می‌باشد علاوه بر نقش آن در استحکام استخوان ، در انعقاد خون ، هدایت عصبی ، عضلانی ، قابلیت تحریک عضلات اسکلتی ، کارکرد طبیعی قلب ، در تنظیم فعالیت‌های ترشحی غدد درون ریز و برون ریز و فرآیند انتقال پیام هورمونی در داخل سلول و ... نقش دارد .

تراز مثبت (تعادل مثبت) Ca^{2+} در نوزادان ، کودکان ، در فعالیتهای عضلانی و در بانوان (در هنگام بارداری و شیردهی) وجود دارد. همچنین جفت ، جنین و غدد پستان در هموستاز آن دارای نقش می‌باشند . در دوران پیری و در بیماریهای مختلف ، تعادل کلسیم منفی گشته و میزان دفع آن بیش از جذب خواهد بود .

تنظیم مقدار آن در بدن به صورت دقیق و به وسیله نوعی سیستم چند عضوی (کبد ، پوست ، کلیه ، استخوان و روده) و چند هورمونی (هورمون پاراتورمون PTH ، 25و1- دی‌هیدروکسی کله‌کلیسفرول و کلسیتونین) صورت می‌گیرد . کلسیم در خون به سه شکل عمده دیده می‌شود. تقریباً 50 درصد از کلسیم تام خون به شکل یونیزه ، 45 درصد آن به شکل متصل به پروتئین، به ویژه آلبومین و 5 درصد از آن به صورت کمپلکس با آنیونهایی مانند فسفات و سیترات و ... دیده می‌شود .

تنها شکل یونیزه آن(Ca^{2+}) از لحاظ فیزیولوژیک فعال می‌باشد . محرک اصلی جذب کلسیم از روده باریک ویتامین D و تا حدودی PTH و نیز هورمون رشد و رژیم غذایی پرپروتئین و اسیدی بودن محیط روده می‌باشد. جذب یون کلسیم از روده تحت تأثیر فیتات (حاصل از اسیدفیتیک غلات و حبوبات) ، فسفات و اگزلات و اسیدهای چرب قرار گرفته و مختل می‌گردد . دفع مقادیر عمده‌ای از آن از طریق ادرار صورت می‌گیرد هر چند دفع آن از طریق مدفوع با مقدار آن در رژیم غذایی مرتبط می‌باشد .

پاراتورمون(PTH) :

پاراتورمون(PTH) یکی از هورمونهای تنظیم کننده غلظت Ca^{2+} در مایعات خارج سلولی می‌باشد . کاهش سطح کلسیم پلاسما باعث آزاد شدن PTH می‌گردد . این هورمون به طرق مختلف باعث افزایش میزان Ca^{2+} یونیزه در سرم می‌گردد :

1. با اتصال به گیرنده‌های سطح سلولهای کلیوی و نهایتاً تأثیر بر لوله‌های ادراری باعث اثر بر باز جذب کلسیم می‌گردد . این هورمون در لوله‌های پروگزیمال باعث کاهش باز جذب فسفات ، کلسیم Ca^{2+} و بیکربنات(HCO^{3-}) می‌گردد ، ولی اثر آن بر بخش انتهایی لوله‌های کلیوی، افزایش بازجذب کلسیم می‌باشد (اثر سریع PTH) .
2. با تأثیر بر سلولهای کلیوی سازنده 25و1- دی‌هیدروکسی کله‌کلیسفرول و افزایش سنتز این ترکیب (شکل فعال ویتامین D) باعث افزایش غیرمستقیم کلسیم می‌گردد که این اثر مربوط به تأثیر ویتامین مذکور بر سلولهای مخاط روده می‌باشد.
3. با اتصال به گیرنده‌های سطح سلولهای استخوانی و با تحریک استئوکلاستها باعث انحلال استخوان و آزاد شدن کلسیم می‌گردند. (بزرگترین تأثیر هورمون PTH) .

پس به طور خلاصه (نتیجه نهایی اثر PTH) :

- کاهش دفع کلسیم از کلیه‌ها و افزایش کلسیم در سرم .
- کاهش باز جذب فسفات از لوله‌های ادراری و کاهش فسفات سرم .
- تحریک سنتز کلیوی ویتامین D فعال ، افزایش جذب روده‌ای کلسیم و افزایش کلسیم سرم .

- آزاد شدن کلسیم از استخوانها ، در صورت تداوم ایجاد پوکی استخوان ، تخریب ماتریکس استخوان ، تجزیه ماده زمینه‌ای که نتیجه آن آزاد شدن پرولین و هیدروکسی پرولین می‌باشد .
- وقفه در باز جذب HCO^{3-} ، Na^{+} ، K^{+} و اسیدهای آمینه از لوله‌های ادراری .
- افزایش دفع کلیوی کلسیم در صورت تداوم هیپرکلسمی (اثر متضاد با اثر اول) .

ویتامین D :

این ویتامین نیز نقش مهمی در هموستاز کلسیم در سرم بازی می‌نماید . شکل غیرفعال آن که حاصل تأثیر UV در پوست بر ترکیباتی مانند 7- دهیدروکلسترول و یا ارگوسترول می‌باشد به دو صورت ویتامین D_3 و D_2 وجود دارد که تنها در ساختار زنجیره جانبی با همدیگر تفاوت دارند . هیدروکسلاسیون این ویتامینها در کبد و کلیه عمدتاً صورت می گیرد .

در کبد هیدروکسیلاسیون در جایگاه 25 صورت گرفته و ایجاد 25-هیدروکسی-ویتامین D (D_3 یا D_2) می‌نماید . سپس ترکیب مذکور به کلیه‌ها منتقل گردیده و هیدروکسیلاسیون بر روی کربن شماره 1 نیز صورت گرفته و ایجاد شکل فعال ویتامین D را می‌نماید.

تولید آن تحت تأثیر و تنظیم فیدبکی (فیدبک منفی) بوده و همچنین هورمون پاراتورمون و فسفات سرم نیز بر آن مؤثر می‌باشد . افزایش غلظت ویتامین D فعال باعث مهار آنزیم α-1-هیدروکسیلاز می گردد (متابولیت عمده ویتامین D در پلاسما از نوع 25-هیدروکسی ویتامین D می‌باشد) . آثار فیزیولوژیک آن به طور عمده عبارت است از :

- افزایش جذب کلسیم و فسفر از روده .
- افزایش باز جذب از بخش انتهایی لوله‌های ادراری .
- افزایش کلسیم یونیزه و نیز کلسیم تام و فسفات پلاسما .
- افزایش تحلیل (Resorption) کلسیم از استخوانها با واسطه PTH و نیز تشدید تمایز استئوکلاستها .

کلسیتونین(Calcitonin) :

این هورمون از سلولهای پارافولیکولار (مجاور فولیکولی) در غده تیروئید سنتز می گردد و یک هورمون پپتیدی می‌باشد . این هورمون تحت تأثیر بسیاری از هورمونهای دستگاه گوارش (علاوه برتاثیری که افزایش کلسیم بر ترشح آن دارد) افزایش می‌یابد و باعث کاهش باز جذب توبولی (در کلیه‌ها) Ca^{2+} و فسفات می گردد (به همراه کاهش بازجذب Na^{+} ، K^{+} و Mg^{2+}) . این هورمون باعث جذب کلسیم توسط استخوان می گردد(Bone formation) .

هیپرکلسمی(Hypercalcemia) :

در موارد متعددی ممکن است میزان کلسیم سرم تغییر نماید . مهمترین این عوامل عبارتند از :

- **هیپرپاراتیروئیدیسم اولیه و ثانویه** که می‌تواند منجر به نارسایی حاد و مزمن کلیه و استئومالاسی گردد . افزایش کلسیم پلاسما خود عامل اختلال در عملکرد کلیه بوده و دفع بیش از حد آن از نفرونها به رسوب کلسیم به صورت سنگهای ادراری (**نفروکلسینوز**) منجر می گردد . در هیپرپاراتیروئیدیسم کلسیم یونیزه نیز(علاوه بر کلسیم تام) افزایش می‌یابد .

(هیپرپاراتیروئیدیسم اولیه به علت نوعی آدنوم فعال پاراتیروئید یا هیپرپلازی پاراتیروئید و تولید نابجای PTH می‌باشد و هیپرپاراتیروئیدیسم ثانویه در مبتلایان به نارسایی پیشرونده کلیه دیده می‌شود) .

- **تومورهای بدخیم** به ویژه سرطانهای ریه و پستان (به علت متاستازهای استخوانی و نیز به علت ترشح PTH) ، سرطان کلیه ، لنفوما و مالتیپل میلوما ، که ممکن است عوامل هومورال و فاکتورهای فعال‌کننده استئوکلاست‌ها را آزاد نموده و باعث افزایش میزان کلسیم و فسفات گردند .

- **بیماری گرانولوماتوز** مانند : سل (توبرکولوز) .
- **بیماری اندوکرین** مانند : هیپرتیروئیدیسم ، سندرم کوشینگ ، آکرومگالی و نیز تورموهای اندوکرین . در هیپرتیروئیدیسم (که همراه است با هیپرکلسی اوری ، هیپرفسفاتمی و افزایش آلکالن فسفاتاز و گاهی با هیپرکلسمی) ، افزایش تیروکسین باعث افزایش باز جذب استخوانی کلسیم و کاهش PTH و Vit D می‌گردد .
- در **آکرومگالی** افزایش هورمون رشد باعث افزایش جذب روده‌ای کلسیم و فسفر و افزایش باز جذب کلیوی کلسیم و فسفر می‌گردد .
- در **سندرم کوشینگ** افزایش گلوکوکورتیکوئیدها (مانند کورتیزول) باعث کاهش جذب روده‌ای و کاهش باز جذب (نقص باز جذب) کلیوی می‌گردد که این امر باعث افزایش PTH و افزایش باز جذب استخوانی و نهایتاً افزایش کلسیم خون می‌گردد .
- داروها : **مسمومیت با ویتامین D** ، ترکیبات دیورتیک و هورمونها .
- **هیپرکلسمی کاذب** : که به علت استاز وریدی (Stasis) ، بستن طولانی مدت تورنیکه یا گارو ، افزایش پروتئین سرم و دهیدراتاسیون ایجاد می‌گردد .
- در **هیپوآلبومینمی** : که میزان کلسیم یونیزه افزایش می‌یابد (ولی غلظت کلسیم تام پلاسما کاهش می‌یابد).
- در افزایش پروتئینهای سرم **(هیپرپروتئینمی)** ، اتصال کلسیم به آنها افزایش یافته و در نهایت غلظت کلسیم تام سرم افزایش می‌یابد .
- در **اسیدوز** تحت تأثیر کاهش PH ، شکل یونیزه کلسیم افزایش می‌یابد (به علت کاهش اتصال کلسیم به پروتئین‌ها) .
- در **بیماریهای استخوانی** از جمله بیماری پاژه .

هیپوکلسمی(Hypocalcemia) :

کاهش کلسیم سرم که با علائم تتانی همراه می‌باشد در موارد زیر ممکن است ایجاد گردد :

- **هیپوپاراتیروئیدیسم اولیه** (ناشی از تخریب خود ایمنی غده‌ها) و **ثانویه** (برداشت تصادفی یا آسیب غدد در جریان جراحیهای گردن) و یا **کاذب** (به علت مقاومت عضو هدف به اثرات پاراتورمون) . که علائم بیوشیمیایی آن کاهش کلسیم و افزایش فسفات سرم می‌باشد .
- کمبود ویتامین D و سندرم‌های سوء جذب و یرقانهای انسدادی .
- آسیب کلیوی .
- راشیتیسم وابسته به ویتامین D .
- **هیپوآلبومینمی** (کاهش پروتئین‌های پلاسما از معمول‌ترین علل کاهش کلسیم تام پلاسما می‌باشد) .
- کاهش دریافت کلسیم و فسفات و ویتامین D .
- در اواخر دوران بارداری .
- در نوزادان .
- **هیپوکلسمی کاذب** (به علل : هیپوآلبومینمی ، رقت خون ، افزایش سدیم) .
- افزایش pH (آلکالوز) باعث کاهش کلسیم یونیزه و افزایش اتصال آن به پروتئین می‌گردد .

روشهای سنجش کلسیم (تام و یونیزه) :

به طور کلی این روشها را می‌توان به چند گروه تقسیم‌بندی نمود :

- روشهای تیتراسیون اکسایش – کاهش .
- روشهای رنگ سنجی .
- اسپکتروفتومتری جذب اتمی یا AAS (Atomic Absorption Spectrophotometry) .
- استفاده از الکترودهای انتخابگر یون یا ISE (Ion Selective Electrode) .
- استفاده از تترامتیل مورکساید (Tetra methyl murrexide) جهت سنجش کلسیم یونیزه .

روش تیتراسیون کلارک – کالیپ : در این روش ابتدا با افزودن آنیون اگزالات ، اگزالات کلسیم به صورت رسوب (با توجه به غلظت کلسیم در نمونه) ظاهر می‌گردد . پس از جداسازی آن و اسیدی کردن نمونه، اسیداگزالیک از Ca^{2+} آزاد می‌گردد. تیتراسیون اسید اگزالیک با پرمنگنات پتاسیم منجر به بیرنگ شدن آن می‌گردد (MnO_4^- به Mn^{2+} تبدیل می‌گردد) .

روش دیل – الینگبو : در این روش از معرف فلوئورسان کالسئین(Calcein) استفاده می‌گردد.

روش اورتوکروزول فتالئین (کمپلکسومتری) :

در این روش از معرف اورتوکرزول فتالئین استفاده می‌گردد . این روش مبتنی بر تشکیل کمپلکس رنگی بین معرف و کلسیم می‌باشد واکنش در محیط قلیایی صورت می‌گیرد و میزان جذب محلول رنگی (بنفش) به روش اسپکتوفتومتری(570 nm) مورد سنجش قرار می‌گیرد . برای حذف تداخل مربوط به بعضی از عناصر یا یونها دیگر (مانند منیزیم) از ترکیبی به نام 8-هیدروکسی‌کینولین استفاده می‌گردد. می‌توان به جای اورتوکرزول فتالئین از معرف‌های دیگری مانند : آلیزارین و آرسنازوIII استفاده نمود که در این صورت تداخل منیزیم در این روشها وجود ندارد . روشهای کمپلکسومتری از رایجترین روشهای اتوماتیک محسوب می‌گردند .

