

## 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 می باشد. وقتی صحبت از کنترل کیفی می شود، بیشتر فعالیتها حول محور انجام آزمایش متمرکز میگردد، اما محدوده کنترل کیفی بسیار وسیعتر است. هر جا امکان خطا وجود دارد باید برنامه کنترل کیفی نیز وجود داشته باشد. لذا در چرخه مراجعه بیمار به آزمایشگاه تا گرفتن نتیجه کلیه مراحل نمونه گیری، انتقال، انجام آزمایش و ارائه جواب باید تحت نظارت سیستم کنترل کیفی باشد. دقیق ترین سیستم انجام آزمایش وقتی که نمونه گیری 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 پیش بینی نیست و در یک جهت خاص هم اتفاق نمی افتد. 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 جهت دار است و همیشه در یک جهت (یعنی بالاتر یا پایین تر از مقدار واقعی) اتفاق می افتد. اینگونه خطاها خود به چند دسته تقسیم می شوند:

- 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 ... می باشد.
- 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 میکروارگانیسمها، حل شدن ظرف شیشه ای در قلیا و اسیدی شدن بر اثر ترکیب با دی اکسید کربن هوا ایجاد می شود که بالطبع موجب خطا خواهد شد.

## حوزه کار کنترل کیفی:

1. **دستگاهها:** کلیه دستگاههای آزمایشگاه از قبیل یخچال، بن ماری، فتومتر و غیره باید بطور مرتب تحت نظارت و کنترل 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 تهیه کننده، توضیحات لازم مثل شرایط نگهداری و ...
3. **انجام آزمایش:** این مقوله از سایر عوامل مثل دستگاهها و معرفها و همچنین شخص آزمایش کننده تاثیر می پذیرد.

## اصطلاحات متداول در کنترل کیفی:

- صحت (Accuracy):** میزان توافق مقادیر اندازه گیری شده با مقدار واقعی. در آزمایشگاه جز در مورد استانداردها، مقدار واقعی مشخص نیست.
- دقت (Precision):** میزان خطاهای اتفاقی و تکرارپذیری سنجشها را نشان می دهد. 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 می شود. اگر یک روش صحت و دقت خود را در یک زمان قابل توجه حفظ کند قابل اعتماد است.

روشهای کنترل کیفی:

1. **استفاده از سرم کنترل:** سرم کنترلها سرمهایی هستند که دارای مواد مورد اندازه گیری در آزمایشگاهها هستند و آنها را میتوان ساخت یا بصورت تجاری تهیه نمود و به دو نوع سرم کنترل صحت و سرم کنترل 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 شیمی بالینی اندازه گیری می شوند را دارا باشد. سرم کنترل همراه سایر نمونه های بالینی مورد استفاده قرار می گیرد و اگر نتایج در محدوده غلظت سرم کنترل نباشد آزمایش جهت پیدانمودن عوامل یا عامل ایجاد خطا مجددا مورد بررسی قرار می گیرد. 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 سرم کنترل بالا خطای آزمایش را کشف نماید. از سرم کنترلها 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 می گردد.
3. **بررسی محاسباتی (Arithmetic check):** مثل محاسبه اسید و باز از روی مقدار pH و CO<sub>2</sub> از معادله هندرسن- هاسلباخ یا بررسی شکاف آنیونی (Anion gap) یا اسمولاریته با توجه به غلظت گلوکز، سدیم، اوره و ...
4. **بررسی سوابق آزمایش بیمار (Delta check):** در مورد بیماران بستری مورد استفاده واقع می گردد. وجود تغییرات شدید در مقایسه با نتایج قبلی باید مورد توجه و علت یابی قرار گیرد.
5. **بررسی هشدار (Alert check):** این نوع کنترل بیشتر مربوط به اشکالات تایپی می شود و می توان برنامه جوابدهی کامپیوتر را به نحوی 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 می باشد.
6. **تشخیص از طریق الگوهای مورد انتظار (Pattern recognition):** مثل تطابق اوره و کراتینین، کلر و بیکربنات و ....
7. **بررسی راندمی و دوتایی نمونه (Randomized duplicate sample):** می توان 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 می توان نمونه ای 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 می باشد.

**تهیه منحنی کنترل کیفی (Levey-Jenning) و طریقه استفاده از سرم کنترل:**

حدود کنترل کیفی منبع سرم آزمایشگاه جهت کنترل هر ماده، بدین طریق محاسبه میگردد:

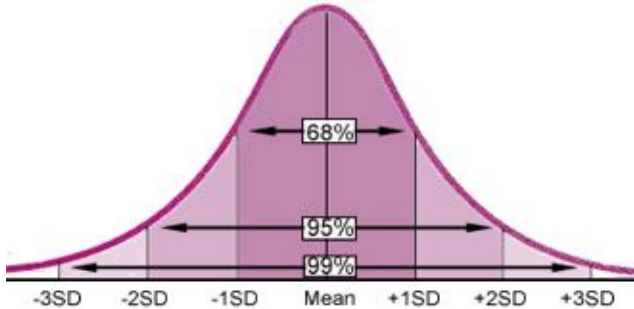
1. غلظت ماده مورد نظر را بطور مکرر در حالات مختلف طی روزهای کاری بمدت یک ماه در شرایط یکسان بدست می آورند.
2. میانگین (X) تمام اندازه گیریها را جهت ماده مورد نظر محاسبه می نمایند.
3. انحراف استاندارد (SD) را محاسبه می نماییم (رابطه زیر).
4. 2SD به میانگین اضافه تا بالاترین حد کنترل کیفی بدست آید.
5. 2SD از میانگین کم تا پایین ترین حد کنترل کیفی بدست آید. یعنی:

حد بالای کنترل کیفی =  $X + 2SD$

حد پایین کنترل کیفی =  $X - 2SD$

با فرض اینکه پراکندگی داده‌های کنترل کیفی بصورت زنگوله‌ای یا گوسی (Gaussian) باشد، 95 درصد تمام نتایج کنترل کیفی

بعدی یا 19 جواب از 20 جواب در داخل حدود کنترل کیفی 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:



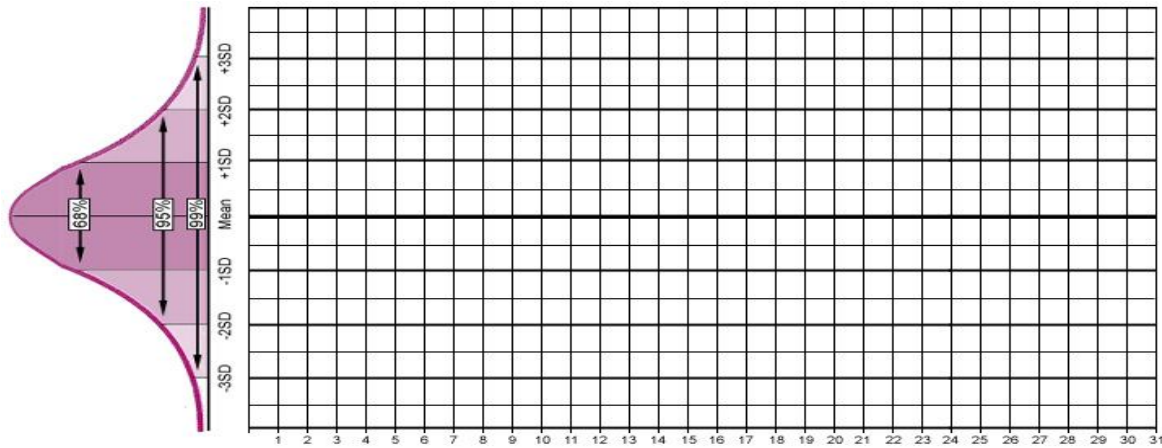
$$\text{حد بالای کنترل} = X + 2SD = 9/0 + 2(0/22) = 9/4 \text{ mg/dl}$$

$$\text{حد پایین کنترل} = X - 2SD = 9/0 - 2(0/22) = 8/6 \text{ mg/dl}$$

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.

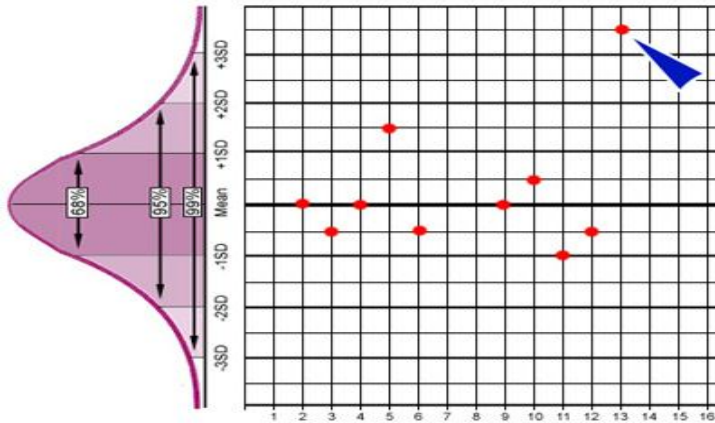
### ارزیابی نتایج:

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).

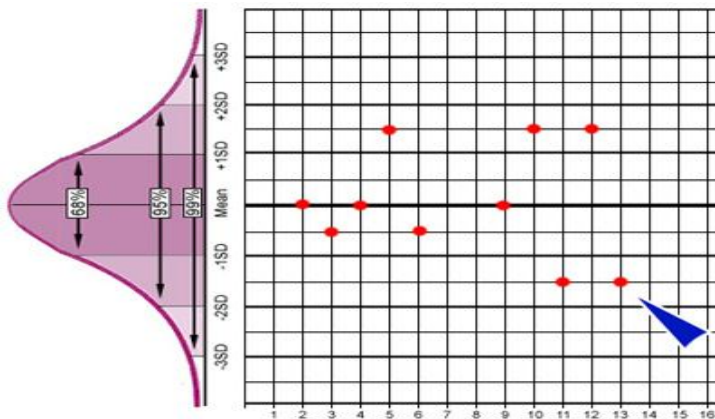


تا آنجائیکه نقاط رسم شده به صورت پراکنده در بالا و پایین میانگین درون محدوده کنترل قرار گیرند، روش را رسماً تحت کنترل نامیده و نتایج بیماران را می‌توان گزارش نمود. در صورت وجود مسائل نامبرده زیر، روش آزمایش تحت کنترل نبوده و نتیجه بیماران را نمی‌توان گزارش کرد (قوانین وستگارد):

1. اگر یک نتیجه خارج از محدوده  $\pm 2SD$  باشد به معنی یک **اخطار** است تا روش بکار رفته مجدداً مورد بررسی قرار گیرد (قانون  $1_2S$ ).
2. وقتی که یک نتیجه خارج از محدوده  $\pm 3SD$  باشد (قانون  $1_3S$ ).



3. وقتی که دو نتیجه متوالی خارج از محدوده  $+2SD$  یا خارج از محدوده  $-2SD$  باشد (قانون  $2s$ ).
4. وقتی که یک کنترل بالای  $+2SD$  و کنترل دیگر پایین  $-2SD$  باشد (قانون  $R_4s$ ).
5. وقتی که چهار نتیجه متوالی خارج از محدوده  $\pm 1SD$  باشد (قانون  $4_1s$ ).



6. وقتی که ده نتیجه متوالی در یک طرف میانگین قرار داشته باشد (قانون  $10x$ ).

### نحوه بررسی چارت Levey-Jenning:

هنگامی که مقادیر کنترل در محدوده بین  $\pm 2SD$  قرار دارد، نتایج بیماران قابل گزارش کردن می‌باشد. هنگامی که یکی از کنترلها خارج از محدوده  $\pm 2SD$  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 هر کدام 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 نظر همراه 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، بیپتھا، 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 تایمر و ...
- ج - Dispersion: تغییر شدید مقادیر کنترل و گاه 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:
98/5 mg/dl	78 mg/dl
میانگین (X):	
2/5 mg/dl	2 mg/dl
انحراف استاندارد (SD):	
<b>ضریب تغییرات: % 2/5</b>	<b>% 2/6</b>

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 جمع آوری نمونه اضافه می نمایند. خون تام به ندرت مورد نیاز آزمایشات شیمی کلینیکی و در حقیقت فقط مورد نیاز جهت اندازه گیری گازهای خون و اندازه گیری آمونیاک می باشد. 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 می باشد ولی پلاسما بدست آمده با ضد انعقاد مناسب نیز نمونه با ارزشی است و در بعضی از شرایط نسبت به سرم ترجیح داده می شود. چون جهت تهیه سرم نیاز به 15 تا 30 دقیقه انعقاد کامل خون قبل از سانتریفوژ می باشد، استفاده از پلاسما باعث تسریع آنالیز در حالتهای اورژانس میشود. بعلاوه پلاسما بدست آمده 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 لوله ها در دستگاه خودکار (اتوآنالیزر) می باشد. همچنین پلاسما نمونه مناسب جهت الکتروفورز نمی باشد، زیرا حضور فیبرینوژن باعث تفسیر غلط طرح الکتروفورزی می گردد.

از جمله مهمترین ترکیبات ضد انعقاد و محافظ (نگهدارنده) خون عبارتند از: هپارین، EDTA، سترات، اگزالات، فلورید-سدیم (نگهدارنده) و یدواستات سدیم (نگهدارنده).

### هپارین:

بطور وسیعی مورد استفاده قرار می گیرد و حداقل تداخل را با تستهای آزمایشگاهی دارد. این ترکیب بصورت نمکهای سدیم، پتاسیم، لیتیم و آمونیوم موجود می باشد. این ترکیب باعث تسریع عمل آنتی ترومبین III (که باعث خنثی شدن یا بی اثر شدن ترومبین و جلوگیری از تشکیل فیبرین از فیبرینوژن می گردد) می شود. عیب هپارین گرانی آن و اثر زودگذر آن بوده و در اسمیر خون رنگ آمیزی شده با روش رایت ایجاد زمینه آبی می نماید. هپارین همچنین در بعضی از آزمایشات تداخل نموده و باعث ایجاد خطا در نتیجه می گردد. به عنوان مثال این ترکیب باعث مهار فعالیت اسیدفسفاتاز می گردد. همچنین باعث تاثیر بر اتصال تری یدوتیرونین ( $T_3$ ) و تیروکسین به پروتئینهای حامل آنها گردیده و بدین ترتیب باعث افزایش در شکل آزاد (غیر متصل به Carrier protein) آنها می گردد.

### EDTA:

یک عامل شلاته کننده می باشد که تشکیل کمپلکسی با  $Ca^{2+}$  می نماید و بدین ترتیب از انعقاد خون جلوگیری مینماید ( $Ca^{2+}$  مورد نیاز برای عمل انعقاد می باشد). EDTA بیشتر بصورت نمکهای دی سدیم، دی پتاسیم یا تری پتاسیم مورد استفاده قرار می گیرد که این ترکیبات به راحتی حل می گردند. غلظتهای زیاد (بالتر از 2 mg/ml) آن باعث چروکیدگی گلبولهای قرمز می گردد. این ترکیب جهت آزمایشات هماتولوژی مناسب است زیرا اجزای سلولی خون را حفظ می نماید.

EDTA باعث مهار آلکالین فسفاتاز، کراتین کیناز، لوسین آمینوپپتیداز و لاکتات دهیدروژناز از طریق شلاته کردن کوفاکتورهای فلزی آنها می گردد. EDTA همچنین نباید در اندازه گیری  $Ca^{2+}$  و  $Fe^{2+}$  مورد استفاده قرار گیرد (در روشهای فتومتر). همچنین این ترکیب به دلیل داشتن نیتروژن در سنجش نیتروژن اوره خون (BUN) تداخل می نماید. از طرف دیگر در سنجش سدیم و پتاسیم (الکترولیتهای خون) نیز نباید از نمکهای سدیم و پتاسیم آن استفاده نمود.

### فلورید سدیم:

بیشتر به عنوان عامل مهارکننده گلیکولیز مورد استفاده قرار می گیرد، زیرا خاصیت ضد انعقادی ضعیفی دارد. این ترکیب (بعنوان نگهدارنده) به همراه ضد انعقادهای دیگر از قبیل اگزالات پتاسیم مورد استفاده قرار می گیرد. در دمای  $25^{\circ}C$  (دمای اتاق) پایداری مقدار قند به مدت 8 تا 24 ساعت می باشد و در دمای  $4^{\circ}C$  پایدار آن به مدت 48 تا 72 ساعت می باشد. بدون استفاده از ماده نگهدارنده، غلظت گلوکز

خون تقریباً 10 mg/dl در هر ساعت در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  کاهش می‌یابد. میزان کاهش در نوزادان بخاطر بالا بودن 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 بعلا 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 از جمله 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  $\text{Ca}^{2+}$  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 آلکالین فسفاتاز و تحریک فعالیت اسیدفسفاتاز (هنگامی که فیل فسفات به عنوان سوبسترا مورد استفاده قرار می‌گیرد) می‌گردد. بعلا اینکه سیترات با مولیدات 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  $\text{Ca}^{2+}$  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، آلکالین فسفاتاز و لاکتات دهیدروژناز می‌گردد.

### یدواستات:

این ترکیب در غلظت 2 mg/ml به عنوان عامل مهارکننده گلیکولیز و جانیشینی 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 کراتین کیناز را مهار می‌نماید.