اندازه‌گیری کلسیم آزاد (یونیزه) :

برقرار بودن تعادل میان کلسیم یونیزه و کلسیم متصل به پروتئین موجود در سرم (در تمام مراحل آزمایش) شرط لازم جهت اندازه‌گیری Ca^{2+} (کلسیم یونیزه) می‌باشد . از الکترودهای اختصاصی یا انتخابگر یون ISE (Ion Selective Electrode) و یا از ترکیباتی مانند ترامتیل مورکساید (Tetra methyle murrexide) می‌توان استفاده نمود.

محاسبه کلسیم آزاد (یونیزه) :

بعضی از متخصصین بیوشیمی میزان کلسیم آزاد (یونیزه) سرم را برابر کلسیم مایع نخاع می‌دانند (4/2-5/5 mg/dl) و معتقدند که تنها کلسیم یونیزه می‌تواند وارد نخاع گردد . با این حال میزان کلسیم آزاد (یونیزه) را می‌توان با داشتن میزان پروتئین تام سرم (بر حسب g/dl) و کلسیم تام سرم(بر حسب mg/dl) از رابطه زیر محاسبه کرد :

$$\text{میزان کلسیم یونیزه} = \frac{\text{کلسیم تام سرم} - \frac{\text{پروتئین تام سرم}}{۳} \times ۶}{\text{پروتئین تام سرم} + ۶}$$

روش اسپکتروفتومتری جذب اتمی یا AAS (Atomic Absorption Spectrophotometry) :

از مهمترین روشهای اندازه‌گیری کلسیم محسوب می‌گردد (**روش مرجع**) که برای سنجش کلسیم تام مورد استفاده قرار می‌گیرد. (در بخش جداگانه‌ای مورد بحث قرارگرفته است).

نکات مورد توجه در اندازه‌گیری کلسیم:

1- استفاده از سرم و خون کامل بلامانع است .

2- از پلاسما نباید استفاده نمود ، زیرا باعث کاهش Ca^{2+} یونیزه می‌گردد (از پلاسمای هپارینه و ناشتا می‌توان استفاده نمود) .

3- بستن طولانی مدت تورنیکه باعث افزایش کلسیم تام می‌گردد (به علت تغلیظ خون Hemoconcentration) .

4- افزایش pH باعث کاهش کلسیم یونیزه می‌گردد (و بالعکس) .

5- وضعیت درازکش یا خوابیده باعث کاهش کلسیم تام می‌گردد (در خوابیدن طولانی مدت به علت افزایش انتقال کلسیم از استخوان به جریان خون افزایش Ca یونیزه و تام دیده می‌شود) .

فسفات:

فسفر به اشکال فسفات غیرآلی و آلی در بدن حضور داشته و بطور وسیعی در بدن توزیع شده است و یکی از عناصر بسیار مهم به شمار می‌آید . در بدن بالغین در حدود 600 گرم فسفر وجود دارد که در حدود 85 درصد آن بصورت ترکیبات هیدروکسی‌آپاتیت در استخوانها موجود می‌باشد . باقیمانده فسفر بیشتر به صورت متصل با چربیها ، پروتئینها ، کربوهیدراتها و سایر مواد آلی است که در قالب فسفولیپید ، اسیدهای نوکلئیک ، نوکلئوتیدها ، اجزای غشا و سیتوپلاسم سلولی و بالاخره ترکیبات مهم در ذخیره‌سازی و تبادل انرژی ، نقش حیاتی دارند . پلاسما تقریباً حاوی 2/5-4/5 mg فسفات معدنی می‌باشد که به دو شکل آنیونی منووالان ($H_2PO_4^-$) و دی‌والان (HPO_4^{2-}) وجود دارد .

تقریباً 10% از فسفات سرم به پروتئین‌ها متصل می‌باشد . 35% آن به صورت کمپلکس با Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} می‌باشد و باقیمانده (55%) آن به شکل آزاد وجود دارد . استرهای فسفات آلی عمدتاً در درون عناصر سلولی خون وجود دارند . فسفات غیرآلی (معدنی) از اجزاء اصلی ترکیب هیدروکسی آپاتیت در استخوان می‌باشد ، بنابراین نقش مهمی در ساختار اسکلت بدن بازی می‌کند و همچنین فسفات را برای بخشهای داخل و خارج سلولی تأمین می‌نماید ، فسفات همچنین دارای اعمال دیگری در سلولها می‌باشد . برای مثال نقش مهمی در تشکیل پیوندهای پر انرژی (ATP و ...) دارد نیز نقش در ساختارهایی مانند cGMP, cAMP, NADP و ... دارد .

توزیع نسبی فسفر در بدن	
بافت	توزیع نسبی (٪)
اسکلتی	۸۵
بافتهای نرم	۱۵
مایعات خارج سلولی	کمتر از ۰/۱
کل (Total)	۶۰۰ gr

فسفات همچنین از عناصر ضروری در ساختار فسفولیپیدها ، اسیدهای نوکلئیک و فسفوپروتئین‌ها و نیز در رونویسی ژن و رشد سلولی مورد نیاز می‌باشد . فسفات برای فعالیت بسیاری از سیستم‌های آنزیمی ضروری می‌باشد .

مصرف روزانه در بالغین به طور متوسط 1000-800 میلی‌گرم در روز است . فسفر به وفور در مواد غذایی و به ویژه در شیر و مشتقات آن یافت می‌گردد و بخش عمده‌ای از آن با پدیده فعال وابسته به انرژی ، از روده باریک جذب بدن می‌گردد . هورمون رشد و ویتامین D و نیز رژیم کم‌کلسیم ، سبب تسهیل جذب آن شده و هورمون پاراتیروئید نیز بطور مستقیم (احتمالاً به واسطه ویتامین D) در جذب آن مؤثر است . دفع فسفر به طور طبیعی ، اکثراً از طریق ادرار صورت می‌گیرد که بیشتر آن از گلومرولها فیلتر شده و بخش اعظم آن از لوله‌های ادراری باز جذب می‌گردد . هورمون پاراتیروئید اثر وقفه‌ای بر باز جذب آن دارد .

هموستاز فسفر نیز همانند کلسیم تحت تأثیر روده باریک و کلیه‌ها صورت گرفته و استخوان نقش ویژه‌ای را در آن به عنوان منبع ذخیره‌ای این می‌نماید . همچنین صرف غذا به میزان قابل توجهی غلظت فسفر سرم را تغییر می‌دهد . مصرف غذاهای غنی از فسفات ، غلظت فسفر سرم را افزایش می‌دهد در حالی که مصرف غذاهای سرشار از کربوهیدرات سبب کاهش قابل توجه در غلظت آن می‌شود. در بالغین ، طی دوران قاعدگی مقدار فسفر کمتر از حالت نرمال است.

هیپرفسفاتمی Hyperphosphatemia (افزایش فسفر سرم) :

الف- کاهش دفع کلیوی فسفات :

کاهش میزان فیلتراسیون کلومرولی

- نارسایی حاد و مزمن کلیوی

افزایش بازجذب توبولی

- هیپوپاراتیروئیدیسم
- هیپوپاراتیروئیدیسم کاذب
- آکرومگالی

ب- افزایش دریافت فسفات :

1. **دریافت خوراکی یا وریدی**
2. **ترکیبات دارویی حاوی فسفات**

ج- افزایش بار فسفات خارج سلولی :

لیز (تخریب) سلولها :

- رابدومیولیز (تجزیه رشته‌های عضلانی مخطط همراه با ترشح میوگلوبین در ادرار)
- همولیز داخل عروقی
- درمان با داروهای کشنده (تخریب‌کننده) سلولی (Cytotoxic therapy)
- لوکمیا یا لوسمی
- لنفوم

شیفت سلولی (Transcellular shift) :

- اسیدوز لاکتیک
- اسیدوز تنفسی
- کتواسیدوز دیابتی

د- بیماریهای استخوان :

- ترمیم شکستگی‌ها
- ضایعات متاستاتیک استخوان
- مالتیپل میلوما (به علت ایجاد فاکتور فعال‌کننده استئوکلاست)
- بیماری پاژه

هیپوفسفاتمی Hypophosphatemia (کاهش فسفات سرم) :

الف- دفع کلیوی فسفات :

1. **هیپرپاراتیروئیدیسم اولیه و ثانویه**
2. **نقص‌های توبول کلیوی**

- هیپوفسفاتمی خانوادگی
- سندرم فانکونی

ب- کاهش جذب روده‌ای فسفات :

1. **افزایش اتلاف فسفات**

- استفراغ (Vomiting)

- اسهال (Diarrehea)
- آنتی‌اسیدهای متصل شونده به فسفات

2. کاهش جذب :

- سندرم سوء جذب
- کمبود ویتامین D

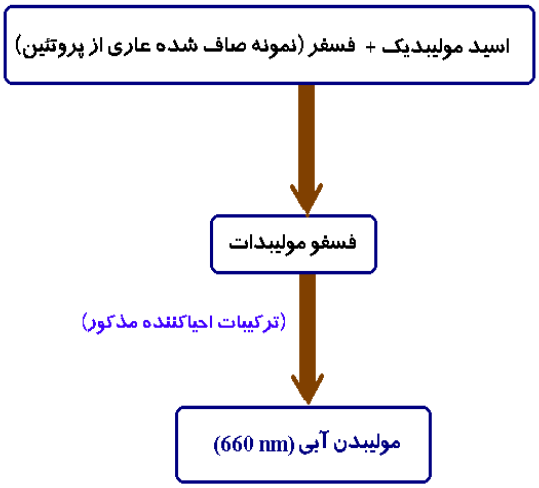
ج - شیفت به درون سلول :

- گلوکز به صورت خوراکی یا داخل وریدی – مصرف زیاد
- انسولین
- آلکالوز تنفسی

اندازه‌گیری فسفر :

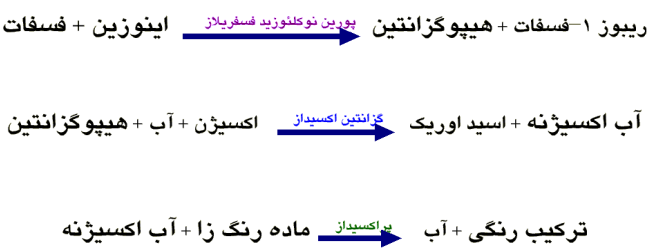
مبنای بسیاری از روشهای اندازه‌گیری فسفر ، ترکیب شدن معرفی به نام مولیبدات با فسفات (تحت شرایط بهینه) و تولید ترکیبات مختلفی از جمله **فسفومولیبدات آمونیوم** $(NH_4)_3[PO_4(MoO_3)_{12}]$ می‌باشد ، که می‌توان مقدار ان را مستقیماً در طول موج 340 nm (به عنوان روش اتوماتیک) اندازه‌گیری نمود که در این صورت برای افزایش حساسیت واکنش ، می‌توان فسفومولیبدات را به وسیله محلول گزیلن – ایزوبوتانل استخراج نموده و سپس در 310 nm سنجش را انجام داد .

روشی دیگر (که مبنای آن مشابه روش قبل می‌باشد) ، فسفومولیبدات ایجاد شده را تحت تأثیر احیاءکننده‌های مختلف دیگر مانند: کلرید قلع ، پاراآمینونفتل سولفونیک اسید (ANSA) ، اسید آسکوربیک و یا سولفات آهن II قرار داده و **مولیبدن آبی** تشکیل شده را مورد سنجش قرار می‌دهند . جهت حذف پروتئین (به عنوان عامل تداخلگر) می‌توان از تری‌کلرواستیک اسید (TCA) استفاده نمود . در روشی که از **آهن II** و ترکیبی به نام **تیوره** استفاده می‌گردد ، حساسیت روش و نیز ثبات رنگ ایجاد در واکنش روبرو افزایش یافته و می‌توان در محدوده وسیعی از غلظت‌ها سنجش را انجام داد (تبعیت از قانون بیر - لامبرت در محدوده وسیعی از غلظت‌ها) .



استفاده از مالاشیت تری فنیل متان سبز مبنای روشی دیگر است که در آن ، این ترکیب با فسفومولیبدات تشکیل شده در مرحله قبل (مطابق آنچه قبلاً گفته شد) تشکیل کمپلکس رنگی می‌نماید که به عنوان یک روش بسیار حساس تلقی می‌گردد . اشکال این روش : اسیدیته بالای کمپلکس می‌باشد که باعث هیدرولیز فسفاتهای آلی می‌گردد و در نتیجه تداخل مثبت در واکنش‌ها ایجاد خواهد شد .

روش آنزیمی: در یکی از این روشها از آنزیمهای پورین نوکلئوزید فسفریلاز ، گزانتین اکسیداز و پراکسیداز جهت سنجش فسفات استفاده می‌گردد (شکل روبرو) . همانگونه که در شکل دیده می‌شود محصول نهایی ترکیبی رنگی می‌باشد که به



روش فتومتری قابل سنجش می‌باشد. در روش آنزیماتیک دیگر که در شکل زیر دیده می‌شود ، فسفر تحت تاثیر واکنشهای متوالی توسط آنزیمهای گلیکوژن فسفریلاز ، فسفوگلوکوموتاز و گلوکز 6-فسفات دهیدروژناز می‌گیرد . NADH تولید شده توسط روشهای فلوریمتری یا اسپکتروفتومتری سنجیده می‌شود . واکنش در pH خنثی صورت می‌گیرد . از اینرو می‌توان فسفر غیر آلی را در حضور فسفاتهای آلی ناپایدار اندازه‌گیری کرد.

گلوکز ۱– فسفات $\xrightarrow{\text{گلیکوژن فسفریلاز}}$ گلیکوژن + فسفات

گلوکز ۶– فسفات $\xrightarrow{\text{فسفوگلوکوموتاز}}$ گلوکز ۱– فسفات

۶- فسفوگلوکونات + $NADH,H^+$ $\xrightarrow{\text{گلوکز ۶– فسفات دهیدروژناز}}$ گلوکز ۶– فسفات + NAD

نمونه مورد نیاز و نکات مورد توجه در سنجش فسفات :

1. برای سنجش فسفات بهتر است از نمونه سرمی استفاده گردد ، هرچند می‌توان از پلاسمای هپارینه نیز استفاده نمود ولی در اینصورت سطح فسفات غیر آلی در حدود 0/2-0/3 mg/dl پایین‌تر از سرم است .
2. از ضد انعقادهایی مانند: سیترات ، اگزالات و EDTA نباید استفاده نمود ، زیرا در تشکیل کمپلکس فسفومولیبدات تداخل می‌نماید .
3. فسفات غیر آلی موجود در نمونه‌های خون تام (Whole blood) بسته به نوع نمونه ، دما و دیوراسیون نمونه ممکن است به مرور زمان افزایش یا کاهش یابد ، بنابراین بهتر است سرم یا پلاسما از اریتروسیتها جدا گردد .
4. از نمونه‌های همولیز شده نباید استفاده نمود به علت اینکه اریتروسیتها حاوی غلظتهای بالایی از استرهای فسفات آلی می‌باشد که می‌تواند هیدرولیز شده و به فسفات معدنی تبدیل گردند .
5. تداخل مربوط به نمونه‌های لیپمیک و ایکتریک (یرقانی) نیز مورد توجه می‌باشد .
6. به علت تغییرات روزانه (Diurnal) فسفات سرم ، نمونه‌های صبحگاهی و ناشتا پیشنهاد می‌گردد (مقدار فسفات سرم در هنگام بعد از ظهر و عصر بیشتر است) .
7. ظروف شیشه‌ای مورد استفاده باید بطور تمیز و صحیح شسته شود زیرا فسفات یکی از اجزای موجود در بعضی از دترژنتها می‌باشد .
8. در صورت نگهداری سرم در دمای $4\ ^oC$ تا چندین روز می‌توان از آن استفاده نمود و در صورت فریز کردن تا چند ماه قابل استفاده است .
9. در سنجش فسفات ادراری ، نمونه ادرار باید در یک محیط اسیدی جمع‌آوری گردد (استفاده از 30-20 میلی‌لیتر اسیدکلریدریک 6 مولار برای ادرار 24 ساعته) .

آهن ، ظرفیت اتصالی تام(TIBC) و روشهای ارزیابی
Iron &Total Iron Binding Capacity (TIBC)

علیرغم فراوان بودن آهن در محیط و در بدن (RBC) ، متابولیسم آن از بسیاری از جنبه‌ها مشابه با عناصر کمیاب(نادر) می‌باشد. با عناصر نادر (کمیاب) میبا شد. به طور طبیعی مقادیر بسیار کمی از آهن در اکثر سلولهای بدن، پلاسما یا در مایعات خارج سلولی دیگر وجود دارد و بدن به شدت از آن محافظت می‌نماید به طوری که کمتر از یک هزارم محتوای آهن بدن به طور روزانه از دست می‌رود . (مقدار کل آهن بدن 4 gr می‌باشد) .

عناصر (ترکیبات) واجد آهن در بدن:

بطور کلی آهن موجود در نواحی مختلف بدن به دو شکل ***آهن هم(Heme Iron)*** و ***آهن غیر هم(None heme Iron)*** وجود دارد . هموگلوبین ، میوگلوبین ، آنزیمهای تنفسی و ... از جمله منابع آهن همی هستند و فریتین ، هموسیدرین ، ترانسفرین(سیدروفیلین) و ... از جمله منابع آهن غیرهمی می‌باشند .

هموگلوبین (Hb) :

تقریبا 2/5 gr آهن در هموگلوبین میباشد. بطور طبیعی همه آهن هموگلوبین در درون RBC و یا در پیش سازهای آنها در مغز استخوان قرار دارد .

ترانسفرین (Tf):

آپوترانسفرین یک پروتئین انتقال دهنده پلاسمایی می‌باشد که عمل انتقال آهن از یک ارگان به ارگان دیگر را بر عهده دارد . نام دیگر آن سیدروفیلین است . این β_1-گلبولین (75 Kda) دارای 2 جایگاه اتصال به آهن در هر ملکول میباشد. هر کدام از این مکانها میتواند به یک یون Fe^{3+} و به همراه آن به یک یون HCO_3^- متصل میگردد. کمپلکس آپوترانسفرین-Fe^{3+} به نام ترانسفرین معروف است. به طور طبیعی تقریبا 2/5 mgr آهن در پلاسما وجود دارد. ترانسفرین همچنین در درون سیتوزول بسیاری از سلولها وجود داشته و ممکن است به عنوان یک ناقل داخل سلولی آهن عمل مینماید.

فریتین :

ترکیب اصلی ذخیره‌ای (ذخیره کننده) آهن میباشد. یک ملکول کروی میباشد. حاوی یک پوسته(Shell) و یک هسته کریستالی اکسی‌هیدروکسید آهن III $(FeOOH)_x$ میباشد. پوسته آپوفریتین مرکب از 24 زیر واحد یا منومر میباشد. 13 nm قطر دارد و حفره درونی در حدود 7 nm قطر دارد. همچنین دارای 6 حفره میباشد که ملکولهایی مانند Fe(II) ، اسید آسکوربیک و FMN میتوانند از آن عبور نمایند. لبه های پورها (حفره ها) به عنوان جایگاههای اتصال آنزیمی برای آهن عمل می‌نمایند، به طوریکه وقتی 2 یون Fe^{2+} به درون حفره وارد میگردند به Fe^{3+} اکسیده میگردند. کریستال مرکزی مبتواند حاوی تقریبا 4000 اتم آهن باشد اما معمولا 2000 و یا کمتر از 2000 اتم آهن در آن قرار میگیرد. آزاد شدن آهن از فریتین احتمالا غیر آنزیمی بوده و ممکن است با احیای آن به وسیله FMN یا ترکیبات احیاکننده دیگر صورت گیرد. Fe^{2+} حاصله کریستال را ترک نموده و از طریق سوراخ ها (حفره ها) ی پوسته فریتین به بیرون نفوذ مینماید. اکسیداسیون یا احیای آهن سریع اتفاق می افتد. بنابراین فریتین منبع قابل دسترس سریع آهن برای احتیاجات متابولیک مطرح میباشد. فریتین تقریبا در همه سلولهای بدن یافت میگردد. در هپاتوسیتهای کبد و در سیستم ماکروفاژی مغز استخوان و ارگانهای دیگر به عنوان منبع ذخیره-ای مهم آهن مطرح بوده و در تشکیل هموگلوبین و پروتئین های هم دار دیگر شرکت مینماید. مقادیر مشخصی از فریتین در سرم وجود دارد که غلظت آن متناسب با آهن ذخیره شده تام بدن میباشد. آسیب کبدی منتج به آزاد شدن مقادیر زیادی از فریتین به درون پلاسما میگردد.

هموسیدرین :

شکل دیگری از آهن ذخیره‌ای میباشد. در حقیقت ملکولی نسبتا ناشناخته میباشد و به نظر میرسد که حاصل تجزیه ناقص و دپروتئینه شدن و پلیمریزاسیون فریتین باشد. در مقایسه با فریتین ، هموسیدرین نامحلول در محلولهای آبی میباشد که کمک به تشخیص این دو ترکیب ذخیره ای آهن مینماید. آهن از هموسیدرین به آهستگی آزاد میگردد که احتمالا به این علت است که دارای اندازه بزرگتری میباشد و نسبت سطح به حجم بسیار کوچکتری میباشد. شبیه به فریتین، هموسیدرین هم به طور طبیعی غالبا در سلولهای کبد، طحال و مغز استخوان یافت می گردد.

آهن بافتی :

بسیاری از آنزیمها و کوآنزیمهای سلولی نیاز به آهن دارند یا به عنوان یک بخش ساختاری خود یا به عنوان یک کوفاکتور (در پراکسیدازها ، سیتوکرومها) و هم پروتئینها میباشند. تقریبا نیمی از آنزیمهای چرخه کربس نیاز به آهن دارند. این آنزیمها و کوآنزیمها که در همه سلولهای هسته‌دار بدن حضور دارند مجموعا به نام Tissue Iron Compartment معروف هستند. مقدار آهن بافتی به طور طبیعی تقریبا 8 mgr میباشد . آهن بافتی در طی کمبود آهن کاهش میابد.

میوگلوبین :

بسیار شبیه به یکی از زیر واحد های هموگلوبین میباشد. در مقایسه با هموگلوبین، میوگلوبین ترامری تشکیل نمی‌دهد و تحت تاثیر غلظت 2,3-DPG (3و2-دی فسفوگلیسرات) قرار نمیگیرد. میزان آهن موجود در میوگلوبین تقریبا 130 mgr میباشد.

ذخیره موقت(Labile) :

به طور طبیعی تقریبا 80 mgr آهن در حالت ذخیره ای موقت یافت میشود. این بخشها ، جایگاه آناتومیکی مشخصی ندارند.

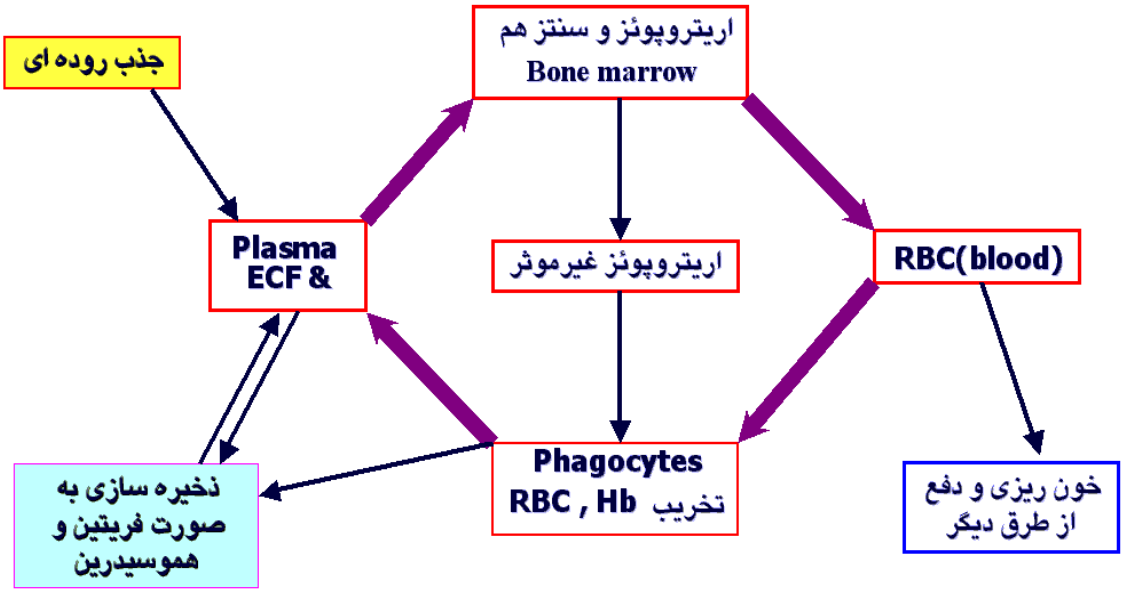
جذب ، انتقال ، دفع آهن (متابولیسم آهن):

آهن به طور طبیعی و تقریبا به میزان 1 mgr در روز جذب بدن میگردد. جذب آن عمدتا در دودنوم (دوازدهه) و اوایل ژوژنوم صورت میگیرد و هم (Heme) به همان صورت مستقیما جذب می‌گردد ولی آهن غیر آلی برای جذب باید در حالت فرو (Fe^{2+}) باشد ، و در این حالت به MIBP(Membrane Iron Binding Protein) در غشای آنتروسیت متصل شده و وارد آن می‌گردد. بنابراین عواملی که باعث احیای آهن فریک به فرو می‌گردند (اسیدیته محیط ، ویتامین C ، اسیدهای آمینه ، پروتئینها و ...) افزایش دهنده جذب آهن و عواملی که ممانعت از احیای آهن فریک به فرو می‌گردند (کاهش اسیدیته معده ، مصرف سایمتیدین و ...) و همچنین کلسیم Ca^{2+} و عوامل دیگری مانند تانات(در چای) ، فیتاتها ، فیبرهای گیاهی ، اگزالات ، فسفات ، براشته شدن معده یا دودنوم (با جراحی) ، بیماری سلیاک (نوعی بیماری سوءجذب دهنده) و ... کاهش دهنده جذب آهن می‌باشند .

هم فریتین و هم ترانسفرین در سلولهای جذبی مخاط روده وجود دارند و عقیده بر این است که هر دوی این ها جذب آهن را تنظیم مینمایند. هنگامی که ذخایر آهن بدن بالاست محتوای فریتین اپی‌تلیوم مخاطی نیز بالا بوده و محتوای ترانسفرین پائین میباشد. آهنی که وارد سلولهای مخاطی میگردد بوسیله فریتین به دام می‌افتد و هنگامی که سلولهای موکوزای روده به درون لومن روده ریزش می‌نماید از دست میرود. این مکانیسم جذب آهن را کاهش می‌دهد، هنگامی که ذخایر آهن بدن افزایش یابد به طور معکوس با کاهش آهن، میزان آپوفریتین سلول مخاطی کاهش می‌یابد، ترانسفرین (و آپوترانسفرین) افزایش میابد و بدین وسیله جذب آهن افزایش می‌یابد. مسیر اصلی متابولیسم آهن یک سیکل(چرخه) بسته‌ای است که در آن ، آهن از طریق ترانسفرین پلاسمایی به پیش‌سازهای RBC در مغز استخوان می‌رسد که در آنجا به درون Hb ملحق میگردد، این سلولها سپس به صورت RBC بالغ وارد جریان خون میگردد که تقریبا به مدت 4 ماه در آنجا باقی می-ماند قبل از اینکه به وسیله فاگوسیتها برداشت شده، آهن از هموگلوبین آزاد شود و به ترانسفرین پلاسمایی برگردد، بنابراین به این شکل یک سیکل کامل شده و سیکل دیگر آغاز میگردد. از این چرخه، مقادیر کمی از آهن نیز به مصرف تشکیل اجزای آهن دار دیگر میگردد و یک

معاوضه(تبادل) مداوم بین اجزای ذخیره ای و انتقالی اتفاق می افتد. هر روز درحدود 1-2 mg از آهن جذب شده از دستگاه روده ای وارد این چرخه میگردد و آهنی را که هر روز (1-2 mg) از بدن دفع میگردد را جبران می‌نماید . اغلب آهنی را که از دست می رود ناشی از مقادیر بسیار مشخصی از آهن موجود در سلولهای اپی‌تلیال و RBC های موجود در ادرار و مدفوع میباشد. با هر چرخه (سیکل) قاعدگی تقریبا 40-80 میلی‌لیتر خون از دست می رود که معادل 20-40 mg آهن میباشد که باید از طریق جذب روده ای جبران گردد ، در حدود 600-900 mg از آهن نیز در طی حاملگی از دست می رود.