## آزمایشات ارزیابی وضعیت قند خون

اندازه گیری میزان قند در مایعات بدن از جنبه های گوناگون حائز اهمیت می باشد. تشخیص بیماری دیابت یکی از اهدافی است که در بررسی های آزمایشگاهی قند در مایعات بدن مورد توجه قرار می گیرد. بطور کلی می توان گفت که مجموعه آزمایشات اندازه گیری 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:

- ✓ اندازه گیری گلوکز در نمونه ها و زمانهای مختلف [مانند: گلوکز پلاسمایی ناشتا، 2 ساعت پس از صبحانه، 4 یا 5 بعد از ظهر]
- ✓ اندازه گیری هموگلوبین گلیکوزیله (HbA<sub>1c</sub>)
- ✓ اندازه گیری گلوکز ادرار (که در گذشته انجام می گردید و ارزش چندانی ندارد).

### آزمایش قند خون (Blood sugar):

در بعضی از شرایط بنا به ضرورت طبیب معالج بدون توجه به وضع تغذیه ای بیمار درخواست قند خون می کند (که به دلیل نامشخص بودن وضعیت تغذیه ای 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 می کند. 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 می باشد که براساس مقادیر آن بیماران در سه گروه قرار می گیرند:

A. مقادیر کمتر از 110 mg/dL : که فرد طبیعی می باشد.

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.

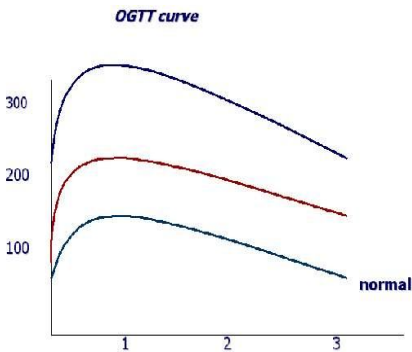
C. مقادیر برابر یا بیشتر از 126 mg/dL : که بعد از تایید برای بار دوم **دیابت** را مطرح می نماید.

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



آزمایش تحمل گلوکز خوراکی (OGTT) : Oral Glucose Tolerance Test



☒ در مبتلایان به تحمل مختل گلوکز (Impaired Glucose Tolerance) مقادیر به بالاتر از 200 mg/dL تجاوز نموده و بعد از 2 ساعت بین 140 تا 199 باقی می ماند.

☒ در افراد دیابتی مقادیر به بالای 200 رفته و بعد از 2 ساعت همچنان بالا باقی می ماند.

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 رژیم باشد که روزانه حداقل 150 گرم کربو هیدرات در رژیم وی باشد.
- 2) این آزمایش برای بیماران بستری توصیه نمی شود چون منحنی آنها شبیه به اشخاص دیابتی می گردد.
- 3) عدم مصرف داروهای که روی قند خون تأثیر دارند. مانند سالیسیلات ها، دیورتیک ها، داروهای ضد صرع در صورت مصرف این داروها باید سه روز قبل از آزمایش آنها را قطع نماید. خانمی که قرص ضدبار داری مصرف می کند باید در یک دوره ماهیانه آنرا 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 می تواند آب بنوشد.

در منحنی تحمل طبیعی مقدار قند خون ناشتا در حد طبیعی بوده که در مورد سرم یا پلاسما 70-110 mg/dl است. حداکثر افزایش گلوکز خون بعد از 30 الی 60 دقیقه بوده و از سطح آستانه کلیوی بالاتر نیست. بنابراین در ادرار قند دیده نمی شود. در حدود 2 ساعت میزان قند خون کمی پایین تر از مقدار ناشتا بوده و سپس به آرامی به سطح حالت ناشتا باز می گردد.

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

**هموگلوبین گلیکوزیله (Glycosylated hemoglobin):**

هموگلوبین موجود در گلبونهای قرمز خون بالغین و بچه‌ها شامل هموگلوبین A (90-95%)، هموگلوبین A<sub>2</sub> (کمتر از 2/5%)، هموگلوبین F (کمتر از 0/5%)، هموگلوبین A<sub>1a</sub> (1/6%)، هموگلوبین A<sub>1b</sub> (0/8%)، هموگلوبین A<sub>1c</sub> (3-7%) می‌باشد. به مجموع HbA<sub>1a</sub>، HbA<sub>1b</sub> و HbA<sub>1c</sub> **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 وجود آمدن 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 دهنده سطح گلوکز خون در همان زمان است در حالیکه اندازه‌گیری هموگلوبین گلیکوزیله نشان دهنده 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 نگهدارنده فلورید سدیم استفاده کرد. نمونه‌ها در دمای 2-6<sup>0</sup>C 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 ایمنوآسی (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 گلوله‌ها 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°C) پایدار می‌ماند؛ در دمای اتاق (25°C) 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 مهارکننده 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 جمع‌آوری خون مویرگی در این آزمایش این مطلب باید در برگه جواب آزمایش قید شود تا پزشک بتواند بدرستی نتایج را ارزیابی نماید.

### هیپرگلیسمی (Hyperglycemia) در موارد زیر نیز دیده می‌شود:

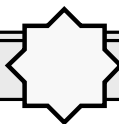
- کاهش انسولین به دلیل التهاب پانکراس (pancreatitis)، سرطان پانکراس، هموکروماتوز (Haemochromatosis) و یا برداشتن کامل پانکراس.
- افزایش هورمون رشد (آکرومگالی)
- افزایش ACTH و کورتیزول
- افزایش اپی نفرین (فتو کروموسیتوما)
- افزایش تیروکسین (تیروتوکسیکوز)
- اثر بعضی از داروها (استروئیدها، دیورتیک‌های تیوآزیدی،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

### کاهش قند خون (Hypoglycemia):

در هیپوگلیسمی قند خون شخص پایینی تر 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 نشانه‌ها 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 گلوکاگون
- 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 اندازه گیری گلوکز در مایعات بیولوژیک را می توان به صورت زیر تقسیم بندی نمود:

### الف - روشهای شیمیایی (Chemical methods):

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

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

\* روش Folin-wu

\* روش Somogyi-Nelson

\* روش Benedict

2-1- استفاده از اکسندهایی به جز  $\text{Cu}^{2+}$  مانند فری سیانید.

(2) روشهای تراکمی (Condensation)

\* روش ارتوتولوئیدین (O-Toluidine)

### ب) روشهای آنزیمی (Enzymatic method):

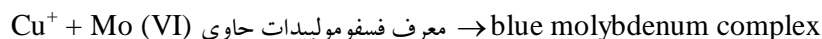
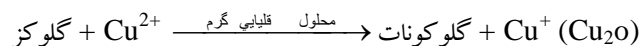
\* روش گلوکز اکسیداز

\* روش هگزوکیناز

\* روش گلوکز دهیدروژناز

## روش فولین - وو (Folin-Wn)

اساس این روش بدین صورت است:



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

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

تداخل کننده منفی:

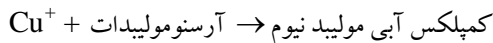
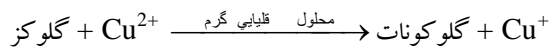
- اکسیداسیون مجدد  $\text{Cu}^{+}$  توسط اکسیژن

تداخل کننده مثبت:

- اجسام احیا کننده موجود در سرم که می توانند سبب کاهش  $Cu^{2+}$  گردند از جمله: قندهای احیا کننده دیگر، کراتینین، اسیداوریک، ترکیبات سولفیدریل دار، اسیدآسکوربیک

روش Somogyi-Nelson:

اساس این روش بدین صورت است:



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

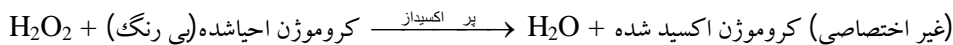
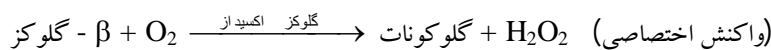
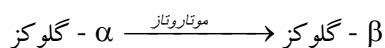
روش اورتوتولوئیدین (Ortho-Toluidine):

برخی از آمین های آروماتیک می توانند 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 می نمایند. آمین های مورد استفاده عبارتند از آنیلین، بنزیدین، 2-آمینو بی فیل، اورتوتولوئیدین که اکثر این مواد سرطان زا می باشند. معمولاً در اندازه گیری قند خون شدت رنگ در طول موج 630nm سنجیده می شود. چون در این طول موج جذب ترکیبات رنگی حاصل از واکنش آلدوپنتوزهای با معرف کم بوده لذا خطای حاصل از وجود آنها حداقل می شود.

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، فلئورید سدیم در غلظت بیش از 5 mg/dl

روش گلوکز اکسیداز/پراکسیداز:

این روش آنزیمی بر پایه واکنش های زیر می باشد:

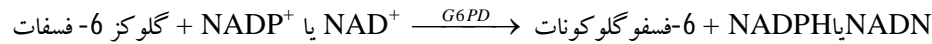
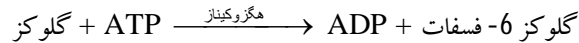


مواد تداخل کننده منفی: اسیداوریک، اسیدآسکوربیک، بیلی روبین، گلوکاتئون (به دلیل واکنش با  $H_2O_2$ )، ناخالصی کاتالاز

موجود در آنزیم پراکسیداز مصرفی (به دلیل تجزیه  $H_2O_2$ ) هموگلوبین (به دلیل خاصیت پراکسیدازی)، تیمول (به دلیل مهار آنزیم ها). معمولاً تا غلظت گلوکز 500 mg/dl منحنی استاندارد خطی است.

در روش گلوکز اکسیداز  $O_2$  با استفاده از الکتروود اکسیژن میزان مصرف اکسیژن سنجیده می شود و از روی آن مقدار گلوکز تعیین می گردد. در این روش جهت از بین بردن  $H_2O_2$  ایجاد شده از اتانل یا I<sup>-</sup> استفاده می شود. هموگلوبین در این روش به دلیل جذب  $O_2$ ، ایجاد تداخل مثبت می کند.

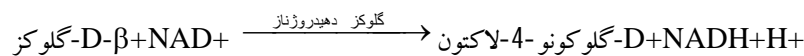
## روش هگزوکیناز:



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 فلئورید 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 سترات نیز می‌توان استفاده کرد. نمونه‌های همولیزی که شامل بیش از 0/5 gr/dl هموگلوبین باشند نامناسب 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-(پاراایدوفنیل) - 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.



جهت کم شدن زمان رسیدن به پایان واکنش آنزیم مواتر تاز نیز اضافه می‌شود. 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 فلئورید، بدواستات، هپارین، EDTA، سترات و اگزالات در این روش تداخل ایجاد نمی‌نمایند.

## لیپیدها، اختلالات متابولیسم و روشهای اندازه‌گیری آنها

### مقدمه:

لیپیدها از ترکیبات آلی و معمولاً نامحلول در آب و مایعات بیولوژیک بوده که در سرم به صورت امولسیون (شیلومیکرونها) و یا به صورت ترکیب با سایر پروتئینها (لیپوپروتئین) یافت شده و به عنوان ذخایر اصلی انرژی در بدن بکار می‌روند. لیپیدهای پلازما 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 ارزیابی چربی‌های خون در آزمایشگاههای بالینی بیش از پیش صورت می‌پذیرد و بخش مهمی از روشهای بیوشیمی را به خود اختصاص می‌دهد. لیپیدهای اصلی پلازما شامل کلسترول، تری‌گلیسریدها و فسفولیپیدها بوده و مقادیر کمتری نیز به صورت اسیدهای چرب آزاد (FFA)، منو و دی‌گلیسریدها، 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 پلازما:

**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. حدوداً 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 پاتوزن آترواسکلروز و بیماریهای قلبی حائز اهمیت هستند. مقادیر نسبی کلسترولهای استریفیه و آزاد از معیار مناسبی در ارزیابی عملکرد کبد به شمار می‌آید. 60-70 درصد از کلسترول تام سرم در لیپوپروتئینهای با دانسیته کم (LDL)، و 20-35 درصد آن به صورت (HDL)، و 12-15 درصد آن در لیپوپروتئینهای VLDL موجود می‌باشند. از علل مهم افزایش کلسترول سرم (هیپرکلسترولمی یا Hypercholesterolemia) 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 گلوومولونفریت مزمن تا 600-700 mg/dl افزایش می‌یابد.
- 3- هیپوتیروئیدسم (مثلاً در میکزودم): که در این حالت گیرنده‌های LDL در سلولهای کبدی کاهش می‌یابد.
- 4- در یرقان انسدادی (کلستاز): هنگامی که انسداد مجاری صفراوی بزرگ (از جمله بدلیل وجود سنگهای صفراوی و ...) وجود دارد.
- 5- در دیابت ملیتوس: به علت افزایش استیل‌کوآنزیم A 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 Hypocholesterolemia) سرم به قرار زیر است:

- 1- هیپرتیروئیدسم.
- 2- سوء تغذیه شدید (Sever malnutrition).
- 3- سندرم سوء جذب (Malabsorption syndrome).
- 4- آسیب پارانشیم کبدی.
- 5- کم خونی شدید یا بدخیم (Pernicious anemia).
- 6- یرقان همولیزی.

7- هیپوتالپوپروتئینمی و آبتالیپوپروتئینمی .

8- کاهش در دوره درمان با کولوفیبرات ، کلستیرامین و نیکوتینیک اسید .

**تری گلیسریدها (TG):** یا تری آسیل گلیسرولها استرهای گلیسرول هستند که دارای زنجیره‌های بلند اسید چرب بوده و معمولاً 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. اکثراً به صورت شیلومیکرون و VLDL در پلاسما حل شده و در عین حال LDL و HDL نیز حاوی مقادیر جزئی از آن است. **افزایش تری گلیسریدهای سرم (هیپرتری گلیسریدمی)** در موارد زیر دیده می‌شود:

- 1- هیپرلیپیدمی خانوادگی: افزایش متوسط تری گلیسریدها (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 نفرس ، سندرم نفروتیک و هیپوتیروئیدسم .

**کاهش تری گلیسریدهای سرم (هیپوتری گلیسریدمی)** در مواردی مانند هیپوتالپوپروتئینمی ، آبتالیپوپروتئینمی مادرزادی ، سوء تغذیه و سوء جذب دیده می‌شود .

**نکته 1:** باید در نظر داشت که سنجش تری گلیسریدها در شرایط ناشتای

12-24 ساعته صورت می‌گیرد.

**نکته 2:** افزایش تری گلیسریدها به تنهایی عامل تعیین کننده در بروز بیماریهای

آترواسکلروزی نبوده و مستقلاً به عنوان عامل خطر (Risk factor) شناخته نمی‌شود.

**فسفولیپیدها (PL):** از مهمترین فسفولیپیدهای خون میتوان به لسیتین (فسفاتیدیل کولین) و اسفنگومیلین اشاره نمود. فسفولیپیدها عمدتاً 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 تی ساکس** 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.

**نکته 1:** منظور از اسیدهای چرب آزاد ، اسیدهای

چرب غیر استریفیه می‌باشد.

**نکته 2:** اسیدهای چرب آزاد پلاسما عمدتاً به وسیله

آلبومین انتقال می‌یابد.



### لیپوپروتئینها (Lipoproteins)

همانطور که قبلا اشاره شد لیپیدها در آب و مایعات بیولوژیکی نامحلول اند و انتقال آنها در خون به واسطه لیپوپروتئینها که ترکیبی از مواد لیپیدی با پروتئینهای محلول در آب می‌باشند، صورت می‌گیرد. لیپوپروتئینها را بر حسب اندازه، خصوصیات فیزیکوشیمیایی، و نیز تحرک الکتروفورزی، وزن مخصوص و میزان شناوری (Floation rate) تقسیم‌بندی می‌کنند. 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 از نظر فیزیولوژیکی و در تشخیص بالینی مهمند:

- 1) **شیلومیکرونها** که از جذب تری‌آسیل‌گلیسرولها در روده بوجود می‌آیند،
- 2) **لیپوپروتئینهای بسیار کم چگالی (VLDL یا لیپوپروتئینهای پره- $\beta$ )** که حاصل صدور تری‌آسیل‌گلیسرول از کبد هستند،
- 3) **لیپوپروتئینهای کم چگالی (LDL یا لیپوپروتئینهای  $\alpha$ )** که نمایانگر مرحله نهایی کاتابولیسم VLDL هستند،
- 4) **لیپوپروتئینهای پر چگالی (HDL یا لیپوپروتئینهای  $\alpha$ )** که در متابولیسم شیلومیکرونها و VLDL و نیز انتقال کلسترول دخیلند.

**تکنه:** لیپید بارز شیلومیکرونها و VLDL تری‌آسیل‌گلیسرول،  
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  $\alpha$ ، پره- $\beta$ ،  $\beta$  تفکیک کرد و با روشهای ایمونوالکتروفورز به طور دقیقتر شناسایی نمود.

### شیلومیکرونها : Chylomicrones

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 تری‌آسیل‌گلیسرولهای اگزوزن (با 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 E, Apo C, Apo A, Apo B-48 هستند. تری‌آسیل‌گلیسرولهای موجود در شیلومیکرونها، تحت تاثیر لیپازهای لیپوپروتئینی خون بتدریج هیدرولیز شده و حذف می‌گردند و ذرات کوچکی به نام بازمانده لیپوپروتئین یا Lipoprotein remnants را از خود به جای می‌گذارند.