میزان آهن همانند Hb در مردان بیش از زنان می‌باشد و بویژه این تفاوت با رسیدن به سن بلوغ شروع می‌شود و در یائسگی از بین می-رود. آندروژنها آهن پلاسما را افزایش و استروژنها آن را کاهش می‌دهند.



ناهنجاری های متابولیسم آهن :

کمبود آهن(Iron deficiency) :

کمبود آهن یکی از شایعترین ناهنجاری هایی است که در انسان ها اتفاق می افتد. به ویژه در بچه ها و زنان جوان و اشخاص پیرتر. اما به هر حال در همه سنین و در همه طبقات اجتماعی دیده می‌شود . در بچه ها بیشتر به علت کمبود تغذیه ای می باشد به علت اینکه شیر حاوی آهن کمی می باشد. در بالغین تقریبا همیشه به علت از دست رفتن مزمن خون است. اندازه‌گیری غلظت Fe سرم و TIBC در تشخیص آن مورد استفاده قرار می‌گیرند، هر چند ارزیابی غلظت فریتین سرم یک تست حساستر و معتبرتر برای تشخیص این ناهنجاری می باشد. پروتوپورفیرین اریتروسیتی آزاد(FEP) در بیماران با کمبود آهن یا در مسمومیت با سرب افزایش میابد در حالی که در تالاسمی مینور میزان FEP طبیعی میباشد. (تالاسمی مینور دارای شرایطی است که اغلب با کمبود آهن اشتباه گرفته میشود) متد رایج برای تشخیص کمبود آهن ، رنگ آمیزی سیتوشیمیایی آسپیره‌ای از مغز استخوان می‌باشد که بوسیله واکنش آپی پروسی Prussian blue (پتاسیم فروسیانید) انجام میگیرد که نشان دهنده حضور یا عدم حضور هموسیدرین می باشد .

افزایش آهن(Iron overload):

هموسیدروز اصطلاحی است که بیشتر اشاره به افزایش آهن بدون آسیب بافتی مرتبط می‌باشد در حالی که **هموکروماتوز** اصطلاحی است که اشاره به overload آهن همراه با آسیب به ارگان‌های درگیر دارد که در آن دژنره شدن سلولی و فیبروز مشاهده میگردد. افزایش بارآهن اغلب منتج از جذب مزمن و اضافی آهن از یک رژیم غذایی طبیعی می باشد. هموکروماتوز به دو شکل اولیه و ثانویه وجود. در این بیماریا افزایش آهن کل بدن در حدی است که باعث آسیب بافتی می‌گردد. هموکروماتوز اولیه ناشی از نقص ژنتیکی در جذب آهن می باشد. مکانیسم دقیق آن نا شناخته است، ولی گفته میشود که بیان ژن MIBP افزایش یافته و به دنبال آن ، جذب آهن از روده تا حدود زیادی افزایش می‌یابد و ممکن است باعث ایجاد **دیابت‌ملیتوس** ، **آرتریت** ، **آریتمی‌قلبی** یا **نارسایی‌قلبی** ، **سیروز کبدی** ، **هیپوتیروئیدیسم** ، **سرطان کبد** یا **هیپرپیگمانتاسیون** گردد . اعتقاد بر این است که این انباشت آهن نقش مهمی در آسیب بافتی دارد که شاید تا حدودی ناشی از اثرات آن بر تولید *ریشه‌های آزاد (رادیکالهای آزاد)* باشد . **ملانین** و مقادیری از آهن در پوست انباشته میشوند و عامل ایجاد رنگ خاکستری آن هستند که اغلب در ایجاد بیماری دیده میشود. همزمانی شایع دیابت قندی (بر اثر آسیب جزایر لانگرهانس لوزالمعده) و پیگمانتاسیون پوست در هموکروماتوز اولیه باعث شده آن را **دیابت برنزه** بنامند. تشخیص اولیه هموکروماتوز مهم می باشد زیرا افرادیکه درمان نگردند اغلب می میرند. برای درمان در هر هفته یک یا دو بار خون‌گیری(500 ml خون) باید صورت گیرد که باعث خروج حدودا 250 mg آهن (به ازای هر 500 ml خون) از بدن فرد بیمار می‌گردد که مجموعا به طور تقریبی حدود 50 لیترخون باید برداشت گردد. استفاده از دسفریوکسامین(Desferioxamine) یا Desferal باعث شلاته کردن Fe و دفع آن از طریق ادرار می‌گردد.

هموکروماتوز ثانویه بیشتر بر اثر تزریق زیاد خون(ترانسفوریون مکرر) و دریافت زیاد آهن از طریق غذا (به ویژه در مناطقی از آفریقا که آبجو را در ظروف آهنی تهیه می نمایند) ایجاد می گردد و همچنین رسوب آهن در سلول های پارانشیم کبد و سیستم رتیکولوآندوتلیال باعث اسکوروی(Scurvy) و استئوپورز می‌گردد.

آنمی سیدروبلاستیک :

به گروهی از ناهنجاری‌های با علل ناشناخته اطلاق میگردد که در آن لود(افزایش بار آهن) دیده میشود. در یک نوع ارثی از این ناهنجاری، نقص در سنتز *Δ-ALA سنتاز* در پیش‌سازهای RBC دیده می‌شود ، همچنین ممکن است علت آن مسمومیت با سرب باشد . در نتیجه چنین نقصی، آهن در میتوکندری تجمع می‌یابد.

اثبات ناهنجاریهای مرتبط با آهن و به ویژه افزایش بار آهن با اندازه‌گیری غلظت Fe سرم و TIBC صورت می گیرد . بسته به متد مورد استفاده غلظت آهن سرم معمولا بیشتر از 150 µgr/dl در افراد با اورلود آهن میباشد. معمولا اشباع ترانسفرین متجاوز از 60% نشانگر افزایش بار آهن می باشد. در حالات پیشرفته تر، میزان اشباع ترانسفرین اغلب به 90% نیز می رسد. در مقایسه با اندازه‌گیری اشباع ترانسفرین، ارزیابی فریتین سرم، برای اثبات (تشخیص زود هنگام) افزایش بار آهن(Overload) حساس نمی باشد و همچنین تست FEP هیچ نقشی در تشخیص آن ندارد.

اندازه گیری Fe ، TIBC و اشباع ترانسفرین

اهمیت بالینی : غلظت آهن سرم در واقع آهن(III) باند شده به ترانسفرین سرم بوده و شامل آهن موجود در Hb آزاد سرم نمی‌گردد . غلظت آن در موارد زیر تغییر می نماید :

علل عمده افزایش آهن سرم :

- افزایش تخریب یا همولیز
- افزایش رها سازی آهن و یا فریتین از بافتهای بدن ، نکروز حاد کبد و ... .
- کاهش تولید Hb ; مسمومیت با سرب ، کمبود پیردوکسین و ... .
- اریتروپوئز غیرموثر(Ineffective erythropoesis) .
- افزایش جذب آهن(Iron overload) : هموکروماتوز و هموسیدروز(ترانسفوریون مکرر) .
- مصرف ضد حاملگی های (پروژسترونی).
- آلودگی سرنگ یا ظرف نمونه به آهن .

علل عمده کاهش آهن سرم :

- کاهش عمومی آهن مثلا در سندرم سوء جذب و سوء تغذیه .
- رژیمهای گیاهی که بخوبی تنظیم نشده باشند .
- میکروهموراژ (در ورزشکاران) .
- افزایش دفع آهن به علل خونریزی مزمن و مکرر.
- کواشیورکور .
- نفروز (سندرم نفروتیک) .
- اختلال در رها سازی آهن از سیستم رتیکولواندوتلیال; عفونت و اختلالات التهابی مزمن (آرتریت روماتوئید و بد خیمی ها).

به علت اینکه در حالت طبیعی تنها **یک‌سوم** مکانهای قابل اتصال به آهن در ترانسفرین به وسیله Fe(III) اشغال شده است، بنابراین ظرفیت ترانسفرین در اتصال به آهن مورد توجه قرار میگیرد. به همین خاطر به آن Serum Unsaturated Iron Binding Capacity (UIBC) گفته میشود. TIBC به ماکزیمم غلظت آهن که می‌تواند به پروتئین‌های سرم به ویژه ترانسفرین متصل گردد گفته می‌شود. مقدار TIBC در ناهنجاریهای متابولیسم آهن تغییر می‌نماید.

علل عمده افزایش ترانسفرین (TIBC) عبارتند از :

- کم خونی فقر آهن که با کاهش نسبت اشباع ترانسفرین (کمتر از 15%) همراه است.
- مصرف قرص های ضد حاملگی و اواخر دوران بارداری.
- هپاتیت ویروسی .

علل عمده کاهش ترانسفرین (TIBC) :

- اتلاف یاکاهش سنتز پروتئین ها نفروز و بیماری های مزمن کبد و گرسنگی ممتد و کواشیورکور .
- کاهش سنتز پروتئین ها همراه با افزایش کاتابولیسم آن، مثلا در بد خیمی ها.
- بیماریهای عفونی و التهابی مزمن .
- افزایش آهن سرم به علل مسمومیت و ترانسفوزیون مکرر.
- تالاسمی ماژور و هموکروماتوز.

کاهش اشباع ترانسفرین(کاهش نسبت آهن به TIBC) در کم خونی فقر آهن و اواخر دوران بارداری و **افزایش اشباع ترانسفرین** در مواردی مانند کواشیورکور، نفروز و بیماری های مزمن کبد، اریتروپوئز ناقص، وقفه در سنتز Hb (تالاسمی و . . .) ، افزایش بیش از حد آهن دیده می شود.

فریتین Ferritin

در خون در غلظت های بسیار کم وجود دارد. به طور طبیعی **یک درصد** آهن پلاسما در فریتین قرار دارد. فریتین پلاسما در تعادل با ذخایر آهن بدن می باشد و تغییرات مقدار آهن در بخش های ذخیره‌ای در غلظت فریتین پلاسما منعکس می‌گردد. در واقع فریتین شاخص مناسبی جهت ارزیابی کمبود کلی آهن محسوب می‌گردد، **به شرطی که** بیماری‌های دیگری که تغییر دهنده میزان فریتین می‌باشد به موازات کمبود آهن وجود نداشته باشد. به علت اینکه در تعداد زیادی از بیماریهای مزمن، غلظت فریتین افزایش می‌یابد. مانند بیماری های مزمن التهابی و تومورهای بدخیم و نیز در عفونت و هپاتیت ویروسی. که به رغم کاهش ذخایر آهن بدن مقادیر فریتین طبیعی و یا بالا می باشد (همچنین در هموسیدروز و هموکروماتوز).

اساس اندازه‌گیری آهن و TIBC :

با کاهش pH سرم (با افزودن اسید کلریدریک) آهن از ترانسفرین آزاد می‌گردد و با استفاده از اسید تری‌کلرو استیک(TCA) ، پروتئینهای آن را رسوب می‌دهند . از آنجایی که معرفهای مورد نظر با آهن دو ظرفیتی واکنش می‌دهند ، از مواد احیاکننده نظیر اسید آسکوربیک جهت تبدیل Fe^{3+} به Fe^{2+} استفاده می‌گردد ، در مرحله بعد پس از سانتریفوژ کردن ، **آهن فرو**ی موجود در مایع رویی با کروموژنی که حاوی گروه واکنشگر **-N=C-C=N-** می‌باشد، کمپلکس تشکیل می‌دهد (این ترکیبات دارای ساختاری مشابه با EDTA می‌باشند). کاتیونهای فلزی قادرند در بین دو نیتروژن شلاته گردند. کمپلکس تشکیل شده بین *آهن-کروموژن* دارای *جذب بسیار بالا یی* میباشد و میزان جذب متناسب با غلظت آهن در نمونه میباشد . معمولا از کروموژنهایی مانند: **تیروزیت(Tyrosite)** ، **باتوفنانترولین(Bathophenanthroline)** و **فروزین(ferrozine) و تریازین** استفاده می‌گردد . این روش بعلت دقت و حساسیت ، به عنوان روش مرجع (رفرانس) کاربرد دارد . در متدهایی که یک مرحله دپروتئینه کردن نیز انجام می‌گیرد نتایج حاصل از آنها بیشتر از مقادیری است که بدون دپروتئینه کردن سرم حاصل شده است .

نکـته مهـم : برای ساختن معرفها از آب مقطر دیونیزه (بدون یون) باید استفاده نمود و از طرفی معرفهای مصرفی نیز باید عاری از آهن باشند . شیشه‌آلات ، لوازم پلاستیکی و پیپت‌ها باید در محلول اسید نیتریک رقیق (4:1) به مدت چند ساعت قرار داده شوند و بعد با آب مقطر خالص شستشو شوند. استفاده از ظروف و وسایل یکبار مصرف پیشنهاد می‌گردد.

از روشهای دیگر مانند اسپکتروفتومتری جذب اتمی (AAS) و اسپکتروفتومتری نشری و اسپکتروفتومتری فلورسانس با اشعه X نیز میزان آهن مورد سنجش قرار می‌گیرد .

TIBC : با افزودن Fe^{3+} ، برای اشباع نمودن مکانهای اتصالی ترانسفرین، می‌توان میزان TIBC را بدست آورد . با افزودن کربنات منیزیم ($MgCO_3$) ، مازاد Fe^{3+} موجود در محیط حذف می‌گردد و سپس با ارزیابی میزان آهن به روشی که گفته شد مقدار TIBC بدست می آید . برای محاسبه **درصد اشباع ترانسفرین** از رابطه زیر استفاده می نماییم :

$$\text{اشباع ترانسفرین (\%)} = \frac{\text{آهن سرم}}{\text{TIBC}} \times ۱۰۰$$

از روشهای مستقیم سنجش ترانسفرین به روشهای ایمونو اسی آنزیمی (EIA) ، با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال می‌توان اشاره نمود . از امتیازات آن نیاز به مقادیر کم نمونه و عدم حساسیت به آلودگی‌های آهنی است .

برای محاسبه غلظت ترانسفرین می‌توان از رابطه زیر نیز استفاده نمود (میزان TIBC بر حسب µgr/dl) :

$$\text{ترانسفرین سرم}\,(gr/L) = ۰/۰۷ \times \text{TIBC}$$

گرچه این ارتباط کاملا خطی نیست به علت اینکه مقداری از آهن ممکن است به پروتئین های دیگر در سرم متصل گردیده باشد . بنابراین مقدار TIBC محاسبه شده کمی بیشتر از مقدار آهن باندشده به ترانسفرین می‌باشد . به روشهایی مانند روش IRMA (ایمونورادیومتریک‌اسی) و ELISA فریتین را می توان اندازه گیری نمود .

نمـونه مـورد نیاز :

نمونه ترجیحا سرمی و غیر همولیز باشد . نمونه‌های پلاسمایی تهیه شده با EDTA ، اگزالات یا سیترات نامناسب می‌باشد ، بعلت اینکه به آهن متصل شده و از واکنش آن با کروموژن ممانعت می‌نماید .

تـوجـه : در طی روز تغییرات قابل ملاحظه ای در میزان Fe سرم مشاهده می‌شود و بیشترین مقدار آن به هنگام صبح است. لذا ***نمونه اول صبح ناشتا جهت اندازه گیری آهن سرم ارجح است .***

❋ ❋ ❋

مقادیر نرمال آهن سرم :

برای مردان: 65 - 175 µgr/dl

برای زنان: 50 - 170 µgr/dl

هنگام تولد: 100 - 250 µgr/dl

مقادیر نرمال درصد اشباع آهن :

برای مردان: %20 – 50

برای زنان: %15 – 50

میزان نرمال TIBC :

برای نوزادان : 100 - 400 µgr/dl

برای بالغین 250 - 425 µgr/dl

میزان نرمال ترانسفرین سرم :

در بالغین: 2/15 – 3/8 gr/L

میزان نرمال فریتین سرم :

برای مردان: 20 - 250 µgr/L

برای زنان: 10 - 120 µgr/L

هنگام تولد: 25 – 200 µgr/L

مایعات بدن (Body Fluids)

مایع مغزی-نخاعی CSF یا (Cerebrospinal fluid):

مایع مغزی-نخاعی(CSF) یک سیستم فیزیولوژیکی جهت تامین مواد غذایی برای بافت عصبی, حرکت مواد زاید حاصل از سوخت و ساز بوده و ایجاد یک سد مکانیکی برای حمایت مغز و طناب نخاعی از ضربه می‌نماید.

CSF را بطور معمول با انجام با پونکسیون مایع نخاع (Lumbar puncture) بین مهره‌های سوم و چهارم یا پنجم کمری جمع-آوری می‌نمایند. معمولا نمونه را در سه لوله استریل جمع‌آوری می‌نمایند:

1. **لوله شماره 1 برای آزمایشات بیوشیمیایی و سرولوژیکی (این لوله را باید** فریز **کرد)**
2. **لوله شماره 2 برای آزمایشات میکروب‌شناسی (این لوله را باید** در حرارت اتاق **نگهداری نمود, زیرا ارگانیسمهایی مانند** هموفیلوس آنفلوانزا **و** نایسریا منتژیتیدیس **در این وضعیت زنده نمی‌مانند)**
3. **لوله شماره 3 برای آزمایشات شمارش سلولی بکار می‌رود زیرا احتمال کمی وجود دارد که سلولهای حاصل از پونکسیون مایع نخاعی وارد لوله شماره 3 گردند. (این لوله را باید در** یخچال **گذاشت)**

نکته 1: بطور طبیعی می‌توان تا 20 میلی‌لیتر از مایع نخاعی را خارج کرد.

نکته 2: چون پارامترهای سیتولوژیک (سلولی) و شیمیایی در محلهای نمونه‌گیری مختلف متفاوت هستند بنابراین محل نمونه‌گیری (مانند: کمری, پونکسیون جانبی گردن یا شنتهای بطنی) نیز باید ذکر گردد.

نکته 3: لزوم اندازه‌گیری قند خون همزمان باید مورد توجه قرار گیرد. به علت تاخیری که در تعادل سرم- CSF وجود دارد, این کار بهتر است 2 تا 4 ساعت قبل از پونکسیون کمری صورت گیرد.

نکته4: باید از بکار بردن لوله‌های شیشه‌ای اجتناب شود, زیرا چسبندگی سلول, شمارش سلولی و افتراقی را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

برای به حداقل رساندن تخریب سلولی که یک ساعت پس از نمونه‌گیری شروع می‌گردد نمونه‌ها باید هرچه سریعتر توسط آزمایشگاه مورد آزمایش قرار گیرند.

از آنجاییکه CSF از پالایش پلاسما تشکیل می‌گردد بعضی احتمال می‌دهند که همان مواد شیمیایی که در CSF یافت می‌شود در پلاسما نیز موجود می‌باشد. این مطلب اساسا درست است ولی چون روند پالایش, انتخابی بوده و ترکیب شیمیایی نیز بوسیله سد خونی-مغزی تنظیم می‌گردد, مقادیر طبیعی مواد شیمیایی در CSF همانند مقدار آنها در پلاسما نمی‌باشد.

مقادیر غیرطبیعی بعلت تغییرات در نفوذپذیری سد خونی-مغزی یا افزایش تولید یا سوخت و ساز سلولهای عصبی در پاسخ به حالات پاتولوژیک بوده و این تغییرات به ندرت ارزش تشخیصی مقادیر غیرطبیعی پلاسما را دارا می‌باشند. تعداد مواد شیمیایی CSF که از نظر بالینی مهم است نسبت به پلاسما کم است ولی در شرایط معینی ممکن است لازم شود تعداد بیشتری را اندازه‌گیری کنیم.

- ✓ برخی از مواد در CSF بدقت توسط سیستمهای انتقالی اختصاصی تعدیل می‌شوند (مانند: H^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} و بیکربنات)
- ✓ درحالیکه سایر مواد از قبیل گلوکز , اوره و کراتینین آزادانه انتشار می‌یابند اما چند ساعت طول می‌کشد تا به حالت تعادل برسند.
- ✓ پروتئینها از طریق انتقال غیرفعال انتشار می‌یابند و سرعت انتشار آنها نسبت مستقیم با شیب غلظتی CSF/پلاسما و نسبت عکس با وزن ملکولی‌شان دارد.

ظاهر مایع مغزی-نخاعی:

اصطلاحاتی که برای توصیف ظاهر CSF بکار می‌رود شامل موارد زیر است:

شفاف (Clear) , ابری یا کدر (Cloudy or Turbid) , شیری (Milky) , خونی (Bloody) , زردفام (Xantochrome) .

CSF طبیعی , مایعی شفاف و بیرنگ است و ویسکوزیته‌ای مانند آب دارد. علل ایجاد **کدورت CSF** شامل موارد زیر می‌باشد:

1. وجود لکوسیت (WBC) بیشتر از 200 سلول در میکرولیتر یا
2. وجود گلبول قرمز (RBC) بیشتر از 400 سلول در میکرولیتر
3. وجود میکروارگانیسمها (یی مانند: باکتری, قارچ , آمیب)
4. مواد حاجب رادیوگرافی
5. چربی آسپیره شده
6. افزایش پروتئین

توجه: تعداد سلولهای کمتر از 50 عدد در میکرولیتر را می‌توان با چشم غیر مسلح و از طریق بررسی **اثر تیندال** تشخیص داد. بدین طریق که با برخورد نور خورشید یا نور دیگر به لوله حاوی مایع CSF , نمای برفی و درخشنده‌ای آشکار می‌گردد که در حقیقت ذرات معلقی هستند که نور را پراکنده می‌کنند.

CSF صورتی‌رنگ معمولا نشانگر وجود خون است. هنگامیکه تعداد RBC از مرز 6000 سلول در میکرولیتر تجاوز کند, مایع آشکارا خونی می‌گردد که ممکن است از منشاء خونریزی زیر عنکبوتیه, خونریزی داخل مغزی, انفارکتوس یا پونکسیون تروماتیک باشد.

تشکیل لخته در پونکسیونهای تروماتیک, بلوک کامل نخاعی و منتژیت سلی و چرکی دیده می‌شود. پوسته‌هایی نازک در سطح ممکن است پس از قرار دادن در یخچال به مدت 12 تا 24 ساعت مشاهده شوند. لخته‌ها می‌توانند از طریق به دام انداختن سلولهای التهابی, در دقت شمارش سلولی اختلال ایجاد نمایند.

CSF چسبناک ممکن است در مواردی از قبیل آدنوکارسینومهای متاستازی تولیدکننده موسین و منتژیت کریپتوکوکی (بعلت پلی‌ساکارید کپسولی) دیده شود.

گزانتوکروم (Xantochrome) : CSF سانتریفوژ گردیده و مایع رویی با لوله‌ای که محتوی آب مقطر است مقایسه می‌شود. CSF گزانتوکرومی صورتی , پرتقالی یا زرد رنگ است که علت آن لیز RBC و تخریب هموگلوبین است. علل دیگر گزانتوکرومی قابل مشاهده در CSF :

بیلی‌روبین, پروتئین (بیشتر از 150 میلی‌گرم در دسی‌لیتر), مصرف کاروتنوئیدها, ملانین (قهوه‌ای) ناشی از ملانوم متاستازی مغزی, درمان با ریفامپین (قرمز پرتقالی).

نکته: اسپکتروفتومتری می‌تواند در تمایز رنگدانه‌های مشتق از هموگلوبین (مانند بیلی‌روبین) از سایر رنگدانه‌های گزانتوکروم که از نظر « نقاط جذب حداکثر» با هم تفاوت دارند کمک‌کننده باشد.

تشخیص افتراقی CSF خونی: تشخیص پونکسیون تروماتیک از خونریزی پاتولوژیک از اهمیت زیادی برخوردار است. خون آلود بودن مایع نخاع یا بواسطه جراحت نمونه‌برداری (پونکسیون تروماتیک) است یا بواسطه خونریزی مغزی. اگر جراحت وجود داشته باشد در لوله‌های دوم و سوم خون کمتر از لوله اول است. ثانیا در خونریزی به علت جراحت ممکن است لخته دیده شود که در خونریزی مغزی-نخاعی وجود ندارد.

شمارش سلولی:

شمارش روزمره که روی CSF انجام می‌شود شمارش لکوسیت است. شمارش RBC خون معمولا تنها زمانی صورت می‌گیرد که جراحت تروماتیک وجود داشته و برای لکوسیتها یا پروتئین وارده به نمونه لازم است عمل تصحیح انجام گیرد.

توجه: برای معتبر بودن نتایج, باید تمام سنجشها (RBC , WBC و پروتئین) در یک لوله انجام گیرد.

هرگونه شمارش سلولی را باید فورا انجام داد, زیرا گلبولهای سفید خون بخصوص گرانولوسیتها و نیز RBC ظرف یک ساعت شروع به لیز شدن خواهند کرد, بطوریکه پس از 2 ساعت 40 درصد از لکوسیتها متلاشی می‌شوند. نمونه‌هایی را که نمی‌توان شمارش کرد باید در یخچال قرار داد.

تجزیه بیوشیمیایی CSF

پروتئین CSF :

تعیین پروتئین, فراوانترین آزمون شیمیایی است که روی CSF انجام می‌گیرد. CSF طبیعی مقدار خیلی کمی پروتئین دارد. مقدار آن **15-45 میلی‌گرم در دسی‌لیتر** است و در شیرخواران و افراد مسن این اعداد کمی بیشتر است.

- همانند سرم, **آلبومین** بخش عمده پروتئین CSF را تشکیل می‌دهد. برخلاف سرم در اینجا نسبت **پره‌آلبومین** بیشتر است. می‌توان گفت که الکتروفورز پروتئین CSF طبیعی دو تفاوت مشخص آن را با سرم آشکار می‌کند:

1. یک باند **ترانس‌تایرتین** واضح : که به علت ساخت موضعی آن توسط شبکه کروئید نسبتا" زیاد می‌باشد.
2. باند **ترانسفرین** اضافی : باند ترانسفرین دوم که به آن β_2-ترانسفرین یا پروتئین تاو (Tau) گفته می‌شود آهسته‌تر از معادل سرمی خود مهاجرت می‌کند که این امر به علت هضم ریشه‌های اسید سیالیک توسط نورآمینیداز مغزی می‌باشد [که ترانسفرین اکثریت باند β را تشکیل می‌دهد].

- **α-گلبولینها** بیشتر شامل هاپتوگلبولین و سرولوپلاسمین است.
- **γ- گلبولینها** نیز عمدتا شامل IgG است ولی IgA هم وجود دارد اما IgM وجود ندارد.

مقادیر پروتئین CSF در پروسه‌های التهابی و عفونی از قبیل منتژیت, آنسفالیت یا میلیت افزایش می‌یابد. همچنین تومورها نیز می‌توانند باعث افزایش پروتئین شوند. آسیب سد خونی- مغزی (BBB) , تولید Igها در CNS و کاهش کلیرانس پروتئین طبیعی از مایع و دژنراسیون بافت عصبی از جمله علل افزایش پروتئین CSF می‌باشد.