### لیپوپروتئینهای بسیار کم چگالی (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 اندوزن (با 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 پره- $\beta$  قرار می‌گیرند. ذرات مزبور تحت تاثیر لیپوپروتئین لیپاز، بتدریج هیدرولیز شده و تری-گلیسریدهای کوچکتر آن جدا می‌گردند. 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 کم چگالی (LDL):

این لیپوپروتئینهای با دانسیته کم Low Density Lipoprotein حاوی مقادیر بیشتر (حدوداً 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 عمدتاً 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  $\beta$  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 فAMILI
- 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 (اکثراً به صورت استریفیه)، حدود 30 درصد فسفولیپید و مقادیر جزئی تری گلیسرید می‌باشد. HDL را میتوان به دو زیرگروه اصلی HDL<sub>2</sub> و HDL<sub>3</sub> تقسیم نمود. این لیپوپروتئین توسط سلولهای کبد و بافت مخاطی روده سنتز میشوند و در الکتروفورز لیپیدها در منطقه  $\alpha_1$  حرکت دارند. بعلا 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 می‌یابد و بالعکس.

علل مختلف افزایش کلسترول HDL عبارتند از:

- 1) ورزش و فعالیتهای بدنی.
- 2) افزایش کلیرانس تری گلیسریدهای 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)، جاقی، فقدان فعالیت و استعمال دخانیات.
- 3) دیابت شیرین (ملیتوس)، هیپوتیروئیدیسم و افزایش تری گلیسرید 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 فAMILIAL و اختلالات ژنتیکی نادر.

### روشهای شیمیایی اندازه گیری تری گلیسرید (TG):

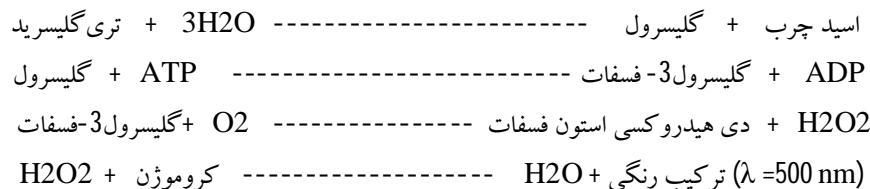
مراحل این روشها عبارت است از:

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

فرمالدئید از طریق واکنش با اسید سولفوریک ایجاد رنگ صورتی می نماید که با اندازه گیری شدت رنگ، میزان TG بدست می آید.

### روشهای آنزیمی اندازه گیری تری گلیسرید (TG):

در این روشها از روی مقدار گلیسرول حاصل از هیدرولیز TG مقدار تری گلیسرید محاسبه می گردد که روش متداول بصورت زیر است:



گلیسرول آزاد موجود در پلاسما (که مقدار آن ناچیز است) و بیلروبین در این روش تداخل ایجاد می نمایند. در صورت استفاده از پلاسمای تهیه شده با EDTA باید نتایج در 1/03 ضرب شود. میزان طبیعی تری گلیسرید کمتر از 165 mg/dl می باشد.

### آنالیز کمی کلسترول:

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

#### (1) شیوه مستقیم (direct) یا سنجش تک مرحله ای:

در این شیوه از سرم یا پلاسما مستقیماً جهت اندازه گیری لیپید استفاده می گردد. اشکال عمده این روش حضور مواد تداخل کننده در نمونه می باشد.

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

##### الف - استخراج لیپیدها (روش دو مرحله ای).

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

##### ب - استخراج همراه با هیدرولیز (روش سه مرحله ای).

جهت هیدرولیز می توان از مواد شیمیایی یا آنزیمها استفاده نمود.

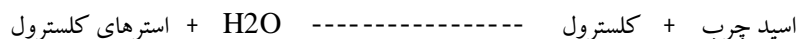
##### پ - استخراج همراه با هیدرولیز و راسب نمودن (روش چهار مرحله ای).

بعد از استخراج و هیدرولیز بوسیله افزایش دیژیتونین، کلسترول راسب می گردد. بعد از جداسازی و شستشوی رسوب حاصل

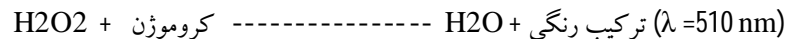
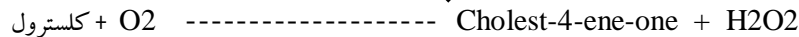
بوسیله هیدرولیز اسیدی کلسترول از دیژیتونین جدا و سنجش می شود.

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

### روش آنزیمی اندازه گیری کلسترول:



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



### روش شیمیایی لیبرمن-بورچارد (Liebermann-Burchard):

در این روش کلاسترول 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 کلاسترول آزاد و استریفیه به یک نسبت ایجاد رنگ نمی‌نمایند. بیلروبین 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 آهن III است. رنگ حاصل در این روش دارای شدت و پایداری بیشتری نسبت به لیبرمن-بورچارد است.

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

### اندازه‌گیری لیپوپروتئینهای پلاسمایی:

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

$$\text{VLDL کلاسترول} - \text{HDL کلاسترول} = \text{کلاسترول تام} = \text{LDL کلاسترول}$$

### 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 نگه داشتن وزن بدن.
4. عدم انجام ورزش.
5. عدم وجود هیپرشیلو میکرومی.
6. عدم مصرف الکل.
7. عدم وجود استرس و هیجانان 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 درجه C) 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. شیف آب از RBC بدون پلاسما و در نتیجه رقیق شدن آن در صورت استفاده از ضد انعقادهایی مانند اگزالات، سترات و فلوئورید.

مقادیر طبیعی در سرم (برحسب mg/dl):

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

## پروتئین های پلازما

صدها پروتئین مختلف در پلاسمای خون حضور دارند که مجموعاً بنام Plasma Proteins معروفند. غلظت این پروتئینها حاصل تعادل بین سنتز (Anabolism) و کاتابولیسم (Catabolism) میباشد. این پروتئینها شامل: پروتئینهای فاز حاد (Acute Phase Proteins) یا APPs پروتئینهای ناقل، فیبرینوژن و فاکتورهای انعقادی دیگر، اجزای کمپلمان، ایمونوگلوبولینها (Ig)، مهارکننده های آنزیمی و... میباشد. سنتز اکثر این پروتئینها در کبد صورت میگیرد و به درون جریان خون وارد می گردند و همچنین تخریب (کاتابولیسم) شدن این پروتئینها در کبد صورت میگیرد.

این پروتئین ها اعمال بسیار متنوعی دارند که از آن جمله میتوان به عمل انتقال مواد و ترکیبات مختلف در خون، 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 آگروسیتوز نیز صورت میگیرد. پروتئینها در جریان الکتریکی در محیطهای پایه نظیر ژل آگارز، استات سلولز و... و حرکت کرده و بر حسب خصوصیات فیزیکی و میزان و نوع بار الکتریکی به طرف آند یا کاتد حرکت می نمایند. در صورت استفاده از محیط اسیدی گروه آمین ( $-NH_2$ ) اسیدهای آمینه یونیزه شده و بعلت وجود بار الکتریکی مثبت به طرف کاتد حرکت می کنند. در محیطهای قلیایی عامل کربوکسیل یونیزه شده ملکولهای حامل بار منفی به طرف آند حرکت می کنند. 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: Albumine, Prealbumine,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  ( $\beta_1, \beta_2$ ),  $\gamma$  میسر میسازند. پس از اتمام الکتروفورز، نوار مزبور را در محلول رنگ آمیزی 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 شده اند اندازه گیری و طرح مزبور با طرح (یا الگوی) طبیعی مورد مقایسه قرار میگیرد. تفسیر الکتروفورز پروتئینهای سرم که با استفاده از الگوهای خاص صورت میگیرد ویژگیهایی را در ارتباط با بیماریهای مختلف (سیروز، مالتیپل میلوما، سندرم نفروتیک 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 می باشد و مقدار گلوبولینها بین  $gr/dl$   $2-3/5$  میا شد. از جمله پروتئینهایی که در دسته  $\alpha_1$ -گلوبولینها قرار دارد:  $\alpha_1$ -اسید گلیکوپروتئین (AAG)،  $\alpha_1$ -آنتی-تربسین (AAT) و  $\alpha_1$ -فیتوپروتئین (AFP) می باشد. از دسته  $\alpha_2$ -گلوبولینها می توان به  $\alpha_2$ -ماکروگلوبولین (AMG)، سرولوپلاسمین (Cp) و هاپتوگلوبین (Hp) اشاره نمود. از دسته  $\beta_1$ : ترانسفرین (TRF) (سیدروفیلین) و فاکتور کمپلمان  $C_4$  و از گروه  $\beta_2$  میتوان به  $\beta_2$ -میکروگلوبولین (BMG) و  $C_3$  اشاره نمود. از جمله پروتئینهایی که در ناحیه  $\gamma$  ظاهر میشوند: انواع مختلف  $\gamma$ -گلوبولینها (آنتی بادیها) از قبیل IgG, IgM و... و همچنین پروتئین واکنشگر C یا CRP را می توان 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 عموماً 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 متأثر از این پاسخ (پاسخ فاز حاد) هستند معروف به پروتئینهای فاز حاد (APP) یا Acute Phase Protein میباشدند. غلظت بعضی از آنها در پاسخ به APR افزایش می یابد که به نام Positive APPs (پروتئینهای فاز حاد مثبت) معروف هستند. از جمله پروتئینهایی که در این دسته جای میگیرند می توان از:  $\alpha_1$ -اسید گلیکوپروتئین (AAG)،  $\alpha_1$ -آنتی-تربسین (AAT)، سرولوپلاسمین (Cp) و هاپتوگلوبین (Hp)،  $C_4$ ،  $C_3$  و CRP نام برد. غلظت گروه دیگری از پروتئینها در پاسخ به APR کاهش مییابد که به نام Negative APPs (پروتئینهای فاز حاد منفی) معروفند. مانند: TTR، آلبومین و ترانسفرین (TRF).

## آلبومین

یک پروتئین گلوبولی کوچک ، با وزن ملکولی 66 KDa می باشد. پروتئین عمده پلاسما محسوب می گردد و بیشتر از نیمی از پلاسما را تشکیل می دهد. به همین علل این پروتئین جزو پروتئین عمده و اصلی در مایعات خارج عروقی بدن از قبیل مایع بینابینی، ادرار و مایع آمنیوتیک میباشد تقریباً 60% آلبومین تام بدن در فضاهای خارج عروقی حضور دارد. این ترکیب فاقد زنجیره جانبی کربوهیدراتی میباشد ولی به میزان زیاد در آب محلول می باشد و این حلالیت به علت بار خالص منفی زیادی است که در pH فیزیولوژیکی در سطح آن وجود دارد.

### بیوشیمی و عملکرد آلبومین

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 کلئیدی (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 می باشد که تعادل مداومی بین آن دو ایجاد می نماید. آلبومین همچنین به بسیاری از ترکیبات باند شده و آنها را انتقال می دهد که عمدتاً عبارتند از: اسیدهای چرب آزاد (Free Fatty Acids)، فسفولیپیدها (PL)، یونهای فلزی، اسیدهای آمینه، هورمونها، بیلی روبین و...

### اهمیت بالینی

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

**آنآلبومینمی (Analbuminemia):** افرادی که این نقص ژنتیکی نادر را دارا هستند ، سطح پلاسمایی آلبومین آنها کمتر از 0/5 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 می باشد .

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

**دفع ادراری (Urinary loss):** گلوامرول کلیوی به عنوان یک غربال ملکولی عمل می کند 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 می گردد. به ازای هر گرم کراتینین 20mg آلبومین در ادرار طبیعی وجود دارد. دفع بیشتر از این مقدار نشان دهنده افزایش میزان فیلتراسیون و وجود آسیب توبولی می باشد. هر چند افزایش میزان فیلتراسیون در **تمرینات ورزشی** و در **رتب** 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 می باشد یا خیر. به استثنای حالت آنآلبومینمی ارثی، پایین ترین سطح آلبومین پلاسمایی در افراد مبتلا به سندرم نفروتیک دیده میشود.

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

**سؤ تغذیه ی پروتئین (Malnutrition):** توجه به میزان آلبومین سرم می تواند در تعیین و ارزیابی وضعیت تغذیه ای پروتئینی مفید باشد هر چند در اغلب موارد به ویژه در کشور های توسعه یافته کاهش میزان البومین به APR (واکنش فاز حاد) نسبت داده می شود.

### $\alpha_1$ - اسید گلیکوپروتئین (AAG):

به نام **اوروسمو کوئید** نیز معروف بوده و در کبد سنتز می شود. بخش عمده (45%) ساختار آن را کربو هیدرات (اسید سیالیک 12%) تشکیل میدهد. در APR افزایش و در سندرم نفروتیک کاهش می یابد (به دلیل وزن ملکولی پایین).

### $\alpha_1$ - آنتی تریپسین (AAT):

از دسته Serpin ها یا مهارکننده های پروتئیناز دارای Ser در جایگاه فعالشان می باشد. 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 می باشد. **فقدان یا کاهش آن باعث از بین رفتن خاصیت ارتجاعی برنشا و ایجاد آمفیوزم می گردد.** جرم ملکولی آن 52 KDa است. پس در ناهنجاریهای از دست دهنده پروتئین مقدار آن کاهش می یابد. در APR افزایش آن دیده می شود.

### $\alpha_1$ - فیتوپروتئین (AFP):

**آنالوگی از آلبومین** بوده و تقریباً 4% کربو هیدرات دارد و در دوران زندگی جنینی به عنوان پروتئین سرمی غالب محسوب میگردد. افزایش آن در مرگ جنینی، خونریزی های جنینی - مادری و کارسینوما سلول کبدی دیده می شود. کاهش آن در زنان حامله ای که دارای جنین مبتلا به سندرم داون (تری زومی 21) و یا تری زومی 18 هستند دیده می شود.

### $\alpha_2$ - ماکرو گلوبولین (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.

### سرو لو پلاسمین (Cp):

یک گلوبولین حاوی 95% مس تام پلاسم می باشد. در APR افزایش می یابد. **در بیماری ویلسون و منکه کاهش آن دیده میشود**، نیز در اثر 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.

### $\beta_2$ - میکرو گلوبولین (BMG):

بدون کربو هیدرات بوده و به عنوان بخشی از آنتی ژنهای لکوسیت انسانی (HLAs) محسوب میگردد. به دلیل اندازه کوچک (11/8 KDa) از غشای گلوبولینی عبور می نماید اما به طور طبیعی تقریباً 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 ظاهر میگردد) میباشد.**

### هاپتو گلوبین (Hp):

یک  $\alpha_2$ -گلوبولین میباشد و در کبد سنتز میشود. این گلوبولین سریعاً به هموگلوبینهای آزاد شده از اریتروسیتها و RBCهایی که لیز شده اند متصل می گردد و باعث جلوگیری از دفع Fe, Hb می گردد 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، تقریباً 1% RBC از گردش خون



برداشته میشوند یا به طور روزانه در داخل عروق خونی تخریب میگردند. افزایش تخریب RBC 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 **پره آلبومین** میباشد. پروتئین ناقل T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> 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 می گردد و بعد از جدا شدن از TTR بوسیله کلیه ها از گردش خون حذف می گردد. RBP در آسیب توبول پروگزیمال کلیوی افزایش و در APR و بیماریهای کبدی و سوء تغذیه کاهش می یابد.

### پروتئین واکنشگر C (C-Reactive Protein) :

پروتئین متصل شونده به پلی ساکارید می باشد. ابتدا در سال 1930 مشخص گردید که این پروتئین به پلی ساکارید C در دیواره سلولی باکتری استرپتوکوکوس پنومونیه (*Streptococcus Pneumoniae*) متصل می گردد. سنتز آن در کبد صورت می گیرد و قادر به اتصال به ترکیباتی مانند: فسفریل کولین، فسفاتیدیل کولین و پلی آنیونهای (مانند DNA و...) علاوه بر پلی ساکارید موجود در دیواره باکتریها، قارچها و پارازیتهای پروتوزوایی می باشد. CRP باعث فعال نمودن مسیر کلاسیک کمپلمان و مشابه با آنتی بادیها باعث اپسونیزاسیون، فاگوسیتوز و لیز ارگانیسیمهای مهاجم می گردد. CRP به عنوان یکی از حساس ترین 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 شده اند که این روشها را میتوان در چهار گروه تقسیم بندی نمود :

- اندازه گیری 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 گلوبولینها، 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)

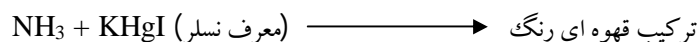
### الف- روش فتو متری مستقیم (Direct photometry) :

از طول موجهای نور UV (Ultra Violet) میتوان برای سنجش میزان پروتئینها در یک نمونه میتوان استفاده نمود. معمولاً از طول موجهای 270-290 nm و 200-225 nm استفاده می‌گردد. جذب در 280 nm و در pH=8 عمدتاً 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 عمدتاً 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 تقریباً 70% میزان جذب در 205 nm مربوط به باندهای پپتیدی می‌باشد، نتیجه اینکه در چنین طول موجی تداخل حاصل از Tyr, Trp ناچیز می‌باشد. 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 اسیدهای نوکلئیک از رابطه زیر میتوان استفاده نمود :

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

### ب- روش کج‌دال (Kjeldahl) :

روش کج‌دال 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 ( $\text{NH}_4^+$ ) آزاد می‌گردد. سپس غلظت یون آمونیوم آزاد شده به وسیله روش‌هایی مانند تیتراسیون و نسلریناسیون تعیین می‌گردد. میزان آمونیاک به دست آمده در 6/25 ضرب می‌گردد و بدین ترتیب مقدار عددی بدست آمده میزان پروتئین موجود در نمونه را نشان خواهد داد. از این متد به علت زمان بر بودن استفاده زیادی نمی‌گردد.