الکتروفورز پروتئین CSF در تشخیص **مالتیپل اسکلروز (MS)** اهمیت فراوانی دارد. بطور طبیعی کمتر از 12 درصد مقدار پروتئین کل را γ-گلبولین تشکیل می‌دهد. نسبت آلبومین به گلبولین (A/G) در CSF بیشتر از این نسبت در پلاسما است چرا که اندازه آلبومین کوچکتر از گلبولین بوده و در نتیجه راحت‌تر از سد خونی- مغزی عبور می‌کند. در مبتلایان به بیماری MS , نوروسیفیلیس یا بیماری دژنراتیو نخاعی و مغز , نسبت گلبولین (از پروتئین تام) افزایش می‌یابد. بالا رفتن سطح IgG , افزایش نسبت IgG به سایر پروتئینها (مثل آلبومین) و یافتن **باند اولیگوکلونال γ-گلبولین** در CSF همگی قویا" مطرح‌کننده بیماریهای التهابی و اتوایمیون سیستم عصبی مرکزی به خصوص MS هستند.

کاهش غیرطبیعی پروتئین CSF هنگامی وجود دارد که از سیستم عصبی مرکزی نشت صورت گیرد. در برداشت زیاد مایع و هیپرتیروئیدیسم نیز کاهش پروتئین دیده می‌شود.

روشهای اندازه‌گیری پروتئین در CSF :

معمولترین روشهای اندازه‌گیری پروتئین CSF , روش **کدورت سنجی (Turbidimetry)** و روش **رنگ اتصالی (Dye-binding)** می‌باشد.

- در روش کدورت سنجی (توربیدیمتری) از اسید سولفوسالیسیلیک (SSA) یا اسید تری کلرواستیک (TCA) برای رسوب پروتئین استفاده می‌گردد. TCA مناسب‌تر است زیرا آلبومین و گلبولین را به یک اندازه رسوب می‌دهد اما هنگام استفاده از SSA, آلبومین بیشتر از گلبولین در ایجاد کدورت نقش دارد, مگر آنکه SSA با سولفات سدیم ترکیب گردد.

- روشهای رنگ اتصالی (Dye-binding) این مزیت را دارند که به حجم کمتری از نمونه نیاز داشته و تداخل کمتری دارند. به همین منظور بیشتر از رنگ کوماسی بریلیان بلو (CBB) استفاده می‌گردد.

هردو تکنیک کدورت سنجی و رنگ اتصالی برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین تام طراحی شده‌اند اما برای تشخیص اختلالات عصبی که همراه با غیرطبیعی بودن پروتئین CSF است اندازه‌گیری جداگانه فراکسیونهای پروتئین لازم است.

بیماریهایی مانند مالتیپل اسکلروز (MS) که سلولهای متعهد ایمنی را در CNS تحریک می‌نمایند نسبت بالاتری از IgG را نشان می‌دهند. برای نشان دادن علت IgG افزایش یافته (اینکه آیا این افزایش به دلیل تولید در داخل خود سیستم عصبی مرکزی است یا فقط به دلیل افزایش سطح سرمی است) از نسبت IgG به آلبومین و ضریب IgG استفاده می‌گردد.

چون آلبومین در CNS ایجاد نمی‌گردد بنابراین افزایش هردو نشان از صدمه سد خونی-مغزی دارد و در حالت تولید بالای IgG فقط IgG افزایش دارد. بدلیل اینکه تغییرات غلظت آلبومین می‌تواند نسبت IgG به آلبومین را تحت تاثیر قرار دهد از **اندکس IgG** استفاده می‌گردد. مقدار اندکس پایین‌تر از 0/6 طبیعی است.

$$\text{IgG index} = \frac{\text{CSF IgG/Serum IgG}}{\text{CSF Alb/Serum Alb}}$$

تعیین پروتئین MBP (Myelin-basic protein) با رادیوایمونواسی اختصاصی‌تر است. از الکتروفورز هم می‌توان استفاده کرد. تا 95 درصد مبتلایان به مالتیپل اسکلروز یک باند اولیگوکلونال مشخصی را بر روی ژل آگارز نشان می‌دهند.

سایر پروتئینهای CSF :

α2-ماکروگلبولین (AMG) : این پروتئین به علت اندازه بزرگی که دارد عموما بطور طبیعی در CSF وجود ندارد. افزایش قابل توجه آن بازتابی از خونریزی زیر سخت‌شامه یا نقص BBB است که به عنوان مثال در منتژیت باکتریایی رخ می‌دهد.

پروتئین واکنشگر C (CRP) : افزایش سطح این واکنشگر فاز حاد به عنوان روشی برای افتراق منتژیت باکتریایی از نوع ویروسی بخصوص در کودکان پذیرفته شده است. کاهش CRP در CSF نشانگر عدم وجود منتژیت باکتریایی می‌باشد (یعنی ارزش پیشگویی-کنندگی آن از مقادیر CRP بالا , بیشتر است).

گلوکز CSF :

گلوکز با عبور انتخابی از سد خونی- مغزی وارد CSF می‌گردد و این باعث می‌شود تا مقدار طبیعی آن در CSF به میزان 60 تا 70 درصد (دو سوم) مقدار گلوکز پلاسما باشد. در حقیقت نسبت طبیعی گلوکز CSF به پلاسما با نوسان سطوح خونی از 0/3 تا 0/9 تغییر می‌کند زیرا تاخیری در زمان تعادل گلوکز CSF وجود دارد. برای ارزیابی بهتر لازم است گلوکز سرم نیز اندازه‌گیری شود.

توجه: به علت تاخیری که در تعادل سرم-CSF وجود دارد, این کار بهتر است 2 تا 4 ساعت قبل از پونکسیون کمری صورت گیرد. نمونه‌ها را باید فورا آزمایش کرد زیرا در CSF گلیکولیز به سرعت انجام می‌شود.

افزایش گلوکز همیشه دلالت بر افزایش پلاسمایی آن است. اهمیت تشخیصی گلوکز بیشتر مربوط به کاهش آن در CSF می‌باشد. با زیاد شدن تعداد سلولهای موجود در CSF و بنابراین مصرف شدن گلوکز میزان آن در CSF کاهش خواهد یافت. این سلولها ممکن است سلولهای التهابی پاسخ دهنده به عفونت, سلولهای توموری یا باکتری باشند. گلوکز CSF به میزان کمتر از 60 درصد گلوکز خون می‌تواند نشان‌دهنده مننژیت و نئوپلاسم باشد.

اگر گلوکز پایین باشد اما نوتروفیل زیاد باشد, مننژیت باکتریایی است. اگر گلوکز پایین باشد اما لنفوسیت زیاد باشد, مننژیت سلی است و اگر گلوکز طبیعی باشد و لنفوسیت زیاد باشد, مننژیت ویروسی است.

[با وجود این حساسیت این سنجش در مننژیت باکتریایی ممکن است پایین و در حدود 55 درصد باشد و به همین علت سطح گلوکز طبیعی وضعیتهای مذکور را رد نمیکند].

لاکتات CSF :

میزان لاکتات خون و CSF تا حدود زیادی مستقل از هم است. افزایش سطح لاکتات CSF بازتابی از متابولیسم بی‌هوازی در CNS به علت هیپوکسی بافتی است. اندازه‌گیری لاکتات به عنوان آزمایشی فرعی در افتراق مننژیت ویروسی از مننژیت باکتریایی, مایکوپلاسمایی, قارچی و سلی (هنگامی که پارامترهای معمول نتایج مبهمی دارند) بکار می‌رود.

در مننژیت ویروسی سطح لاکتات معمولا زیر 25 mg/dL و تقریبا همیشه زیر 35 mg/dL است در حالیکه در مننژیت باکتریایی بطور معمول بالای 35 mg/dL است. حساسیت و ویژگی این تست در موارد مننژیت عفونی [که محدوده 36-30 mg/dL به عنوان حد مرزی بکار می‌رود] 80 تا 90 درصد است.

آنزیمهای CSF :

انواع بسیار گوناگونی از آنزیمها در CSF وجود دارند که منشاء آنها از بافت مغزی , خون یا عناصر سلولی داخل CSF است. بطور کلی کاربرد سنجش آنزیمهای CSF در تشخیص بالینی آزمایشگاهی تایید نشده است.

لاکتات دهیدروژناز (LDH) :

جداسازی ایزوآنزیمهای LDH می‌تواند به تشخیص مننژیت کمک کند. ایزوآنزیمهای LDH متعاقب متلاشی شدن سلولهای خاصی در CSF ظاهر می‌شوند که عمده آنها را نوتروفیلها, لنفوسیتها و سلولهای مغزی تشکیل می‌دهند. بافت مغزی حاوی LDH_1 , LDH_2 است در حالیکه نوتروفیل حاوی LDH_4 , LDH_5 می‌باشد. بنابراین افزایش LDH_4 , LDH_5 نشانگر مننژیت باکتریایی و افزایش LDH_1 , LDH_2 نشانگر مننژیت ویروسی می‌باشد.

میزان LDH ممکن است در افتراق پونکسیون تروماتیک از خونریزی داخل مغزی کمک کننده باشد زیرا پونکسیون تروماتیک «تازه به وقوع پیوسته» همراه با RBC های سالم , LDH را بطور قابل توجهی افزایش نمی‌دهد.

کراتین کیناز (CK) :

کراتین کیناز (CK) بطور طبیعی با غلظت کمتر از 5 U/L در CSF وجود دارد و غالبا از نوع CK-BB (مغزی) است ولی مقادیر کمی از CK-MB و CK-MM به احتمال زیاد ثانویه به آلودگی با خون هستند. افزایش CK-BB در موارد زیر دیده می‌شود:

دمیلینیزاسیون , صرع , سکته مغزی , تومورهای بدخیم , مننژیت , آسیب جمجمه .

آمونیاک و گلوتامین CSF :

سطح آمونیاک در CSF بین یک سوم تا یک دوم مقادیر خونی آن می‌باشد. این ترکیب با اتصال به α-کتوگلوتارات می‌تواند منجر به تولید گلوتامین گردد و این امر باعث محافظت مغز از سمیت آمونیاک می‌شود. بنابراین سطح گلوتامین بازتابی از میزان آمونیاک مغزی می‌باشد. گلوتامین بالای 35 mg/dL تقریبا همیشه با آنسفالوپاتی کبدی همراه است. **[غلظت طبیعی آن 8-18 mg/dL می‌باشد]**

مایع سینوویال یا مفصلی (Synovial Fluid)

مایع سینوویال(SF) که به آن مایع مفصلی نیز می‌گویند, مایع چسبناکی است که در بعضی از حفرات مفصلی وجود دارد و از اولترا فیلتراسیون ناقص پلاسما بوجود می‌آید که در آن اسید هیالورونیک تولید شده توسط سلولهای سینوویال نیز وجود دارد.

یونها و ملکولهای کوچک مانند گلوکز و اوره به آسانی وارد فضای مفصلی می‌شوند و در نتیجه غلظت آنها در مایع مفصلی مشابه پلاسما است درحالیکه ملکولهای بزرگ (پروتئین‌های بزرگ) در مایع مفصلی یا وجود ندارند یا میزان آنها ناچیز است.

مایع مفصلی به عنوان تسهیل کننده و روان ساز برای سطوح مفاصلی که حرکات زیادی دارند و به عنوان اتصال دهنده عمل می‌کند و مواد غذایی را برای غضروف مفصلی فاقد عروق فراهم می‌آورد.

جمع آوری نمونه:

اگرچه این مایع در تمام مفاصل سینوویال وجود دارد, نمونه‌ای که معمولا به آزمایشگاه فرستاده می‌شود از زانو کشیده می‌شود. این عمل آرتروسنتز (Arthrocentesis) نامیده می‌شود. بدلیل اینکه حتی مفاصل بزرگی مانند زانو بطور طبیعی بیشتر از 4 ml مایع سینوویال ندارند بنابراین به جز در مواردی که افوزیون (نشت) وجود دارد نمونه‌گیری با حجم کم انجام می‌گیرد.

در آرتروسنتز روتین سرنگ را با **سدیم هپارین** باید هپارینه نمود. از بکار بردن ضد انعقادهایی مانند اگزالات , پودر EDTA و لیتیوم هپارین باید اجتناب نمود زیرا این مواد باعث تشکیل بلورهای مصنوعی می‌شوند و نتایج گمراه کننده‌ای به دست می‌دهند.

نمونه گرفته شده باید به سه بخش جداگانه تقسیم شوند:

1. یک لوله یا سرنگ هپارینه استریل برای میکروب‌شناسی.
2. یک لوله حاوی ضد انعقاد (سدیم هپارین یا مایع EDTA) برای آزمایش میکروسکوپی.
3. یک لوله معمولی (بدون ضد انعقاد) برای بررسی لخته شدن (SF طبیعی لخته نمی‌شود, ولی در بیماریهای مفصلی ممکن است مایع حاوی فیبرینوژن بوده و لخته تشکیل دهد).

نکته مهم: اگر غلظت هپارین مورد استفاده بالا باشد اثر مهارکننده برروی برخی از باکتریهای پاتوژن دارد.

چند نکته مهم در مورد آزمایش ظاهری و میکروسکوپی (شمارش سلولی مایع مفصلی):

- **SF اصولا بیرنگ و شفاف است.**
- **رنگ آن در اختلالات التهابی و غیر التهابی, کهربایی مایل به زرد (گزانتوکرومی) است. رنگ مایع چرکی, بسته به مواد رنگزای تولید شده توسط ارگانیسم مسئول و پاسخ میزبان (ورود RBC,WBC) ممکن است زرد, قهوه‌ای یا سبز باشد.**

- **لکوسیتها شایعترین عامل مسئول در ایجاد تغییرات شفافیت مایع سینوویال هستند, ولی تعداد زیاد بلورها نیز ممکن است مایع را در غیاب گلبولهای سفید کدرکند و به رنگ شیری درآورد.**
- **شمارش گلبولهای سفید به علت تخریب سلولی که یک ساعت پس از آرتروسنتز شروع می‌شود, باید فورا صورت گیرد.**
- **برای شمارش سلولها می‌توان از شمارشگرهای سلولی خودکار (اتوماتیک) استفاده نمود ولی استفاده از آنها با خطر انسداد دستگاه همراه است و ذرات غیرِ WBC (بلورها, گلبولهای چربی) سبب کسب نتایج بالای کاذب می‌شوند.**
- **شمارش سلولی بالای μL/50000 نیازمند رقیق کردن نمونه است اما به منظور جلوگیری از تشکیل لخته موسین و توده‌شدن سلولی, این کار باید با سالین انجام گیرد نه با اسید استیک.**
- **SF بسیار چسبناک باید قبل از شمارش (بخصوص هنگامی که از شمارشگرهای خودکار استفاده می-گیرد) با آنزیم هیالورونیداز آنکوبه گردد.**

آزمایش کریستال: به فرایند رسوب کریستال در بافت مفصلی, **نقرس** اطلاق می‌شود که بطور معمول به نقرس اوراتی اشاره دارد. پاسخ التهابی در برابر رسوب کریستال, **آرتریت نقرسی** نامیده می‌شود. شایعترین کریستالهای مسئول آرتریت نقرسی عبارتند از:

- **منوسدیم اورات (نقرس اورات)**
- **کلسیم پیروفسفات (نقرس پیروفسفات, کندروکلسینوز** یا **نقرس کاذب Pseudogout)**

همچنین ممکن است کریستالهای کلسترول, آپاتیت (ماده معدنی اصلی در غضروف), اگزالات کلسیم و کورتیکواستروئید (که حاصل تزریقات دارویی است) نیز دیده شود.

- **آزمایش کریستال باید سریعا پس از گرفتن نمونه انجام گیرد, زیرا تغییر در حرارت و *pH* مایع می-تواند روی انحلال‌پذیری کریستال اثر گذاشته و نتایج غلطی را بدنبال داشته باشد.**
- **قرار دادن نمونه‌ها در یخچال, انحلال‌پذیری اسیداوریک را کاهش داده و منجر به افزایش کریستالهای اورات منوسدیم می‌گردد.**
- **همچنین وقتی نمونه در معرض هوای اتاق قرار می‌گیرد, به علت از دادن دی‌اکسیدکربن, *pH* افزایش یافته و کریستالهای فسفات‌کلسیم تشکیل می‌شوند.**

تجزیه شیمیایی مایع سینوویال(SF) :

تست Ropes یا تست لخته (انعقاد) موسین:

ویسکوزیته مایع سینوویال ناشی از پلیمریزه شدن اسید هیالورونیک (هیالورونات) بوده و در آرتریت میزان آن کاهش می‌یابد. افزودن اسید استیک به SF , باعث رسوب اسید هیالورونیک به صورت لخته موسین می‌گردد که براساس میزان رسوب به سه درجهٔ خوب, معمولی و ضعیف تقسیم‌بندی می‌شود. لخته موسینی با درجه معمولی یا ضعیف, دلیلی بر رقیق شدن و دپلیمریزه شدن اسید هیالورونیک می‌باشد که یافته‌ای غیراختصاصی در بسیاری از آرتریتهای التهابی محسوب می‌شود. در حال حاضر این تست کاربرد بالینی اندکی دارد.

علاوه بر روش مذکور, یک روش ساده, مشاهده توانایی مایع برای تشکیل رشته در نوک سرنگ می‌باشد. رشته‌ای را که 4 تا 6 سانتیمتر طول داشته باشد طبیعی در نظر می‌گیرند.

گلوکز:

گلوکز فراوانترین آزمونی است که درخواست می‌شود, زیرا وقتی مقدار آن بطور واضحی کاهش یافته باشد, نشانگر بیماریهای التهابی یا عفونی است. تفسیر دقیق میزان گلوکز SF , نیازمند مقایسه با مقادیر سرمی است. مقدار طبیعی گلوکز مایع سینوویال به مقدار گلوکز خون بستگی دارد, لذا برای تعیین قند, باید نمونه خون و مایع سینوویال را همزمان گرفت. ایده‌آل این است که بیمار به مدت 8 ساعت ناشتا باشد تا بین هردو مایع پلاسما و سینوویال تعادل برقرار شود.

تفاوت گلوکز سرم و مایع مفصلی در حالت طبیعی و بسیاری از بیماریهای غیرالتهابی درحد کمتر از 10 mg/dL می‌باشد, اما در آرتریت چرکی و سایر بیماریهای التهابی این تفاوت درحدود 20-60 mg/dL می‌باشد.

در صورتی که تست بعد از یک ساعت از نمونه‌گیری انجام گیرد یا از لوله‌های فاقد فلورید سدیم استفاده شود, گلیکولیز در اثر تعداد زیاد لکوسیتها, به صورت کاذب مقدار گلوکز را پایین نشان می‌دهد.

پروتئین:

میزان آن در SF کمتر از 3 gr/dL می‌باشد (تقریبا یک‌سوم مقدار سرمی آن). در بیماریهای التهابی و خونریزی دهنده, مقدار پروتئین تام آن افزایش می‌یابد.

لاکتات:

این تست, یک نشانگر غیراختصاصی از لکوسیتوز SF است. مقادیر بالای لاکتات, با آرتریت چرکی همراه است و در نمونه‌هایی که رنگ آمیزی گرم آنها منفی است نشانه موقتی از عفونت محسوب می‌گردد.

اسید اوریک:

در مجموع میزان اسید اوریک مایع مفصلی در بیماریهای نقرس و آرتریتهای غیر التهابی به موازات اسید اوریک سرم است.

آزمایشات میکروبشناسی:

استافیلوکوک طلایی, باسیلهای گرم منفی و گنوکوک از شایعترین علل آرتریت چرکی می‌باشد. تمام نمونه‌ها به روش گرم رنگ-آمیزی می‌شوند. در کشت‌های باکتریایی معمولی, حتما باید یک محیط مغذی مثل شکلات آگار هم وجود داشته باشد, زیرا علاوه بر استافیلوکوک و استرپتوکوک, باکتریهای سخت رشد مانند هموفیلوس و نایسریا از معمولترین ارگانیسمهایی هستند که باعث عفونت مایع سینوویال می‌گردند.

آزمایشات سرولوژی:

به علت ارتباط بین سیستم ایمنی و روند التهابی, آزمایشگاه سرولوژی در تشخیص بیماریهای مفصلی نقش مهمی را ایفا می‌نماید. آرتریت روماتوئید (RA) و لوپوس اریتماتوس سیستمیک (SLE), بیماریهای خود ایمنی هستند که التهاب بسیار شدیدی در مفاصل ایجاد می‌کنند.

تعیین سطح کمپلمان مایع مفصلی می‌تواند در تشخیص افتراقی آرتریت‌ها کمک کننده باشد و مشخص نماید که آیا منشاء ایمونولوژیکی دارد یا غیرایمونولوژیکی. مقدار اجزای کمپلمان مورد اندازه‌گیری باید نسبت به سرم مورد ارزیابی قرار گیرد. تست فاکتور روماتوئید (RF) برای آرتریت روماتوئید و تست آنتی‌بادیهای ضدهسته‌ای (ANA) برای لوپوس اریتماتوس انجام می‌شود.

« مایعات سروزی »

حفرات بسته بدن از قبیل **جنب**, **پریکارد** و **صفاق** هریک بوسیله دو پرده پوشیده شده‌اند که به آنها غشاهای سروزی گفته می‌شود. مایع بین این دو غشاء را نیز مایع سروزی می‌نامند که به هنگام حرکت سطوح برروی هم, حرکات را روان می‌سازد. مایعات سروزی شامل **مایع جنب(Pleural Fluid)**, **مایع پریکارد(Pericardial Fluid)** و **مایع صفاق(Peritoneal Fluid)** می‌باشد. بطور طبیعی مقدار مایع درون آنها کم می‌باشد, زیرا تولید و جذب آن به میزان ثابتی صورت می گیرد.

مایعات سروزی بصورت فراپالیده‌ای از پلاسما می‌باشد. مقدار ناچیزی پروتئین به آنها وارد می‌شود که بوسیله سیستم لنفاوی خارج می-گردد. تولید و بازجذب تحت تاثیر فشارهای هیدروستاتیکی و انکوتیکی (کلوئیدی) است که در مویرگهای جدار حفره‌ها وجود دارد.

نمونه به شیوه آسپیراسیون گرفته می‌شود. آسپیراسیون مایع جنب, **توراسنتز (Thoracentesis)** نامیده می‌شود, آسپیراسیون مایع پریکارد, **پریکاردیوسنتز (Pericardiocentesis)** و آسپیراسیون مایع صفاق, **پاراسنتز (Paracentesis)** نامیده می‌شود.

برای شمارش سلولی, نمونه با ماده ضد انعقاد لازم است و برای کشت نیاز به لوله استریل و برای مشاهده لخته شدن خود بخود, نمونه بدون ماده ضد انعقاد لازم می‌باشد.

بسیاری از شرایط پاتولوژیکی می‌توانند باعث نشت یا افوزیون(Effusion) مایع سروزی گردند. ولی می توان با تقسیم‌بندی این مایع به دو گروه **ترانسودا** و **اگزودا**, علل افوزیون را بطور کلی تقسیم‌بندی نمود.

افوزیون‌های بوجود آمده به علت یک اختلال عمومی که موازنه تنظیم پالایش و بازجذب مایع را برهم می‌زنند, ترانسودا نامیده می-شود. مانند: نارسایی احتقانی قلب که منجر به تغییر در فشار هیدروستاتیکی درون عروق و نتیجتا منجر به افوزیون می گردد.

اگزوداها در شرایطی بوجود می‌آیند که در این شرایط غشاهای یک حفره خاص بطور مستقیم درگیر باشند. مانند: عفونتها و بدخیمیها.

همچنین می‌توان گفت ترانسوداها ناشی از یک روند مکانیکی و اگزوداها در نتیجه یک روند التهابی هستند. طبقه‌بندی یک مایع به ترانسودا یا اگزودا می‌تواند در تشخیص و جهت‌دهی به آزمونهای بعدی آزمایشگاهی, قدم با ارزش اولیه‌ای باشد چرا که معمولا برای مایعات ترانسودا, آزمایش بیشتری نیاز نیست.

معیارهای آزمایشگاهی متنوعی برای افتراق ترانسودا و اگزودا بکار می‌روند. مانند: ظاهر, وزن مخصوص, پروتئین تام, لاکتات دهیدروژناز(LDH) , شمارش سلولی و لخته شدن خود بخود. که در این میان نسبت پروتئین مایع سروزی به پروتئین سرم و نسبت LDH مایع سروزی به LDH سرم از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشد.

ویژگی ترانسودا:

شفاف , وزن مخصوص کمتر از 1/015 , پروتئین تام کمتر از 3 گرم بر دسی‌لیتر , نسبت پروتئین مایع سروزی به پروتئین سرم کمتر از 0/5 , لاکتات دهیدروژناز(LDH) کمتر از 200 IU/mL , نسبت LDH مایع سروز به LDH سرم کمتر از 0/6 , شمارش سلولی کمتر از 1000 /µL .

ویژگی اگزودا:

کدر , وزن مخصوص بیشتر از 1/015 , پروتئین تام بیشتر از 3 گرم بر دسی‌لیتر , نسبت پروتئین مایع سروزی به پروتئین سرم بیشتر از 0/5 , LDH بیشتر از 200 IU/mL , نسبت LDH مایع سروز به LDH سرم بیشتر از 0/6 , شمارش سلولی بیشتر از 1000 /µL .

مایع جنب یا پلور (Pleural Fluid) :

تجمع غیرطبیعی مایع پلور وقتی روی می‌دهد که فشار هیدروستاتیکی مویرگ, فشار کلوئیدی, نفوذپذیری عروق و تخلیه لنفاوی تحت تاثیر قرار گرفته باشند. به عنوان مثال برای هر یک از این موارد می‌توان نارسایی احتقانی قلب و هیپوآلبومینی, پنومونی و کارسینوم را نام برد. نارسایی احتقانی قلب و هیپوآلبومینی بیماریهای عمومی هستند که منجر به ایجاد مایع ترانسودا می‌شوند, در حالیکه پنومونی و کارسینوم صدمه موضعی همراه با مایع اگزودایی ایجاد می‌کنند. بنابراین تمایز مایع از نظر ترانسودا یا اگزودا می‌تواند با اهمیت باشد.

از آنجاییکه مایع پلور صرفا فراپالیده پلاسمایی است از نظر شیمیایی مقادیر طبیعی آن مانند پلاسما است. علاوه بر آزمونهای شیمیایی که برای افتراق ترانسودا و اگزودا بکار می‌روند, رایجترین آزمونهای شیمیایی که روی مایع پلور انجام می‌شوند عبارتند از: گلوکز, pH و آمیلاز.

میزان گلوکز مایع پلور طبیعی مشابه میزان سرمی است. کاهش سطح گلوکز را در التهابهای سلی و روماتوئیدی می‌بینیم. پایین بودن pH مایع در تشخیص پنومونی, سل و بدخیمی تا حدی ارزشمند است و ممکن است نشانگر نیاز به درناژ قفسه سینه باشد. اگر pH مایع تا حد 6 پایین باشد, نشان‌دهنده پارگی مری است. افزایش فعالیت آمیلاز به بیش از سطح فعالیت سرمی آن, نشانگر پانکراتیت, پارگی مری یا بدخیمی می‌باشد. آمیلاز افزایش یافته در اثر پارگی مری یا بدخیمی از نوع بزاقی می‌باشد و همین امر باعث افتراق حالتهای مذکور از پانکراتیت می‌شود.

باوجود اینکه برآورد شاخصهای توموری از جمله CEA (کارسینو امبریونیک آنتی‌ژن) به عنوان یک تست معمول توصیه نمی‌شود, این نشانگرها می‌توانند در اگزوداهای غیر التهابی مبهم که سیتولوژی آنها منفی است, تست کمکی مفیدی باشد.