### ج- روش فولین - سیو کالتو Folin-Ciocalteu (یا لوری) :

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

### د- روش بیوره (Biuret) :

در این روش از معرف بیوره (یون  $\text{Cu}^{++}$  در یک محلول قلیایی حاوی تارتارات سدیم پتاسیم) استفاده می‌گردد. تارتارات سدیم پتاسیم با یونهای  $\text{Cu}^{++}$  ایجاد کمپلکس نموده و از رسوب آن جلوگیری مینماید. ترکیباتی که حداقل دارای دو اتصال یا پیوند پپتیدی باشند (حداقل تری پپتید باشند) با یون مس در چنین محیطی کمپلکس بنفش رنگ مینماید. شدت رنگ ایجاد شده با تعدادی پیوندهای پپتیدی نسبت مستقیم دارد. نام این آزمایش از نام ترکیب بیوره که با یون  $\text{Cu}^{++}$  کمپلکس میدهد گرفته شده است. رنگ حاصل به دلیل تولید پیوند کنوردینانس بین  $\text{Cu}^{++}$  و چهار نیتروژن (2 نیتروژن از هر پلی پپتید) بوجود می‌آید. رنگ تولید شده بوسیله تارتارات (یا سترات) پایدار می‌گردد. از سرم یا پلاسما می‌توان استفاده نمود، هر چند میزان پروتئین اندازه‌گیری شده در پلاسما نسبت به سرم مقداری بیشتر می‌باشد (به علت وجود فیبرینوژن در پلاسما) که این مقدار تقریباً 0/4 - 0/2 gr/dl بیشتر از سرم است. پروتئین تام در دمای اتاق به مدت 1 هفته، در دمای یخچال ( $4^\circ \text{C}$ ) به مدت 1 ماه و در دمای  $20^\circ \text{C}$  - 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 کوماسی بریلیانت بلو (CBB) و برم کرزول گرین (BCG) استفاده میگردد. یکی از محدودیتهای این روشها، تمایل نامساوی پروتئینها برای باندشدن به این رنگها می باشد 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 (CBB) :

از آنجایی که بخش عمده ای از پروتئینهای مایع مغزی - نخاعی (CSF) را آلبومین تشکیل می دهد و همچنین پروتئین عمده موجود در ادرار عموماً آلبومین می باشد می توان از کوماسی بریلیانت بلو جهت سنجش پروتئین توتال استفاده نمود. در این روش در مقایسه با روش توریدیمتری (که در آن میزان انکسار نور حاصل از کدورت یا توریدیتی 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 می گردد زیرا در حضور فیبرینوژن و هپارین، مقدار آلبومین بیش از مقدار واقعی برآورد می گردد. همچنین اگر الگوی پروتئین سرم غیرطبیعی باشد باز احتمال اشتباه بیشتر می گردد. هر چند لیگاندهایی مانند داروها، متابولیتها و... به آلبومین باند می گردند ولی تداخلی در این واکنش ایجاد نمی نماید مگر اینکه غلظت آنها خیلی زیاد باشد. از روش دیگری نیز می توان جهت سنجش آلبومین استفاده نمود. در تعیین افتراقی آلبومین و گلوبولینها جهت به دست آوردن رسوب آنها استفاده می گردد. به علت اینکه پروتئینها دارای وزن ملکولی بالاتری نسبت به آلبومین هستند، با افزودن **سولفیت سدیم 28%** 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 اندازه گیری قرار میگیرد. سپس می توان مقدار گلوبولینها را نیز محاسبه نمود:

غلظت آلبومین - غلظت پروتئین تام = غلظت گلوبولین ها

## ترکیبات نیتروژن دار غیر پروتئینی

### (Non-Protein Nitrogenous Compounds)

کاتابولیسم پروتئینها و اسیدهای نوکلئیک منجر به تشکیل ترکیباتی تحت عنوان ترکیبات نیتروژن دار غیر پروتئینی (NPN) می گردد. بیش از 15 نوع ترکیب ازت دار (نیتروژن دار) غیر پروتئینی (NPN) در پلاسما وجود دارد که مهمترین آنها (به ترتیب کاهش غلظت پلاسمایی) عبارتند از: اوره، اسیدهای آمینه، اسید اوریک، کراتینین، کراتین و آمونیاک.

Protein	Amino acids	Ammonia	Urea
---------	-------------	---------	------

جدول زیر ترکیبات نیتروژن دار-

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

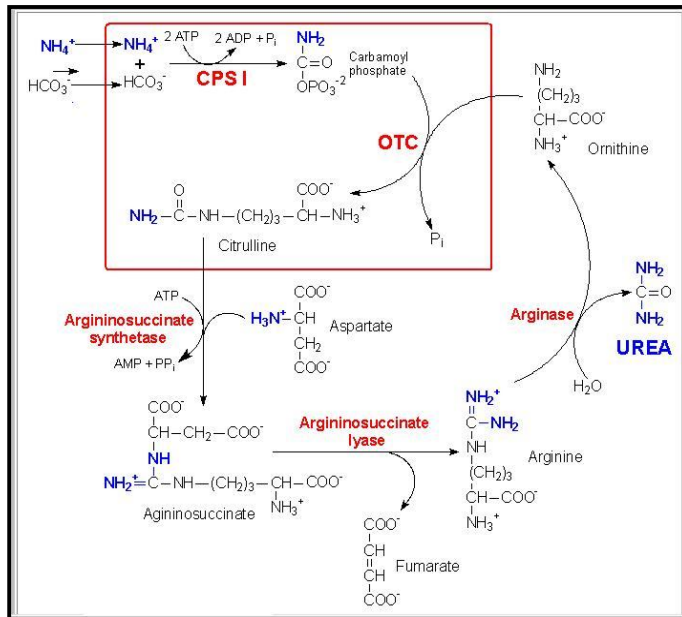
غیر پروتئینی اصلی، منشاء آنها و موقعیتهایی که در آن سنجش این مواد کاربرد بالینی قابل توجهی دارد را بصورت خلاصه نشان می دهد. مجموع غلظت ترکیبات نیتروژن دار غیر پروتئینی 250-400 mg/dl می باشد. قابل توجه اینکه میزان NPN موجود در خون حدود 75 درصد بیش از NPN پلاسماست که علت عمده آن وجود مقادیر زیاد گلوکوتایون در اریتروسیتهاست. قسمت عمده NPN پلاسما را اوره (Urea) تشکیل می دهد که حدود 45 درصد آن را شامل می شود. اندازه گیری میزان NPN قبلا به عنوان شاخصی جهت سنجش کارکرد کلیه بکار می رفت که اکنون یک شاخص

نسبتا غیر اختصاصی جهت تشخیص بیماریهای کلیه محسوب می گردد، زیرا سایر بیماریها نیز می توانند سبب تغییرات مهمی در غلظت پلاسمایی مواد مختلف شوند (به عنوان مثال وجود بیماری نقرس، بیماریهای کبدی و ... سبب تغییر غلظت NPN می گردند). به همین دلیل در آزمایشگاهها اندازه گیری NPN انجام نمی گیرد بلکه به جای آن از سنجش مقادیر اوره (یا نیتروژن اوره خون یا  $BUN^1$ ) و کراتینین سرم که شاخصهای حساستر و اختصاصی تری می باشد برای نشان دادن چگونگی کارکرد کلیه استفاده می گردد.

$BUN = \text{Blood Urea Nitrogen}$

### 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 می گیرد (شکل زیر) سنتز می گردد و سپس آزادانه بدون مایعات خارج و داخل سلولی انتشار می یابد (اوره دارای نفوذپذیری بالایی میباشد). اوره عمدتا از طریق کلیهها دفع می گردد و مقدار کمی نیز از طریق تعریق ترشح شده و یا توسط باکتریهای روده ای تجزیه می گردد. این ترکیب تقریبا نصف مواد جامد ادرار را تشکیل می دهد و همچنین 80-90 درصد نیتروژن ادراری را تشکیل می دهد. غلظت آن منعکس کننده تعادل بین کاتابولیسم اسیدهای آمینه و دفع آن توسط کلیه می باشد. مقدار طبیعی اوره در سرم 15-45 mg/dl می باشد. فیلتراسیون آن در گلومرولهای کلیوی به راحتی صورت می گیرد. بسته به وضعیت هیدراتاسیون بدن 40-80



درصد آن از لوله‌های پروگزیمال (Proximal tubule) به صورت غیر فعال (passive) باز جذب می‌گردد. 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.

### از تمی (Azotemia) و سندرم اورمیک:

افزایش ترکیبات ازته غیر پروتئینی (به ویژه اوره و کراتینین)، از تمی نامیده می‌شود. موارد طولانی مدت و شدید از تمی که با نیتروژن اوره خون (BUN) فراتر از

100 mg/dl و تظاهرات بالینی نارسایی کلیه مشخص می‌گردد را سندرم اورمیک می‌نامند. از تمی 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 باز جذب 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 پارانشیسم 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 گومرولی یا GFR (Glomerular Filtration Rate) می‌گردد 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 باز جذب 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 ارتباط 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 پیش کلیوی بر روی 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 از تمی پیش کلیوی و پس کلیوی را از یکدیگر میسر می‌سازد. اگر میزان اوره سرم افزایش یابد و تغییری در غلظت کراتینین ایجاد نشده باشد نشانگر از تمی پیش کلیوی می‌باشد. در صورتی که میزان اوره و کراتینین سرم توأم با هم افزایش یابد نوع از تمی موجود، از نوع کلیوی و پس کلیوی خواهد بود. از تمی 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) می‌گردد. از تمی پس کلیوی به علت انسداد در مجاری

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

از جمله علائم آزمایشگاهی مهم سندرم اورمیک می توان 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 ، بی اشتهایی ، تهوع و استفراغ ، تحلیل ماهیچه ای ، رعشه و اختلالات عصبی و روانی و نیز تنفس تند و سطحی همراه می باشد 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 می تواند 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 سوء تغذیه و سوء جذب).
- 4) سندرم نفروتیک ، نکروز حاد توبولی ، ترشح نابجای هورمون ADH ، تجویز سرم و مایعات.

از جمله هورمونهای آنابولیک ، اندروژنها (تستوسترون و...) و هورمون رشد (GH) را می توان نام برد که دارای اثر سنتزی بوده و باعث کاهش BUN می گردند در حالی که گلوکوکورتیکوئیدها و هورمونهای تیروئیدی بیشتر دارای اثرات آنتی آنابولیکی یا کاتابولیکی (تجزیه ای) هستند و باعث افزایش BUN می گردند.

### روشهای اندازه گیری مقدار اوره خون:

دو متد کلی برای اندازه گیری مقدار اوره خون وجود دارد:

1. استفاده از معرفهای آنزیمی (روش غیر مستقیم Indirect method)

الف - روش نسلر (Nessler)

ب - روش برتلوت (Berthelot)

ج - روش گلو تامات 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 اوره آز (Urease) به آمونیاک (NH<sub>3</sub>) و CO<sub>2</sub> تبدیل می گردد. آمونیاک حاصل با

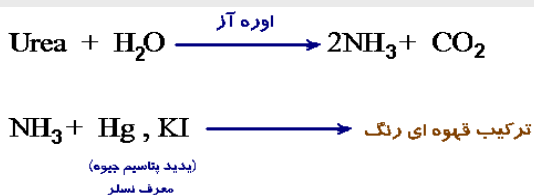
معرف نسلر که یدید پتاسیم جیوه (Potassium mercuric iodide)

می باشد وارد واکنش شده و ایجاد ترکیب قهوه ای رنگی می نماید که در

450 nm دارای ماکزیمم جذب می باشد.

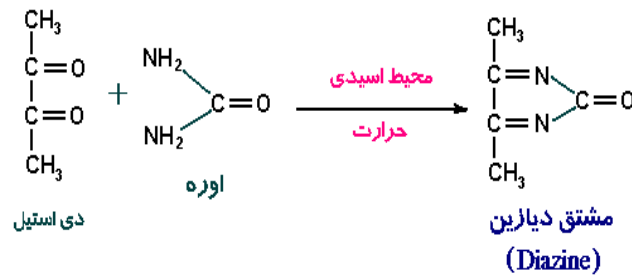
**نکته 1:** اپتیمم فعالیت آنزیم اوره آز در دمای 55 درجه سانتیگراد و

pH = 7-8 می باشد.





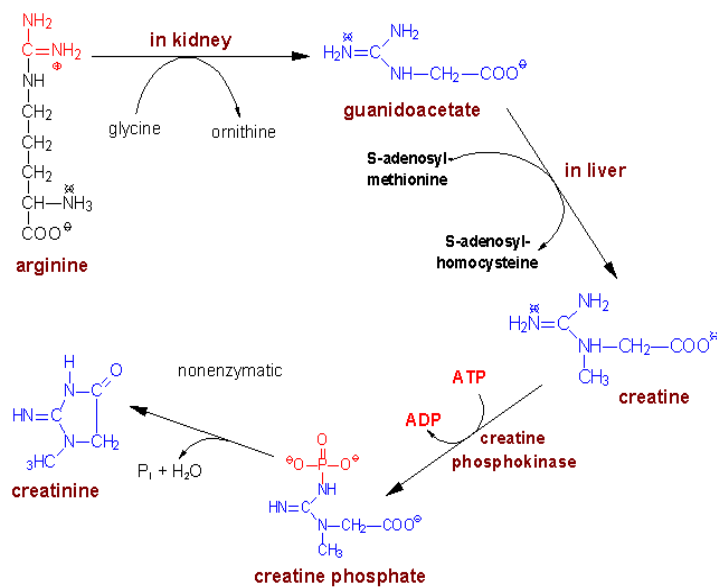
مشتق دیازین (Diazine) می نماید که یک ترکیب رنگی می باشد (زرد رنگ) که ماگزیم جذب آن در 540 nm می باشد.



- نکته 1: تیوسمی کاربازید (Thiosemicarbazide) و یون  $\text{Fe}^{3+}$  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.**
- نکته 2: تداخل ناشی از هیدروکسیل آمین ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) با استفاده از مواد اکسیدان (مانند سولفات پتاسیم) برطرف می گردد.**
- نکته 3: در غلظتهای بالای اوره حساسیت روش کاهش می یابد.**
- از این روش می توان هم برای ارزیابی میزان اوره در پلاسما و هم در ادرار استفاده نمود.

## اندازه گیری کراتینین (Creatinine)

کراتین ترکیبی است که محصول واکنشهای آنزیماتیک متوالی بر روی اسیدهای آرژینین و گلیسین می باشد 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 می باشد. روزانه 1-2 درصد کراتین در اثر دهیدراسیون غیر آنزیمی 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 کلیه ها دفع می شود و برخلاف اوره ، باز جذب نمی شود و نیز تحت تأثیر رژیم غذایی طبیعی قرار نمی گیرد (به طور محسوس) و در غیاب بیماری کلیوی میزان دفع آن ثابت می باشد .





اندازه گیری آن ، جهت اطمینان از صحیح بودن جمع آوری ادرار 24 ساعته کمک کننده می باشد. یعنی اگر ادرار 24 ساعته کامل باشد میزان کراتینین آن در حد طبیعی 1-2 gr/24h می باشد. (به عنوان شاخص جمع آوری ادرار 24 ساعته). میزان طبیعی کراتینین سرم mg/dl 0/6-1/3 می باشد. مقداری کراتینین در شرایط طبیعی از طریق توپولهای کلیوی ترشح می گردد که مقدار آن می تواند تحت تأثیر عواملی تغییر نماید.

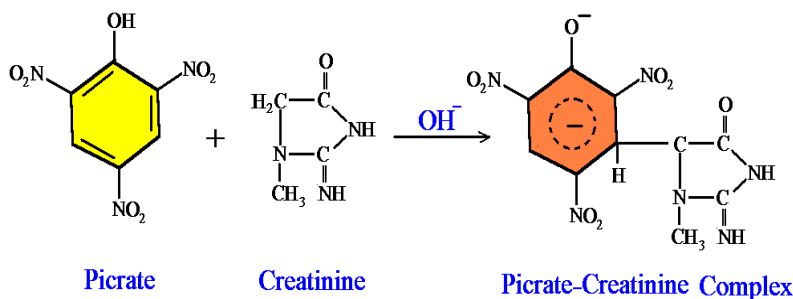
افزایش غلظت کراتینین پلاسما باعث افزایش ترشح و داروهای مانند پروبنسید، تری متوپریم و سایمتیدین باعث کاهش ترشح کراتینین می گردند و همچنین کاهش GFR (به دلایل مختلف) منجر به افزایش سهم ترشح کراتینین می گردد، بنابراین تغییر غلظت آن ممکن است بازتاب مناسبی از تغییر GFR نباشد بطوریکه ممکن است حتی میزان GFR به نصف مقدار طبیعی آن کاهش یافته باشد ولی میزان کراتینین همچنان طبیعی باشد (به علت اینکه ترشح آن افزایش می یابد). بنابراین میزان کراتینین خون افزایش نمی یابد مگر اینکه نارسایی اساسی در کار کلیه پیش آید. معمولاً در کنار اندازه گیری کراتینین، BUN نیز مورد ارزیابی قرار می گیرد که نسبت [BUN/Creatinine] به عنوان شاخصی از عملکرد کلیه ها و وضعیت متابولیسمی بدن مورد توجه قرار می گیرد. محدوده طبیعی [BUN/Creatinine] بین 10-20 می باشد. در از تمی پیش کلیوی (Pre-renal) که ممکن است به علت افزایش سنتر اوره یا کاهش جریان خون کلیوی (که متعاقب آن جریان ادرار کاهش یافته و باز جذب توپولی اوره افزایش می یابد) میزان BUN افزایش یافته و نسبت [BUN/Creatinine] افزایش می یابد در این حال غلظت کراتینین تغییر چندانی ندارد چون کراتینین پس از فیلتراسیون باز جذب نمی گردد (البته در حالاتی مانند نارسایی قلبی و دیابت باز جذب توپولی کراتینین تا حدودی افزایش می یابد). در از تمی پس کلیوی به علت انسداد مکانیکی، سرعت فیلتراسیون گومرولی GFR کاهش می یابد و در این صورت هم BUN و هم کراتینین به یک نسبت تحت تأثیر قرار می گیرند، در نتیجه نسبت [BUN/Creatinine] تغییری نمی نماید.

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

## روشهای آنالیز کراتینین:

### • واکنش ژافه:

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



ترکیباتی مانند گلوکز ، پروتئین ها ، استو استات ، پیروات و اسید اوریک ، فروکتوز ، اسید آسکوربیک می توانند در این روش تداخل ایجاد نمایند. نیز این روش به تغییرات دما و pH حساس می باشد .

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

- (1) می توان از معرف لوید (Lloyd) یا سیلیکات آلومینیوم برای جداسازی کراتینین از سایر ترکیبات رنگزا استفاده نمود. در محیط اسیدی کراتینین جذب معرف لوید می شود، سپس در محلول قلیایی حل می گردد و پس از آن با استفاده از واکنش ژافه مقدار تعیین می گردد. این روش به عنوان **روش مرجع** اندازه گیری کراتینین محسوب می گردد.
- (2) استفاده از **آنزیم باکتریایی کراتینیناز**: در این روش تغییر شدت رنگ واکنش پیکرات، قبل و بعد از تجزیه کراتینین توسط آنزیم باکتریایی، مورد سنجش (توسط روش فوق) قرار می گیرد.
- (3) استفاده از **رژین های تعویض کاتیون**: توسط این رزین ها کراتینین جداسازی گردیده و در مرحله بعد می توان از واکنش ژافه استفاده نمود و یا مقدار آن را مستقیماً در طول موج 234 nm (طیف UV) اندازه گیری نمود.
- (4) **روش pH دوتایی ژافه**: در این روش میزان جذب مخلوط واکنش در دو pH مختلف اندازه گیری می شود. یکبار در pH قلیایی میزان جذب سنجیده می شود و سپس در مرحله بعد محیط را با افزودن استیک اسید، اسیدی می نمایم. اسیدی شدن باعث از بین رفتن رنگ ایجاد شده توسط کراتینین می شود، در حالیکه رنگ حاصل از مواد تداخل کننده از بین نمی رود و در این حالت نیز میزان رنگ را اندازه گیری می نمایم. اختلاف دو جذب ثبت شده متناسب با مقدار غلظت کراتینین در نمونه خواهد بود.

• واکنش های آنزیمی:

این روش معمولاً در آنالیزرها مورد استفاده قرار می گیرد، اساس این روش، واکنش کراتینین با آنزیم کراتینین آمیدوهیدرولاز و ایجاد N-متیل هیدانتوئین و یون آمونیوم می باشد که در مرحله بعد آمونیوم با معرف **برموفنل بلو** ایجاد رنگ آبی می نماید، برای حذف تداخل مربوط به آمونیاک (آمونیم) موجود در نمونه بیمار از شاهدهی استفاده می گردد که حاوی تمامی عناصر نمونه بیمار بوده ولی فاقد آنزیم کراتینین ایمیدوهیدرولاز می باشد.



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

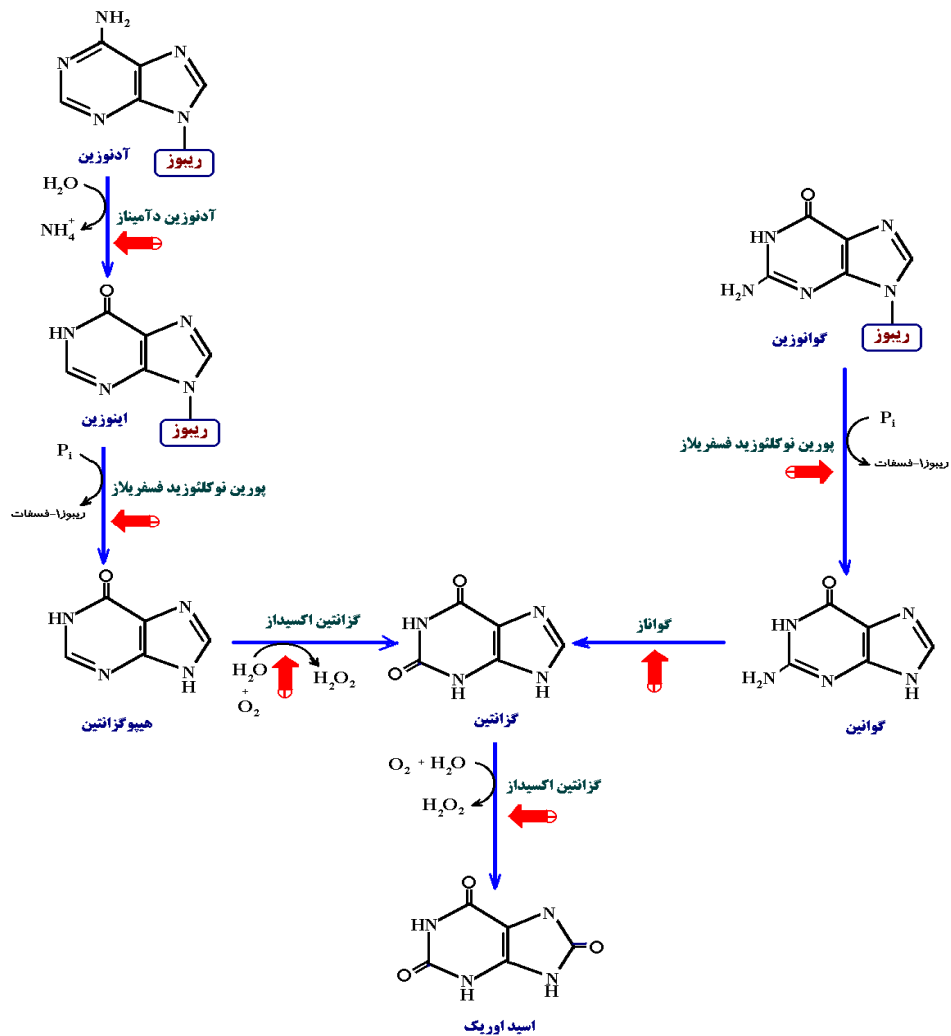
**محدوده طبیعی مقدار کراتینین 0/6-1/3 mg/dl می باشد.**

• اندازه گیری مقدار کراتینین:

اگر نمونه سرم را اسیدی نمایم و حرارت دهیم، کراتین به کراتینین تبدیل می شود. با محاسبه تفاضل مقادیر کراتینین قبل و بعد از تبدیل کراتین به کراتینین، مقدار کراتین بدست می آید.

## اسیداوریک (Uric acid)

اسید اوریک از جمله ترکیبات ازت دار غیرپروتئینی محسوب می گردد که در بدن حاصل کاتابولیسم (تخریب) نوکلئوتیدهای پورینی می باشد. اندازه گیری این ترکیب در خون عمدتاً به عنوان شاخصی برای Turn over سلول و نیز مفید در بررسی ناهنجاریها در مسیر بیوسنتزی پورینها محسوب می گردد. این ترکیب همچنین 1-1/5 درصد نیتروژن ادراری را تشکیل میدهد. این ترکیب در طی واکنشهای کاتابولیسمی که توسط آنزیمهایی مانند آدنوزین دآمیناز (ADA)، پورین نوکلئوزید فسفریلاز (PNP) گزانتین اکسیداز (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 پلاسما میبرگی به درون گلومرول.
2. باز جذب 98-100 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. باز جذب 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 برابر با 5/8 میباشد و  $pK_{a2}$  آن برابر با 10/3 (یعنی خارج از محدوده فیزیولوژیک میباشد و بنابراین فقط اولین پروتون اسیداوریک تفکیک

میگردد) میباشد، بنابراین فقط اسیداوریک و نمک اورات منوسدیم آن در مایعات بدن وجود دارد. اوراتها بسیار محلولتر از اسید اوریک میباشد. در  $pH = 5$  کل اورات قابل حل در ادرار (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 می باشد. لذا بلورهای دستگاه ادراری در قسمتهای پیش از محل اسیدی شدن ادرار (توبول دیستال و مجاری جمع کننده ادرار) از نوع اورات سدیم هستند در حالی که در قسمتهای دیستال از نوع اسیداوریک می باشند. افزایش اسید اوریک در سرم هیپراوریکمی (هیپراوریسمی) و کاهش آن هیپواوریکمی (هیپواوریسمی) نامیده می شود.

### هیپراوریکمی

هیپراوریکمی در بیماریهایی مانند: لش-نیان (Lesh-nyhan)، نفرس (Goat)، فون ژیرکه (Von Gierke)، کمبود ارثی (نقص) آنزیم پیرووات دهیدروژناز، مسمومیت با ترکیباتی مانند سرب، آرسنیت و جیوه، در حالت الکلیسم (اعتیاد به الکل)، در سندرمهای - میلوپرولیفراتیو (افزایش تکثیر سلولهای مغز استخوان) و شیمی درمانی تومورهای بدخیم که در آنها اسیدهای نوکلئیک افزایش می یابد، دیده می شود.

- در **بیماری لش نیان** که بر اثر نقص کامل آنزیم HGPRT (هیپوگزانتین گوانین فسفوریبوزیل ترانسفراز) ایجاد می گردد، تولید داخلی پورینها و در نهایت تولید اسیداوریک افزایش می یابد که از علائم آن سنگهای اسیداوریک و سندرم قطع عضو، عقب ماندگی ذهنی، رفتار تهاجمی، جویدن غیر اختیاری اعضای بدن، سنگ کلیه و نفروپاتی از علائم آن است.
- **بیماری نفرس** نیز با هیپراوریکمی، آرتریت التهابی حاد، تجمع بلورهای کریستالهای اورات سدیم (که توفوس نامیده می - شود) و سنگهای کلیوی اسید اوریک مشخص می گردد. علت هیپراوریکمی و نفرس می تواند اولیه (نقصهای ژنتیکی و آنزیمی) یا ثانویه (اکتسابی) باشد. مهمترین علل اولیه در ایجاد هیپراوریکمی نفرس، افزایش تولید به علت افزایش فعالیت آنزیم PRPP-سنتاز، کمبود (نقص) نسبی آنزیم HGPRT و کاهش ترشح کلیوی به علل ناشناخته می باشد. از علل ثانویه در ایجاد هیپراوریکمی و نفرس، افزایش ساخت و تخریب اسید نوکلئیک (به عنوان مثال در همولیز مزمن، بیماریهای لنفوپرولیفراتیو یا میلوپرولیفراتیو)، کمبود آنزیم گلوکز-6-فسفاتاز، نارسایی حاد یا مزمن کلیه و اختلالات توبولی ناشی از دارو یا فراورده های متابولیک درونزا می باشد.
- همچنین بعضی از اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک،  $\beta$ -هیدروکسی بوتیرات و استو استات با اسیداوریک در دفع کلیوی رقابت نموده و از دفع اسید اوریک جلوگیری می نمایند و باعث افزایش مقدار آن در سرم می گردند. بنابراین کلیه عواملی که باعث افزایش میزان اسید لاکتیک و ... گردند به نوعی باعث افزایش سرمی اسید اوریک و نیز باعث تشدید بیماریهایی مانند نفرس می گردند:
- **بیماری فون ژیرکه** که علت آن نقص در آنزیم گلوکز-6-فسفاتاز می باشد افزایش میزان گلوکز-6-فسفات و لاکتات خون دیده می شود. افزایش گلوکز-6-فسفات با فعال سازی مسیر پنتوز فسفات، تولید پورینها را تحریک نموده که در نهایت افزایش تولید اسید اوریک را بدنال دارد. از طرف دیگر افزایش لاکتات خون ناشی از این نقص منجر به افزایش آستانه کلیوی دفع اسید اوریک و نهایتا هیپراوریکمی می گردد.
- در **کمبود ارثی پیرووات دهیدروژناز**، مسمومیت با **یونهای آرسنیت و جیوه** (بدلیل مهار پیرووات دهیدروژناز) و **در حالت الکلیسم** (بدلیل کمبود تیامین و مهار پیرووات دهیدروژناز) نیز افزایش لاکتات و نهایتا هیپراوریکمی رخ می دهد.
- **افزایش Turn over اسیدهای نوکلئیک** در سندرمهای میلوپرولیفراتیو (افزایش تکثیر سلولهای مغز استخوان) و شیمی درمانی تومورهای بدخیم میزان تولید اسید اوریک افزایش می یابد.
- از علل دیگر افزایش اسید اوریک می توان به دریافت زیاد پورین از طریق غذا، نارسایی های حاد و مزمن کلیوی و داروهای سیتوتوکسیک اشاره نمود.

### هیپواوریکمی

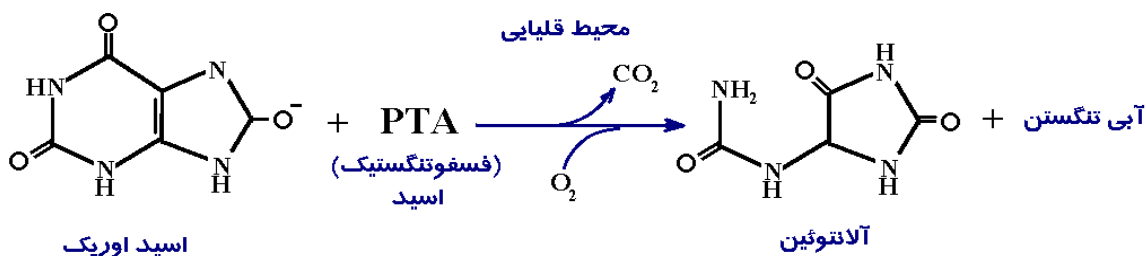
هیپواوریکمی به علل مختلفی از جمله نقص در آنزیم پورین نوکلئوزید فسفریلاز (PNP)، آدنوزین دآمیناز (ADA) و گزانتین اکسیداز XO (که با گزانتینوری همراه بوده و ممکن است باعث تشکیل سنگهای گزانتینی گردد) و نیز فسفوریبوزیل - پیروفسفاتاز و در بیماریهای شدید کبدی و مصرف داروهایی مانند آلپوپورینول (که مهار کننده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

### روشهای اندازه گیری اسیداوریک : (urric acid)

دو روش اصلی اندازه گیری اسیداوریک عبارتند از: روش شیمیایی (روش Caraway) 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) می باشد. رایجترین ماده اکسیدان مصرفی فسفوتنگستات قلیایی است (به همین علت روش فسفوتنگستیک اسید PTA نیز نامیده می شود) که محصول احیاء آن، آبی-تنگستن (Tungsten blue) می باشد و به روش اسپکتروفتومتری قابل اندازه گیری میباشد (قرائت جذب در 650-700 nm).