بطور کلی اگر نسبت پروتئین پلور به پروتئین سرم بیش از 0/5 و نسبت LDH پلور به LDH سرم بیش از 0/6 و شمارش سلولی بالا و pH پایین باشد وجود یک عفونت چرک‌زا را مطرح می‌کند. اگر گلوکز پایین باشد و لنفوسیت بالا باشد عفونت توبرکولوزی و بدخیمی را مطرح می‌کند اما اگر گلوکز پایین باشد و نوتروفیل بالا باشد عفونت باکتریایی وجود دارد.

خلاصه‌ای از آزمایشات مایع پلور:

ظاهر طبیعی: شفاف, زرد کمرنگ

خون: صدمه تروماتیکی, بدخیمی

رنگ‌آمیزی با سودانIII : مواد شیلی

لنفوسیتها: سل, بدخیمی

گلوکز پایین: سل, التهاب روماتوئیدی, بدخیمی

افزایش آمیلاز: پانکراتیت

کدورت: گلبولهای سفید و میکروارگانیسمها

شیری: مواد شیلی

نوتروفیلها: عفونت باکتریایی

گلوکز طبیعی: به موازات گلوکز سرم است

pH پایین: سل, بدخیمی, پارگی مری

CEA: بدخیمی

مایع پریکارد (Pericardial Fluid) :

بطور طبیعی تنها مقدار کمی (10 تا 50 میلی‌لیتر) مایع شفاف به رنگ زرد کمرنگ بین غشاهای پریکارد وجود دارد. افوزیون‌های پریکارد بطور عمده, در نتیجه تغییرات نفوذپذیری غشاها به علت عفونت (پریکاردیت), انفارکتوس میوکارد, خونریزی, بدخیمی یا صدمه متابولیکی می‌باشند. اگر پزشک در معاینات خود متوجه وجود فشار بر روی قلب گردد, به وجود مایع اضافی مشکوک می‌گردد.

در بیماریهای متابولیکی مایع, ظاهری شفاف دارد؛ ولی در عفونت و بدخیمی مایع کدر دیده می‌شود. مایع شیری‌رنگ در آسیب به دستگاه لنفاوی دیده می‌شود. وقتی که به علت سل و تومورها, غشاء آسیب می‌بیند, همچنین در سوراخ شدگی قلب و استفاده نامناسب از داروهای ضد انعقاد, خون در مایع دیده می‌شود.

تعداد گلبولهای سفید بیشتر از $1000/\mu L$, نشان‌دهنده عفونت است. همانند مایع پلور, افزایش درصد نوتروفیلها, اندوکاردیت باکتریایی را مطرح می‌کند. در عفونتهای باکتریایی و بدخیمی‌ها مقدار گلوکز کاهش می‌یابد. معمولا رنگ‌آمیزی گرم و کشت انجام نمی‌شود مگر اینکه به اندوکاردیت باکتریایی مشکوک باشیم. آزمایش سیتولوژیکی مایع پریکارد از نظر وجود سلولهای بدخیم, بخش مهمی از آزمایش این مایع را تشکیل می‌دهد.

خلاصه‌ای از آزمایشات مایع پریکارد:

ظاهر طبیعی: شفاف, زرد کمرنگ

کدورت: عفونت, بدخیمی

نوتروفیلها: اندوکاردیت باکتریایی

CEA: بدخیمی

شیری: درناژ لنفاوی

خون: سل, تومور, سوراخ شدگی قلب

گلوکز پایین: عفونت باکتریایی, بدخیمی

مایع صفاق (Peritoneal Fluid) :

در حالت طبیعی تا 50 میلی‌لیتر مایع در فضای صفاقی وجود دارد که در اثر فیلتراسیون پلاسما, تحت تاثیر نفوذپذیری عروقی و نیروهای هیدروستاتیک و آنکوتیک تولید می‌گردد. به افوزیون صفاقی آسیت(Ascites) و به مایع موجود در آن مایع آسیت (Ascitic fluid) گفته می‌شود.

از علل مهم آسیت (افوزیون صفاقی) این موارد می‌باشند:

- ترانسوداها:

افزایش فشار هیدروستاتیک یا کاهش فشار آنکوتیک پلاسما؛ نارسایی احتقانی قلب, سیروز کبد, هیپوپروتئینمی(سندرم نفروتیک)

- اگزودا:

افزایش نفوذپذیری مویرگی یا کاهش جذب لنفاتیک؛ عفونتها (سل, پریتونیت باکتریایی اولیه, آپاندیسیت) , نئوپلاسمها یا بدخیمی‌ها, تروما, پانکراتیت, پریتونیت صفراوی (مانند پارگی کیسه صفرا)

مایع صفاق طبیعی, همانند مایع پلور و پریکارد, شفاف و به رنگ زرد کمرنگ می‌باشد. اگزودا در عفونتهای باکتریایی و قارچی کدر بوده و در صورت وجود صفرا, سبز رنگ می‌باشد.

آزمایش شیمیایی مایع آسیت بطور عمده شامل تعیین گلوکز, آمیلاز و آلکالین فسفاتاز می‌باشد. مقدار گلوکز در پریتونیت سلی و بدخیمی, از مقدار سرمی آن کمتر می‌شود. بطور معمول آمیلاز مایع آسیت را برای اطمینان از وجود پانکراتیت, اندازه‌گیری می‌کنند, ولی ممکن است در سوراخ شدگیهای مجاری گوارش نیز افزایش یابد. همچنین افزایش آلکالین فسفاتاز برای سوراخ شدگی روده تا حد بسیار زیادی تشخیصی است. اندازه‌گیری ازت اوره خون (BUN) و کراتینین در مایع را وقتی درخواست می‌کنند که به پارگی مثانه یا سوراخ شدگی تصادفی آن در ضمن پاراسنتز مشکوک باشند.

رنگ‌آمیزی گرم و کشت از نظر باکتریهای هوازی و بیهوازی وقتی انجام می‌شود که به پریتونیت باکتریایی مشکوک باشیم و ممکن است برای سل نیز رنگ‌آمیزی اسید- فاست درخواست شود.

خلاصه‌ای از آزمایشات مایع صفاق:

ظاهر طبیعی: شفاف, زرد کمرنگ

کدورت: پریتونیت, سیروز و ...

سبز: صفرا

شیری: مواد شیلی

خون: تروما

نوتروفیلها: پریتونیت

گلوکز پایین: پریتونیت سلی, بدخیمی

افزایش آمیلاز: پانکراتیت سوراخ شدگی مجاری گوارشی

افزایش آلکالین فسفاتاز: سوراخ شدگی روده

افزایش اوره یا کراتینین: پاره شدن مثانه

عرق (Sweat) :

اگرچه تجزیه عرق آزمایش روزمره‌ای محسوب نمی‌شود, اما برای تایید بیماری فیبروز کیستی(CF) , الکترولیتهای عرق (سدیم و کلر) را اندازه‌گیری می‌کنند. CF بیماری متابولیکی است که روی غدد ترشح کننده موکوس اثر می‌گذارد. چون این بیماری چندین ارگان را گرفتار می‌کند, لذا علایم بالینی فراوانی می‌توانند پزشک را به ظن وجود این بیماری راهنمایی کنند. معمولترین عوامل شناسایی عبارتند از: سابقه خانوادگی CF , نوزادانی که قادر به رشد نبوده و یا آنهایی که انسداد روده دارند و پیدایش نارسایی پانکراس یا دیسترس تنفسی در اطفال. بالا بودن مقدار سدیم(Na^+) و کلر(Cl^-) عرق در بیمارانی که هرکدام از علائم فوق را داشته باشند, تشخیص CF را تایید می‌کند.

مدفوع(Stool) :

مدفوع به عنوان محصولی نهایی از متابولیسم بدن, اطلاعات تشخیصی ارزشمندی ارائه می‌کند.آزمایش روزمره مدفوع برای کشف زودرس خونریزی از دستگاه گوارش, اختلالات کبد ومجاری صفراوی و سندرمهای سوءجذب, شامل آزمایشهای ماکروسکوپی, میکروسکوپی و شیمیایی است که بخش آزمایشهای شیمیایی آن بیشتر مورد بحث قرار گرفته و دو آزمایش آنرا که بیشترین کاربرد را دارند توضیح می‌دهیم:

خون مخفی مدفوع (Fecal occult blood; FOB) :

تایید وجود خونریزی شدید آشکار از طریق آنالیز شیمیایی یا آزمایش مدفوع از نظر خون مخفی, بخشی معمول از اقدامات پزشکی است. چون بعضی از غذاها یا رنگها (مانند چغندر یا رنگهای غذا) ممکن است رنگ مدفوع را به گونه‌ای تغییر دهند که خونی به نظر برسد, تستهای شیمیایی می‌توانند برای تایید خونریزی مشکوک مفید واقع شوند.

دفع روده‌ای هموگلوبین بستگی به محل خونریزی دارد. خونریزی در نقاط فوقانی‌تر دستگاه گوارشی باعث هضم کامل گلوبین و هِم می‌شود که جذب نشده و توسط باکتریهای روده به پورفیرینهای مشتق از هِم تبدیل می‌شوند. خونریزی در نواحی پروگزیمال کولون باعث تجزیه باکتریایی گلوبین و هِم و باعث تشکیل پورفیرین و خونریزی در نواحی رکتوسیگموئید باعث کمترین تغییر در ساختمان ملکول هموگلوبین می‌گردد. بنابراین آزمایش خون مخفی باید بتواند هر دو ماده هِم و مشتقات پورفیرینی آن را تشخیص دهد.

در اکثر سرطانهای کولورکتال خونریزی روده‌ای ایجاد می‌گردد و در اکثر مراحل تشخیص بخصوص تشخیص اولیه بررسی خونریزی از تومور حائز اهمیت است. اندازه‌گیری FOB , عمدتا براساس تشخیص فعالیت شبه پراکسیدازی هِم می‌باشد که باعث احیای H_2O_2 به آب می‌گردد. این واکنش نیاز به یک دهنده هیدروژن دارد که از گایاک به عنوان دهنده هیدروژن استفاده می‌شود. اکسیداسیون ماده رنگزای دهنده باعث ایجاد رنگ می‌شود.

$$\text{گایاک} + H_2O_2 \xrightarrow[\text{(پسودوپرکسیداز)}]{\text{هموگلوبین}} \text{رنگ آبی}$$

آزمایش گایاک متاسفانه با بسیاری از پراکسیدازهای غیر هموگلوبینی موجود در مدفوع واکنش می‌دهد (از قبیل سبزیجات یا گوشت مصرف شده) از طرف دیگر بسیاری از داروها از جمله سالیسیلاتها (که باعث خونریزی معده می‌شوند) یا ویتامین C افزودنی (که باعث مهار واکنش گایاک می‌شود) باعث تداخل آزمایش FOB می‌شود. بنابراین محدودیتهای رژیمی قبل از انجام آزمایش گایاک لازم است. بنابراین بیمار باید از دریافت ویتامین C , گوشت قرمز, سبزیجات غنی از پراکسیداز, الکل و آسپیرین خودداری کند.

امروزه روشهای ایمونوشیمی با حساسیت و ویژگی بالا ابداع شده‌اند که تداخل کننده‌های ذکر شده در بالا, در آنها تاثیری ندارد. در یک روش جدیدتر به جای آزمایش خون مدفوع, میزان آلبومین انسانی در مدفوع مورد سنجش قرار می‌گیرد.

تست APT برای تشخیص خونریزی نوزادان:

گاهی در نوزادان در نتیجه بلع خون مادر به هنگام زایمان یا بلع خون مادر توسط شیرخواران در صورت خراش یا خونریزی نوک پستان مادر, مدفوع یا استفراغی که به شدت خون آلود است دیده می‌شود که باید مشخص شود که این خون همان خونِ بلعیده شده مادر است یا از نوعی بیماری در خود نوزاد ناشی شده است. تست APT یک تست کیفی است که برای تشخیص این مساله بکار می‌رود. نمونه ابتدا با آب مخلوط و سانتریفوژ می‌گردد. مایع رویی که باید صورتی رنگ باشد, بعدا با هیدروکسید سدیم (سود) مخلوط می‌گردد. اگر خون منشا مادری داشته باشد, مخلوط پس از چند دقیقه رنگ قهوه‌ای مایل به زرد پیدا می‌کند. در حالیکه اگر منشاء خون جنینی باشد, صورتی رنگ باقی می‌ماند.

علت: هموگلوبین جنینی(HbF) نسبت به هموگلوبین بالغین در محیط قلیایی در برابر دناتوراسیون مقاومت بیشتری دارد.

چربی مدفوع(Lipid in Feces) :

از آنجائیکه پانکراس منبع عمده آنزیم‌های لیپاز, آمیلاز و پروتئولیتیکی می‌باشد, کاهش قابل توجه در فعالیت پانکراس, باعث کاهش جذب نشاسته, چربی, پروتئین و افزایش همزمان آن در مدفوع خواهد شد.

بطور عمده اندازه‌گیری محتوای چربی مدفوع برای تایید استئاتوره(Steatorhea) محدود می‌شود. این آزمایش همانطور که ذکر شد برای تعیین علت استئاتوره به کار نمی‌رود بلکه فقط برای تشخیص و تایید حضور استئاتوره و تشخیص انواع سندرمهای سوءجذب شامل اسپرو, کرون, پانکراتیت مزمن, فیبروز سیستیک(CF) و بیماری ویپل بکار می‌رود.

از روشهای تیتراسیون و تست تنفسی برای تشخیص استئاتوره استفاده می‌گردد. اساس تست تنفسی, استفاده از رژیم غذایی حاوی تری-گلیسریدهای نشاندار شده با ^{14}C و به دنبال آن اندازه‌گیری میزان $^{14}CO_2$ در هوای بازدمی است. استئاتوره ناشی از نارسایی پانکراس یا علل دیگر, باعث کاهش جذب تری‌گلیسریدها توسط سیستم گوارشی می‌گردد. این امر نیز به کاهش CO_2 مشتق از متابولیسم اسیدهای چربِ تری‌گلیسرید در هوای بازدمی, می‌شود.

در روش کیفی اندازه‌گیری لیپید مدفوع از سودانIII استفاده می‌گردد که باعث تشخیص تری‌گلیسرید و اسیدهای چرب در روش میکروسکوپی می‌شود.