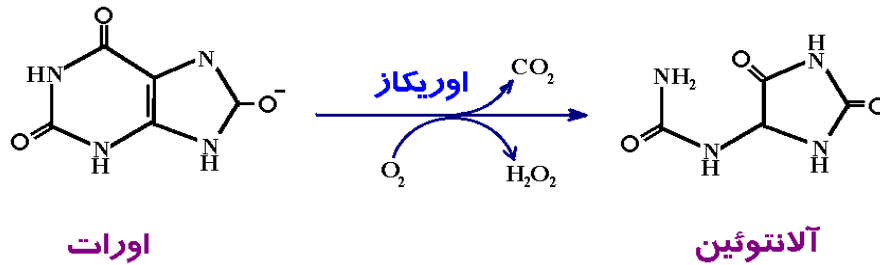
ترکیبات بسیاری ممکن است در این روش تداخل نمایند. حضور پروتئین سبب کدورت (Turbidity) و یا quenching می گردد، بنابراین حذف پروتئین الزامی می باشد. حذف پروتئین در روشهای اتوماسیونی (دستگاهی) به وسیله دیالیز صورت می گیرد و در روشهای دستی به وسیله رسوب دادن با محلول Ba(OH)<sub>2</sub>/ZnSO<sub>4</sub> صورت 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، گلوکاتینون، سیستئین، استامینوفن، استیل سالیسیلیک اسید (ASA)، ژانتریبک اسید (متابولسمی از سالیسیلات)، پورین هایی از قبیل کافئین، تنوبرومین و توفیلین اشاره نمود. همه ترکیبات مذکور باعث احیای PTA می گردند، بنابراین باعث خطای مثبت (Positive bias) می گردند. استفاده از صاف شده بدون پروتئین، اکثر این تداخلات را از بین می برد.

#### 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 فلئورید F<sup>-</sup> یا تیمول باعث پایداری بیشتر نمونه می گردد).

### ب- روشهای آنزیمی:

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



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 اسپکتروفوتومتر 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 می توان جهت پی بردن به غلظت اورات استفاده نمود. به همین جهت از ترکیبات کروموژن استفاده می گردد (مانند: آمینوآنتی پیرین و دی کلرو فنوسولفونات). که این ترکیبات در حضور آنزیم پراکسیداز (Peroxidase) تبدیل به یک ترکیب رنگی می گردند که به روش رنگ سنجی قابل اندازه گیری هستند.

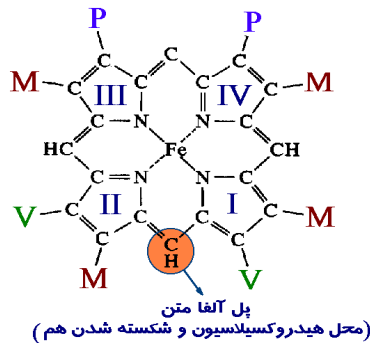
#### مقادیر طبیعی در سرم:

برای مردان: 3-9 mg/dl

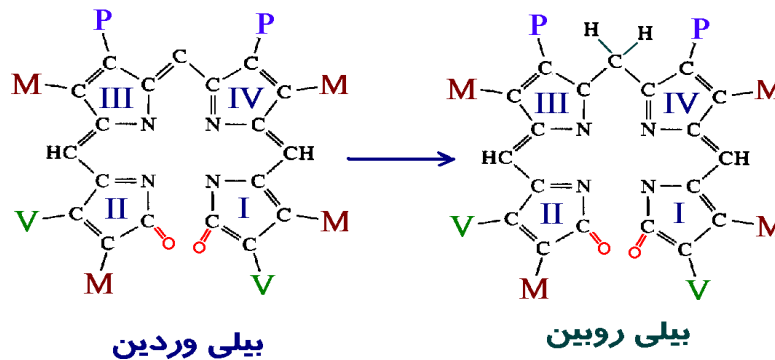
برای زنان: 2/5-7/5 mg/dl

## بیلی رویین و روشهای اندازه گیری آن

بیلی رویین به عنوان یکی از رنگیزه های صفراوی بوده و به رنگ زرد- نارنجی می باشد. این ترکیب حاصل شکستن هم (Heme) در سیستم هم- اکسیژناز میکروزومی می باشد. این ترکیب (Heme) در ناحیه پل  $\alpha$ -متن (بین حلقه های 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 می گردد) و ایجاد بیلی وردین (سبز رنگ) مینماید که پس از هیدروژناسیون (احیا شدن بوسیله NADPH) تبدیل به بیلی رویین میگردد (اشکال بالا و پایین).



به طور متوسط روزانه 250-300 mg بیلی رویین تولید می گردد که از این میزان 85 درصد، مشتق از Heme مربوط به Hb (هموگلوبین) حاصل از RBC های فرسوده می باشد که در سیستم رتیکولاندوتلیال کبد، طحال و مغز استخوان تخریب میگردد. 15 درصد باقیمانده مربوط به کاتابولیسم پروتئینهای هم دار دیگر نظیر میوگلوبین، سیتوکرومها، پراکسیدازها و همچنین حاصل از پیش سازهای RBC می باشد که در مغز استخوان تخریب



می گردند که به عنوان اریتروپوئز غیر موثر (Ineffective erythropoiesis) معروف می باشد.

بیلی رویین بعد از تولید در بافتهای محیطی وارد کبد می شود (به صورت متصل به آلبومین در خون انتقال می یابد و به کبد میرسد که به این شکل از بیلی- رویین،  $\alpha$ -بیلی رویین یا بیلی رویین غیر

کنژوگه یا بیلی رویین غیر مستقیم گفته می شود و در آب نامحلول است) و سریعاً توسط هیپاتوسیتها برداشت میگردد (به وسیله انتقال فعال وابسته به Carrier). سپس بیلی رویین به طور محکم (اما برگشت پذیر) به پروتئین های محلول متصل میگردد. از جمله این پروتئین ها Z protein, Ligandin میباشد. لیگاندین محکم تر به بیلی رویین متصل می گردد و باعث جلوگیری از بازگشت این ترکیب به پلاسما میگردد (برگشت آن را به تاخیر می اندازد). سپس توسط آنزیم (های) UDP- گلوکورونیل ترانسفراز، کنژوگاسیون صورت می گیرد و ایجاد دو نوع ترکیب به نامهای منوگلوکورونید بیلی رویین (بیلی رویین نوع  $\beta$ ) و دی گلوکورونید بیلی رویین (بیلی رویین نوع  $\gamma$ ) می نماید که 90 درصد آن بصورت  $\gamma$ - بیلی رویین و 10 درصد بصورت  $\beta$ - بیلی رویین می باشد. سپس ترشح آن به درون صفرا صورت می گیرد (نصورت می- شود توسط یک سیستم انتقال فعال و برخلاف گرادیان غلظتی صورت می گیرد). بعد از ورود این ترکیبات به درون روده، تحت تاثیر آنزیمهای  $\beta$ - گلوکورونیداز کبدی، روده ای و یا باکتریایی و pH قلیایی روده، هیدرولیز می گردند و تبدیل به رنگدانه های غیر کنژوگه می- گردند. تحت اثر فلور میکروبی غیرهوازی روده ای، بیلی رویین غیر کنژوگه با احیا شدن به ترکیبات متنوعی از قبیل استرکو بیلینوژن، مزوبیلینوژن و اوروبیلینوژن تبدیل میگردد که مجموعاً تحت عنوان اوروبیلینوژن از آنها نام برده می شود. در حدود 98 درصد از این ترکیبات باز جذب میگردد و وارد چرخه روده ای- کبدی (Entro-hepatic) می گردند. بخش عمده ای از اوروبیلینوژن های باز جذب شده به وسیله کبد برداشت شده و توسط صفرا دوباره دفع میگردد. 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 اوروبیلینون (24-0 mg در 24 ساعت) در ادرار مشاهده گردد.

## ناهنجاریهای متابولیسم بیلی روبین

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

**کولوریک<sup>1</sup>** به معنای وجود صفرا در

انواع هیپر بیلی روبینمی‌ها عبارتند از:

- الف - نوع غیر کنژوگه
- ب - نوع کنژوگه

### الف- هیپر بیلی روبینمی نوع غیر کنژوگه

#### 1) یرقان فیز یولوژیک:

رایجترین حالت دیده شده می‌باشد که در آن بیلی روبین غیر کنژوگه 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 در متابولیسم بیلی روبین و دفع آن می‌باشد. در نوزادان Full-term مقدار بیلی روبین غیر کنژوگه 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) هیپر بیلی روبینمی ناشی از عوامل پیش کبدی (Pre-hepatic):

در غیاب بیماری های کبدی نوعی از هیپر بیلی روبینمی مشاهده می‌شود که بیشتر ناشی از تخریب پیش از بلوغ اریتروسیتها و اریتروپوئز ناقص میباشد. از آنجایی که در این حالات سرعت تولید بیلی روبین بیش از ظرفیت دفعی آن می‌باشد، بیلی روبین غیر کنژوگه در سرم افزایش می‌یابد.

#### 3) سندرم های کریگلر - نجار (Crigler-Najjar):

بر دو نوع میباشد: سندرم کریگلر - نجار I و سندرم کریگلر - نجار II. که بر اثر نقص در آنزیم UDP-گلوکورونیل ترانسفراز ایجاد می‌گردند. در نوع I که ناشی از نقص کامل آنزیم می‌باشد، یرقان شدید مادرزادی دیده می‌شود و مقدار بیلی روبین غیر کنژوگه به 20-50mg/dl نیز میرسد و در 15 ماه اول زندگی معمولاً مرگ حادث می‌شود. در نوع II که خوش خیم تر می‌باشد و ناشی از نقص نسبی در آنزیم فوق می‌باشد، افزایش بیلی روبین غیر کنژوگه تا 20 mg/dl مشاهده می‌گردد.



4) سندرم ژیلبرت (Gilbert):

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

5) هیپر بیلی روبینمی سمی (Toxic):

حاصل اختلال عمل کبد بر اثر سمومی مانند کلروفورم، آرسفنامینها و استامینوفن و ... می باشد.

6) هیپر بیلی روبینمی بر اثر تغذیه از شیر مادر:

استفاده نوزادان از شیر مادر (به ویژه زمانی که مادر از قرصهای ضد حاملگی نیز استفاده نماید) باعث افزایش بیلی روبین می گردد. قسمت اعظم بیلی روبین از نوع غیر مستقیم می باشد. علت افزایش دقیقاً مشخص نیست ولی گفته می شود که وجود FFA می تواند عمل برداشت Uptake بیلی روبین را کاهش دهد.

7) هیپر بیلی روبینمی بر اثر گرسنگی: در گرسنگی سطح بیلی روبین سرم افزایش می یابد که می تواند نتیجه افزایش تولید آن یا کاهش کلیرانس آن باشد. همچنین در گرسنگی افزایش سطح FFA و بیلی روبین با هم اتفاق می افتد که نشان دهنده این است که FFA در مرحله برداشت Uptake کبدی با بیلی روبین در اتصال به پروتئینهای غشا یا پروتئین Z رقابت کند.

ب- هیپر بیلی روبینمی نوع کنژوگه

1) انسداد مجاری صفراوی: یا انسداد مجاری کبدی-صفراوی می تواند باعث جلوگیری از دفع بیلی روبین دی گلوکورونید و منوگلوکورونید و سایر ترکیبات دیگر گردد (یرقان کلتازی). این عامل باعث می گردد که این ترکیبات به درون وریدهای کبدی وارد شده و در خون و ادرار ظاهر گردند.

2) سندرم دوین-جانسون: به علت نقص در ترشح کبدی بیلی روبین کنژوگه به درون صفرا ایجاد می گردد. و یک ناهنجاری ژنتیکی خوش خیم می باشد که در آن میزان بیلی روبین تام (که شکل غالب آن از نوع کنژوگه می باشد) به 2-5 mg/dl می رسد.

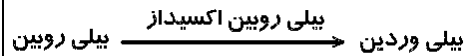
3) سندرم روتور: این سندرم با هیپر بیلی روبینمی مزمن کنژوگه و سلامت بافت شناختی کبد همراه است و ممکن است به دلیل نقص در انتقال یونهای آلی (از جمله بیلی روبین) در سلولهای کبدی ایجاد شود.

\*\*\*\*\*

اثر فنوباریتال بر میزان بیلی روبین: این دارو میزان بیلی روبین غیر کنژوگه را کاهش می دهد. علت آن القای بیان آنزیم UDP-گلورونیل ترانسفراز (UDP-GT) می باشد. (نکته: در بیماران مبتلا به سندرم کریگلر-نجر، فنوباریتال هیچ تاثیری در غلظت بیلی روبین سرم ندارد. چرا؟) اثر نور بر میزان بیلی روبین: نور مستقیم یا نور چراغ فلورسنت بطور قابل ملاحظه ای باعث کاهش بیلی روبین پلاسما می گردد که از این خاصیت برای درمان هیپر بیلی روبینمی نوزادان استفاده می گردد (فتوتراپی). در این حالت جذب نور در طول موج 425-475 nm توسط بیلی روبین باعث تجزیه آن شده و به سرعت از طریق صفرا، مدفوع و ادرار می گردد.

## روشهای اندازه گیری بیلی روبین

1) **روش آنزیمی:** با استفاده از آنزیم بیلی روبین اکسیداز میتوان بیلی روبین را به بیلی وردین تبدیل نمود. با استفاده از میزان کاهش جذب نمونه در محدوده طول موج 405-460 nm بعد از اثر آنزیم روی نمونه می توان مقدار بیلی روبین را محاسبه نمود.



## 2) روش مستقیم یا روش استفاده از بیلی روبینومتر (برای نوزادان):

از این روش برای سنجش میزان بیلی روبین تام نوزادان استفاده می گردد. به علت اینکه اکسی هموگلوبین (HbO<sub>2</sub>) دارای جذب قوی در طول موج 454 nm می باشد (که ماگزیم جذب بیلی روبین در این طول موج می باشد)، ضروری است که تداخل مربوط به HbO<sub>2</sub> 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 می شود، به علت اینکه HbO<sub>2</sub> در هر یک از این دو طول موج دارای جذب یکسانی می باشد، بنابراین بوسیله یک اسپکتروفتومتر یا فتومتر بی کروماتیک (بیلی روبینومتر) مقدار آنها در هر دو طول موج قابل سنجش می باشد. در صورت وجود کاروتنوئیدها در نمونه نمی توان از این روش استفاده نمود زیرا این ترکیبات در 454 نانومتر دارای جذب میباشند و باعث ایجاد خطا میگردند، بنابراین روشهای اسپکتروفتومتری مستقیم برای اندازه گیری میزان بیلی روبین در افراد بالغ مورد استفاده قرار نمی گیرد. از آنجائیکه معمولاً نوزادان تا سه ماهگی هیچگونه کاروتنوئیدی مصرف نمی نمایند بنابراین برای سنجش بیلی روبین تام آنها می توان از این روش استفاده نمود. سرعت و نیاز به حجم نمونه کم از مزیت های مهم این روش می باشد. همچنین از این روش برای تعیین میزان بیلی روبین مایع آمینوتیک میتوان استفاده نمود که به عنوان شاخصی برای بیماری همولیزی در جنین ها استفاده می گردد.

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

**روش شیمیایی:** مبنای روشهای شیمیایی بر واکنش معرف **دیازو (سولفانلیک اسید دیازته)** با بیلی روبین (کنژوگه و غیر کنژوگه)، شکستن آن (با تاثیر بر کربن متیلن مرکزی ملکول بیلی روبین) و ایجاد 2 ملکول آزوبیلی روبین می باشد. 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 می گردد و رنگ ایجاد شده (آزوبیلی روبین) قرمز یا ارغوانی می باشد و با اندازه گیری میزان رنگ در طول موج 560 nm غلظت بیلی روبین کنژوگه بدست می آید. برای بدست آوردن میزان غلظت بیلی روبین تام از متانول به عنوان حلال (Accelerator) استفاده می گردد و در این حالت بیلی روبین غیر کنژوگه نیز به حالت محلول در آمده و مقداری که مورد سنجش قرار می گیرد مربوط به بیلی روبین تام خواهد بود. با محاسبه ساده می توان مقدار بیلی روبین غیر کنژوگه را محاسبه نمود. **در روش Jenderassik-Grof** از محلول سدیم بنزوات-کافئین به عنوان حلال (Accelerator) استفاده می گردد و محیط واکنش، قلیایی یا خنثی می باشد (که بعد از واکنش قلیایی می گردد pH=13) و سپس جذب اندازه گیری می شود. در این pH، طیف جذبی آزوبیلی روبین به آبی شدید تبدیل می گردد که در طول موج 600 نانومتر مورد سنجش قرار میگیرد.

کافئین و سدیم بنزوات باعث جداسازی بیلی روبین از آلبومین و حل شدن آن می گردد. 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 تارتات پتاسیم نیز محیط را قلیایی نموده و باعث تشدید رنگ آزوبیلی روبین می گردد.

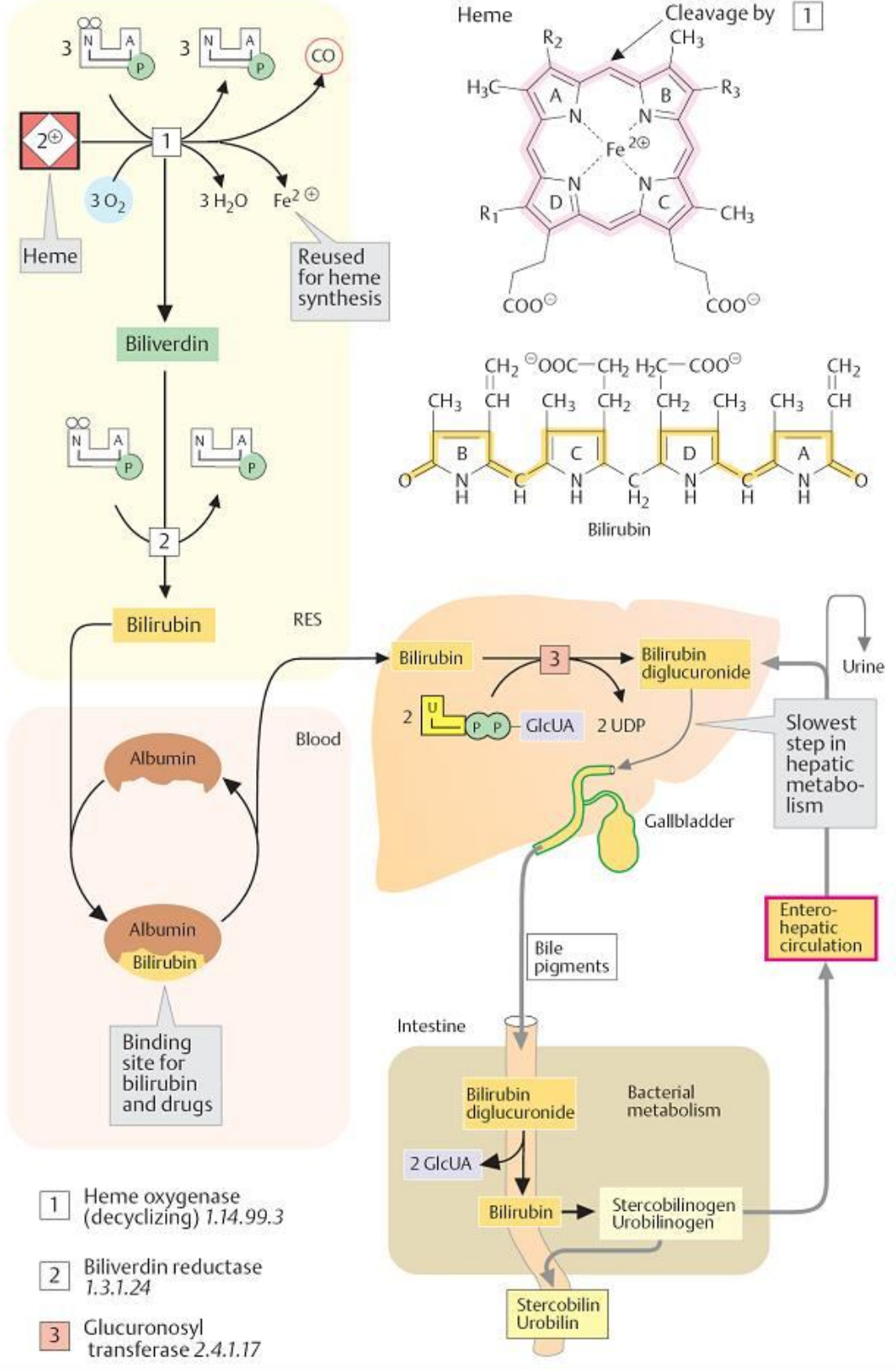
$$\text{بیلی روبین کنژوگه} + \text{بیلی روبین غیر کنژوگه} = \text{بیلی روبین تام}$$



### 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 بیلی روبین در این شرایط اکسید می گردند. نمونه ها در دمای یخچال تا سه روز و در دمای 70- تا سه ماه پایدارند.

A. Degradation of heme groups



## اصول سنجش کلسیم و فسفر

### کلسیم ( $Ca^{2+}$ ):

این عنصر فراوان ترین عنصر معدنی در بدن می باشد. مقدار آن در افراد بالغ در حدود 1200-1000 گرم می باشد. 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 می باشد علاوه بر نقش آن در استحکام استخوان، در انعقاد خون، هدایت عصبی، عضلانی، قابلیت تحریک عضلات اسکلتی، کارکرد طبیعی قلب، در تنظیم فعالیت های 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 می باشند. 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،  $1,25(OH)_2D$  و دی هیدروکسی کلسیفرول و کلسیتونین) صورت می گیرد. کلسیم در خون به سه شکل عمده دیده می شود. 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 سترات و ... دیده می شود.

تنها شکل یونیزه آن ( $Ca^{2+}$ ) از لحاظ فیزیولوژیک فعال می باشد. محرک اصلی جذب کلسیم از روده باریک ویتامین D و تا حدودی PTH و نیز هورمون رشد و رژیم غذایی پر پروتئین و اسیدی بودن محیط روده می باشد. جذب یون کلسیم از روده تحت تأثیر فیتات (حاصل از اسیدفیتیک غلات و حبوبات)، فسفات و آنزیمات و آنزیمات و آنزیمات قرار گرفته و مختل می گردد. دفع مقادیر عمده ای از آن از طریق ادرار صورت می گیرد هر چند دفع آن از طریق مدفوع با مقدار آن در رژیم غذایی مرتبط می باشد.

### پاراتورمون (PTH):

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

1. با اتصال به گیرنده های سطح سلولهای کلیوی و نهایتاً تأثیر بر لوله های ادراری باعث اثر بر باز جذب کلسیم می گردد. این هورمون در لوله های پروگزیمال باعث کاهش باز جذب فسفات، کلسیم  $Ca^{2+}$  و بیکربنات ( $HCO_3^-$ ) می گردد، ولی اثر آن بر بخش انتهایی لوله های کلیوی، افزایش باز جذب کلسیم می باشد (اثر سریع PTH).
2. با تأثیر بر سلولهای کلیوی سازنده  $1,25(OH)_2D$  دی هیدروکسی کلسیفرول و افزایش سنتز این ترکیب (شکل فعال ویتامین D) باعث افزایش غیرمستقیم کلسیم می گردد که این اثر مربوط به تأثیر ویتامین مذکور بر سلولهای مخاط روده می باشد.
3. با اتصال به گیرنده های سطح سلولهای استخوانی و با تحریک استئوکلاستها باعث انحلال استخوان و آزاد شدن کلسیم می گردند. (بزرگترین تأثیر هورمون PTH).

پس به طور خلاصه (نتیجه نهایی اثر PTH):

- کاهش دفع کلسیم از کلیه ها و افزایش کلسیم در سرم.
- کاهش باز جذب فسفات از لوله های ادراری و کاهش فسفات سرم.
- تحریک سنتز کلیوی ویتامین D فعال، افزایش جذب روده ای 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  $\text{HCO}_3^-$  ،  $\text{Na}^+$  ،  $\text{K}^+$  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-دهیدروکلوسترول و یا ارگوسترول می‌باشد به دو صورت ویتامین  $\text{D}_2$  و  $\text{D}_3$  وجود دارد که تنها در ساختار زنجیره جانبی با همدیگر تفاوت دارند . هیدروکسیلاسیون این ویتامینها در کبد و کلیه عمدتاً صورت می‌گیرد .

در کبد هیدروکسیلاسیون در جایگاه 25 صورت گرفته و ایجاد 25-هیدروکسی-ویتامین D ( $\text{D}_2$  یا  $\text{D}_3$ ) می‌نماید . سپس ترکیب مذکور به کلیه‌ها منتقل گردیده و هیدروکسیلاسیون بر روی کرین 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  $1-\alpha$ -هیدروکسیلاز می‌گردد (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 می‌گردد و یک هورمون پپتیدی می‌باشد . این هورمون تحت تأثیر بسیاری از هورمونهای دستگاه گوارش (علاوه بر تأثیری که افزایش کلسیم بر ترشح آن دارد) افزایش می‌یابد و باعث کاهش باز جذب توبولی (در کلیه‌ها)  $\text{Ca}^{2+}$  و فسفات می‌گردد (به همراه کاهش باز جذب  $\text{Na}^+$  ،  $\text{K}^+$  و  $\text{Mg}^{2+}$ ) . این هورمون باعث جذب کلسیم توسط استخوان می‌گردد (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 (نفرولکسیروز) منجر می‌گردد . 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 اندوکراین** مانند: هیپرتیروئیدیسم، سندرم کوشینگ، آکرومگالی و نیز تورموهای اندوکراین. در هیپرتیروئیدیسم (که همراه است با هیپرکلسمی اوری، هیپر فسفاتی 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: **سمومیت 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.

### هیپو کلسمی (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 یرقانه‌های انسدادی.
  - آسیب کلیوی.
  - راشیتیس و ابسته 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.
  - **هیپو کلسمی 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 می توان به چند گروه تقسیم بندی 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 تترا متیل مورکساید (Tetra methyl murrexide) جهت سنجش کلسیم یونیزه .

روش تیتراسیون کلارک - کالپ : در این روش ابتدا با افزودن آنیون اگزالات ، اگزالات کلسیم به صورت رسوب (با توجه به غلظت کلسیم در نمونه) ظاهر می گردد . پس از جداسازی آن و اسیدی کردن نمونه، اسید اگزالیکیک از  $Ca^{2+}$  آزاد می گردد. تیتراسیون اسید اگزالیکیک با پرمنگنات پتاسیم منجر به بیرنگ شدن آن می گردد ( $MnO_4$  به  $Mn^{2+}$  تبدیل می گردد) .  
روش دیل - الینگبو : در این روش از معرف فلوروسان کالسنین (Calcein) استفاده می گردد.

### روش اورتوکروزول فتالین (کمپلکسومتری) :

در این روش از معرف اورتوکروزول فتالین استفاده می گردد . این روش مبتنی بر تشکیل کمپلکس رنگی بین معرف و کلسیم می باشد واکنش در محیط قلیایی صورت می گیرد و میزان جذب محلول رنگی (بنفش) به روش اسپکتروفتومتری (570 nm) مورد سنجش قرار می گیرد . برای حذف تداخل مربوط به بعضی از عناصر یا یونها دیگر (مانند منیزیم) از ترکیبی به نام 8-هیدروکسی کینولین استفاده می گردد . می توان به جای اورتوکروزول فتالین از معرف های دیگری مانند : آلزارین و آرسنازو III استفاده نمود که در این صورت تداخل منیزیم در این روشها وجود ندارد . روشهای کمپلکسومتری از رایجترین روشهای اتوماتیک محسوب می گردند .

### اندازه گیری کلسیم آزاد (یونیزه) :

برقرار بودن تعادل میان کلسیم یونیزه و کلسیم متصل به پروتئین موجود در سرم (در تمام مراحل آزمایش) شرط لازم جهت اندازه گیری  $Ca^{2+}$  (کلسیم یونیزه) می باشد . از الکترودهای اختصاصی یا انتخابگر یون ISE (Ion Selective Electrode) و یا از ترکیباتی مانند تترا متیل مورکساید (Tetra methyle murrexide) می توان استفاده نمود .

### محاسبه کلسیم آزاد (یونیزه) :

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

$$\text{میزان کلسیم یونیزه} = \frac{\text{پروتئین تام سرم} - \text{کلسیم تام سرم} \times 6}{6 + \text{پروتئین تام سرم}}$$

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

از مهمترین روشهای اندازه گیری کلسیم محسوب می گردد (روش مرجع) که برای سنجش کلسیم تام مورد استفاده قرار می گیرد . (در بخش جداگانه ای مورد بحث قرار گرفته 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 پلاسما هیپارینه 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 غیر آلی 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 هیدروکسی آپاتیت 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  $Mg^{2+}$  ,  $Ca^{2+}$  ,  $Na^{+}$  می‌باشد و باقیمانده

(55%) آن به شکل آزاد وجود دارد . استرهای فسفات آلی عمدتاً در درون عناصر سلولی خون وجود دارند . فسفات غیر آلی (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 cAMP, cGMP, NADP و ... دارد .

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

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 800-1000 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 کم کلسیم ، 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.

### هیپرفسفاتی **Hyperphosphatemia** (افزایش فسفر سرم) :

الف - کاهش دفع کلیوی فسفات :

کاهش میزان فیلتراسیون کلوامولی  
- نارسایی حاد و مزمن کلیوی

افزایش باز جذب 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 مختلط 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

### هیپوفسفاتی **Hypophosphatemia** (کاهش فسفات سرم) :

الف - دفع کلیوی فسفات :

1. هیپوپاراتیروئیدیسم اولیه و ثانویه  
2. نقص‌های توبول کلیوی

- هیپوفسفاتی خانوادگی  
- سندرم فانکونی

ب - کاهش جذب روده‌ای فسفات :

1. افزایش اتلاف فسفات  
- استفراغ (Vomiting)

- اسهال (Diarrhea)

- 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 آن 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، پارآمینوئنتل 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 تری کلرواستیک 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 فیل 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

اسید مولیبدیک + فسفر (نمونه صاف شده عاری از پروتئین)

فسفو مولیبدات

(ترکیبات احیاکننده مذکور)

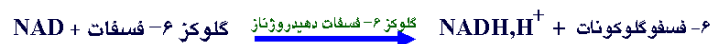
مولیبدن آبی (660 nm)

ریبوز ۱- فسفات + هیپوگزانتین  $\xrightarrow{\text{پورین نوکلئوزید فسفریلاز}}$  اینوزین + فسفات

آب اکسیژنه + اسید اوریک  $\xrightarrow{\text{گزانتین اکسیداز}}$  اکسیژن + آب + هیپوگزانتین

ترکیب رنگی + آب  $\xrightarrow{\text{پراکسیداز}}$  ماده رنگ زا + آب اکسیژنه

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 اسپکتروفتومتر سنجیده می‌شود. واکنش در pH خنثی صورت می‌گیرد. از اینرو می‌توان فسفر غیر آلی را در حضور فسفاتهای آلی ناپایدار اندازه‌گیری کرد.



نمونه مورد نیاز و نکات مورد توجه در سنجش فسفات :

1. برای سنجش فسفات بهتر است از نمونه سرمی استفاده گردد، هرچند می‌توان از پلاسما یا پلاسما هیپارینه 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: سیترا، اگزالات و EDTA نباید استفاده نمود، زیرا در تشکیل کمپلکس فسفومولیدات 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 اریتروسیته‌ها جدا گردد.
4. از نمونه‌های همولیز شده نباید استفاده نمود به علت اینکه اریتروسیته‌ها 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°C 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 20-30 میلی‌لیتر اسید کلریدریک 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) می‌باشد. 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 غیر همی می‌باشند.

### هموگلوبین (Hb):

تقریباً 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  $\beta_1$ -گلوبولین (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 تقریباً 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 اکسی هیدروکسید آهن III ( $FeOOH$ )<sub>x</sub> 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 میتواند 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 میگردد به  $Fe^{3+}$  اکسیده میگردد. کریستال مرکزی میتواند حاوی تقریباً 4000 اتم آهن باشد اما معمولاً 2000 و یا کمتر از 2000 اتم آهن در آن قرار میگیرد. آزاد شدن آهن از فریتین احتمالاً 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 تقریباً در همه سلولهای بدن یافت میگردد. در هپاتوسیتها 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 دپروتینه 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 کوچکتري می‌باشد. شبیه به فریتین، هموسیدرین هم به طور طبیعی غالبا در سلولهای کبد، طحال و مغز استخوان یافت می‌گردد.

### 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 تراامری تشکیل نمی‌دهد و تحت تاثیر غلظت 2,3-DPG (2و3-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.

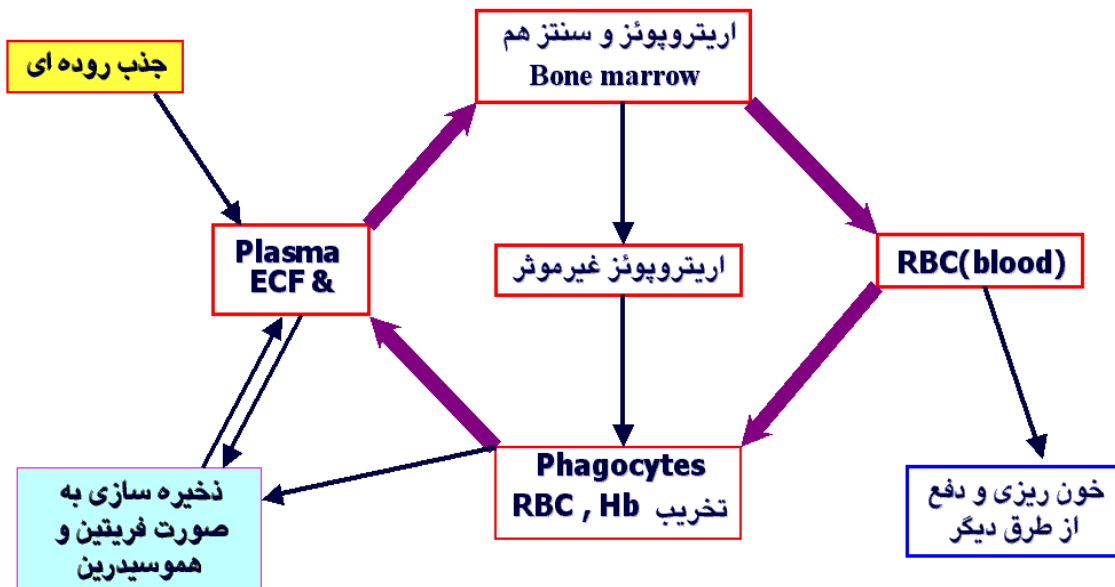
## جذب ، انتقال ، دفع آهن (متابولیسم آهن):

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 (Membrane Iron Binding Protein)MIBP در غشای آنتروسیت متصل شده و وارد آن می‌گردد. بنابراین عواملی که باعث احیای آهن فریک به فرو می‌گردند (اسیدپته محیط ، ویتامین C ، اسیدهای آمینه ، پروتئینها و ...) افزایش دهنده جذب آهن و عواملی که ممانعت از احیای آهن فریک به فرو می‌گردند (کاهش اسیدپته معده ، مصرف سایمتیدین و ...) و همچنین کلسیم  $Ca^{2+}$  و عوامل دیگری مانند تانات (در جای) ، فیتاتها ، فیبرهای گیاهی ، اگزالات ، فسفات ، براشته شدن معده یا دودنوم (با جراحی) ، بیماری سلیاک (نوعی بیماری سوء جذب 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 اپی تلیوم 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 آپوفرتین 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 می‌ماند 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 در حدود 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 می نماید . اغلب آهنی را که از دست می رود ناشی از مقادیر بسیار مشخصی از آهن موجود در سلولهای اپی تلیال و RBC های موجود در ادرار و مدفوع میباشد. با هر چرخه (سیکل) قاعدگی تقریباً 40-80 میلی لیتر 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 می باشد و بویژه این تفاوت با رسیدن به سن بلوغ شروع می شود و در یائسگی از بین می - رود. آندروژنها آهن پلاسما را افزایش و استروژنها آن را کاهش می دهند.



## 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 می شود . در بچه ها بیشتر به علت کمبود تغذیه ای می باشد به علت اینکه شیر حاوی آهن کمی می باشد. در بالغین تقریباً همیشه به علت از دست رفتن مزمن خون است. اندازه گیری غلظت Fe سرم و TIBC در تشخیص آن مورد استفاده قرار می گیرند، هر چند ارزیابی غلظت فریتین سرم یک تست حساستر و معتبرتر برای تشخیص این ناهنجاری می باشد. پروتوپورفیرین اریتروسیتهی 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 آسپیره ای از مغز استخوان می باشد که بوسیله واکنش آبی پروسی Prussian blue (پتاسیم فروسیانید) انجام میگردد 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 فیروز مشاهده می‌گردد. افزایش بار آهن اغلب منتج از جذب مزمن و اضافی آهن از یک رژیم غذایی طبیعی می‌باشد. هموکروماتوز به دو شکل اولیه و ثانویه وجود. در این بیماریها افزایش آهن کل بدن در حدی است که باعث آسیب بافتی می‌گردد. هموکروماتوز اولیه ناشی از نقص ژنتیکی در جذب آهن می‌باشد. مکانیسم دقیق آن ناشناخته 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 **دیابت ملیتوس**، **آرتروز**، **آریمی قلبی** یا **نارسایی قلبی**، **سیروز کبدی**، **هیپوتیروئیدسم**، **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 می‌باشد زیرا افرادی که درمان نگرند اغلب می‌میرند. برای درمان در هر هفته یک یا دو بار خون‌گیری (500 ml خون) باید صورت گیرد که باعث خروج حدوداً 250 mg آهن (به ازای هر 500 ml خون) از بدن فرد بیمار می‌گردد که مجموعاً به طور تقریبی حدود 50 لیتر خون باید برداشت گردد. استفاده از دسفریوکسامین (Desferrioxamine) یا Desferal باعث شلاته کردن Fe و دفع آن از طریق ادرار می‌گردد.

هموکروماتوز ثانویه بیشتر بر اثر تزریق زیاد خون (ترانسفوزیون مکرر) و دریافت زیاد آهن از طریق غذا (به ویژه در مناطقی از آفریقا که آبجو را در ظروف آهنی تهیه می‌نمایند) ایجاد می‌گردد و همچنین رسوب آهن در سلول‌های 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 ALA-2 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 می‌گیرد. بسته به متد مورد استفاده غلظت آهن سرم معمولاً بیشتر از 150 µg/dl در افراد با اورلود آهن میباشد. معمولاً اشباع ترانسفرین متجاوز از 60% نشانگر افزایش بار آهن می‌باشد. در حالات پیشرفته تر، میزان اشباع ترانسفرین اغلب به 90% نیز می‌رسد. در مقایسه با اندازه‌گیری اشباع ترانسفرین، ارزیابی فریتین سرم، برای اثبات (تشخیص زود هنگام) افزایش بار آهن (Overload) حساس نمی‌باشد 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 می‌نماید:



### علل عمده افزایش آهن سرم :

- افزایش تخریب یا همولیز
- افزایش رها سازی آهن و یا فریتین از بافتهای بدن ، نکرروز حاد کبد و ...
- کاهش تولید Hb ؛ مسمومیت با سرب ، کمبود پیردوکسین و ...
- اریتروپوئز غیر موثر (Ineffective erythropoiesis) .
- افزایش جذب آهن (Iron overload) : هموکروماتوز و هموسیدروز (ترانسفوزیون 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 **یک سوم** 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 می تواند به پروتئین های سرم به ویژه ترانسفرین متصل گردد گفته می شود. مقدار TIBC در ناهنجاریهای متابولیسم آهن تغییر می نماید.

### 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 یا کاهش 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 ذخیره ای در غلظت فریتین پلاسما منعکس می گردد. در واقع فریتین شاخص مناسبی جهت ارزیابی کمبود کلی آهن محسوب می گردد، به شرطی که بیماری های دیگری که تغییر دهنده میزان فریتین می باشد به موازات کمبود آهن وجود نداشته باشد. به علت اینکه در تعداد زیادی از بیماری های مزمن، غلظت فریتین افزایش می یابد. مانند بیماری های مزمن التهابی و تومورهای بدخیم و نیز در عفونت و هیپاتیت ویروسی. که به رغم کاهش ذخایر آهن بدن مقادیر فریتین طبیعی و یا بالا می باشد (همچنین در هموسیدروز و هموکروماتوز).

### اساس اندازه گیری آهن و TIBC :

با کاهش pH سرم (با افزودن اسید کلریدریک) آهن از ترانسفرین آزاد می گردد و با استفاده از اسید تری کلرو استیک (TCA) ، پروتئین های آن را رسوب می دهند . از آنجایی که معرف های مورد نظر با آهن دو ظرفیتی واکنش می دهند ، از مواد احیاکننده نظیر اسید آسکوربیک جهت تبدیل  $Fe^{3+}$  به  $Fe^{2+}$  استفاده می گردد ، در مرحله بعد پس از سانتریفوژ کردن ، آهن فروری موجود در مایع رویی با کروموژنی که حاوی گروه واکنشگر  $-N=C-C=N-$  می باشد، کمپلکس تشکیل می دهد (این ترکیبات دارای ساختاری مشابه با EDTA می باشند). کاتیونهای فلزی قادرند در بین دو نیتروژن شلاته گردند. کمپلکس تشکیل شده بین آهن-کروموژن دارای جذب بسیار بالایی میباشد و میزان جذب متناسب با غلظت آهن در نمونه میباشد . معمولاً از کروموژنهایی مانند: **تیروزیت (Tyrosite)** ، **باتوفناترولین (Bathophenanthroline)** و **فروزین (ferrozine)** و **تویازین** استفاده می گردد . این روش بعلاوه دقت و حساسیت ، به عنوان روش مرجع (فرانس) کاربرد دارد . در متدهایی که یک مرحله دپروتئینه کردن نیز انجام می گیرد نتایج حاصل از آنها بیشتر از مقادیری است که بدون دپروتئینه کردن سرم حاصل شده است .

**نکته مهم :** برای ساختن معرفها از آب مقطر دیونیزه (بدون یون) باید استفاده نمود و از طرفی معرفهای مصرفی نیز باید عاری از آهن باشند . شیشه آلات ، لوازم پلاستیکی و پیتها 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 می گردد. از روشهای دیگر مانند اسپکتروفتومتری جذب اتمی (AAS) و اسپکتروفتومتری نشری و اسپکتروفتومتری فلورسانس با اشعه X نیز میزان آهن مورد سنجش قرار می گیرد .

**TIBC :** با افزودن  $Fe^{3+}$  ، برای اشباع نمودن مکانهای اتصالی ترانسفرین، می توان میزان TIBC را بدست آورد . با افزودن کربنات منیزیم ( $MgCO_3$ ) ، مازاد  $Fe^{3+}$  موجود در محیط حذف می گردد 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 نمایم :

$$\text{اشباع ترانسفرین (\%)} = \frac{\text{آهن سرم}}{\text{TIBC}} \times 100$$

از روشهای مستقیم سنجش ترانسفرین به روشهای ایمنو اسی آنزیمی (EIA) ، با استفاده از آنتی بادی منوکلونال می توان اشاره نمود . از امتیازات آن نیاز به مقادیر کم نمونه و عدم حساسیت به آلودگی های آهنی است . برای محاسبه غلظت ترانسفرین می توان از رابطه زیر نیز استفاده نمود (میزان TIBC بر حسب  $\mu\text{gr/dl}$ ):

$$\text{ترانسفرین سرم (gr/L)} = 0.7 \times \text{TIBC}$$

گرچه این ارتباط کاملاً 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 می باشد . به روشهایی مانند روش IRMA (ایمونورادیومتری کاسی) و ELISA فریتین را می توان اندازه گیری نمود .

### نمونه مورد نیاز :

نمونه ترجیحاً سرمی و غیر همولیز باشد . نمونه های پلاسمایی تهیه شده با EDTA ، اگرالات یا سیترات نامناسب می باشد ، بعلت اینکه به آهن متصل شده و از واکنش آن با کروموژن ممانعت می نماید .

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

\* \* \*

#### مقادیر نرمال آهن سرم :

65 - 175  $\mu\text{gr/dl}$  برای مردان :

50 - 170  $\mu\text{gr/dl}$  برای زنان :

100 - 250  $\mu\text{gr/dl}$  هنگام تولد :

#### مقادیر نرمال درصد اشباع آهن :

20 - 50 % برای مردان :

15 - 50 % برای زنان :

#### میزان نرمال TIBC :

100 - 400  $\mu\text{gr/dl}$  برای نوزادان :

250 - 425  $\mu\text{gr/dl}$  برای بالغین

#### میزان نرمال ترانسفرین سرم :

2/15 - 3/8 gr/L در بالغین :

#### میزان نرمال فریتین سرم :

20 - 250  $\mu\text{gr/L}$  برای مردان :

10 - 120  $\mu\text{gr/L}$  برای زنان :

25 - 200  $\mu\text{gr/L}$  هنگام تولد :

## 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 کمربند جمع‌آوری می‌نمایند. معمولاً 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 میکروبیولوژیکی (این لوله را باید در حرارت اتاق نگهداری نمود، زیرا ارگانیس‌هایی مانند هموفیلوس آنفلوانزا و نایسریا منتریتیدیس 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 سیتولوژیکی (سلولی) و شیمیایی در محل‌های نمونه‌گیری مختلف متفاوت هستند بنابراین محل نمونه‌گیری (مانند: کمربند، 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 کمربند صورت گیرد.

نکته 4: 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 اساساً 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 بعلا 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 ملکولی شان 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 میکروارگانسمها (بی 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** معمولاً 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 مننژیت 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 مننژیت کریپتوکوکی (بعلت پلی‌ساکارید کپسولی) دیده شود.

**گزانتوکروم (Xantochrome) CSF:** سانتیفریژ 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).

**تکنه:** 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. ثانیاً 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 معمولاً تنها زمانی صورت می‌گیرد که جراحی تروماتیک وجود داشته و برای لکوسیتها یا پروتئین وارد به نمونه لازم است عمل تصحیح انجام گیرد.

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

هرگونه شمارش سلولی را باید فوراً 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 **توانس تاپرتین** واضح: که به علت ساخت موضعی آن توسط شبکه کروئید نسبتاً زیاد می‌باشد.
2. باند **ترانسفرین اضافی**: باند ترانسفرین دوم که به آن  $\beta_2$ -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  $\beta$  را تشکیل می‌دهد].

α-گلوبولینها بیشتر شامل هاپتوگلوبولین و سرولوپلاسمین است.

γ-گلوبولینها نیز عمدتاً شامل IgG است ولی IgA هم وجود دارد اما IgM وجود ندارد.

مقادیر پروتئین CSF در پروسه‌های التهابی و عفونی از قبیل مننژیت، 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-گلوبولین تشکیل می‌دهد. نسبت آلبومین به گلوبولین (A/G) در CSF بیشتر از این نسبت در پلاسما است چرا که اندازه آلبومین کوچکتر از گلوبولین بوده و در نتیجه راحت‌تر از سد خونی-مغزی عبور می‌کند. در مبتلایان به بیماری MS، نوروسیفیلیس یا بیماری دژنراتیو نخاعی و مغز، نسبت گلوبولین (از پروتئین تام) افزایش می‌یابد. بالا رفتن سطح IgG، افزایش نسبت IgG به سایر پروتئینها (مثل آلبومین) و یافتن **باند اولیگوکلونال γ-گلوبولین** در CSF همگی قویاً مطرح‌کننده بیماریهای التهابی و اتوایمون سیستم عصبی مرکزی به خصوص MS هستند.

کاهش غیرطبیعی پروتئین CSF هنگامی وجود دارد که از سیستم عصبی مرکزی نشأت می‌گیرد. در برداشت زیاد مایع و هیپرتیروئیدسم نیز کاهش پروتئین دیده می‌شود.

## روشهای اندازه گیری پروتئین در CSF :

معمولترین روشهای اندازه گیری پروتئین CSF، روش کدورت سنجی (Turbidimetry) و روش رنگ اتصالی (Dye-binding) می باشد.

در روش کدورت سنجی (توریدیمتری) از اسید سولفوسالیسیلیک (SSA) یا اسید تری کلرواستیک (TCA) برای رسوب پروتئین استفاده می گردد. TCA مناسب تر است زیرا آلومین و گلوبولین را به یک اندازه رسوب می دهد اما هنگام استفاده از SSA، آلومین بیشتر از گلوبولین 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 می گردد. هر دو تکنیک کدورت سنجی و رنگ اتصالی برای اندازه گیری غلظت پروتئین نام طراحی شده اند اما برای تشخیص اختلالات عصبی که همراه با غیرطبیعی بودن پروتئین CSF است اندازه گیری جداگانه فراکسیونهای پروتئین لازم است. بیماریهایی مانند مالتیپل اسکلروز (MS) که سلولهای متعهد ایمنی را در CNS تحریک می نمایند نسبت بالاتری از IgG را نشان می دهند. 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 آلومین و ضریب IgG استفاده می گردد.

چون آلومین در CNS ایجاد نمی گردد بنابراین افزایش هر دو نشان از صدمه سد خونی-مغزی دارد و در حالت تولید بالای IgG فقط IgG افزایش دارد. بدلیل اینکه تغییرات غلظت آلومین می تواند نسبت IgG به آلومین را تحت تاثیر قرار دهد از اندکس IgG استفاده می گردد. مقدار اندکس پایین تر 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

رادویایمونواسی اختصاصی تر است. از الکتروفورز هم می توان استفاده کرد. تا 95 درصد مبتلایان به مالتیپل اسکلروز یک اولیگوکلونال مشخصی را بر روی ژل آگارز نشان می دهند.

## سایر پروتئینهای CSF :

**$\alpha$ -2-ماکروگلوبولین (AMG) :** این پروتئین به علت اندازه بزرگی که دارد عموماً بطور طبیعی در CSF وجود ندارد. افزایش قابل توجه آن بازتابی از خونریزی زیر سخت شامه یا نقص BBB است که به عنوان مثال در مننژیت باکتریایی رخ می دهد.

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

## گلوکز CSF :

گلوکز با عبور انتخابی از سد خونی-مغزی وارد CSF می گردد و این باعث می شود 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 می کند زیرا تاخیری در زمان تعادل گلوکز CSF وجود دارد. برای ارزیابی بهتر لازم است گلوکز سرم نیز اندازه گیری 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 فوراً آزمایش کرد زیرا در CSF گلیکولیز به سرعت انجام می‌شود.

افزایش گلوکز همیشه دلالت بر افزایش پلاسماپی 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 وضعیهای مذکور را رد نمیکنند].

### 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 معمولاً زیر 25 mg/dL و تقریباً 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 30-36 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<sub>1</sub>، LDH<sub>2</sub> است در حالیکه نوتروفیل حاوی LDH<sub>4</sub>، LDH<sub>5</sub> می‌باشد. بنابراین افزایش LDH<sub>4</sub>، LDH<sub>5</sub> نشانگر مننژیت باکتریایی و افزایش LDH<sub>1</sub>، LDH<sub>2</sub> 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 غالباً از نوع CK-BB (مغزی) است ولی مقادیر کمی از CK-MM و CK-MB به احتمال زیاد ثانویه به آلودگی با خون هستند. افزایش CK-BB در موارد زیر دیده می‌شود: دمیلینئزاسیون، صرع، سکنه 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  $\alpha$ -کتوگلو تارات 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  $35 \text{ mg/dL}$  تقریباً همیشه با آنسفالوپاتی کبدی همراه است. [غلظت طبیعی آن  $8-18 \text{ mg/dL}$  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 در حالیکه 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 معمولاً به آزمایشگاه فرستاده می‌شود از زانو کشیده می‌شود. این عمل آرترو سنتز (Arthrocentesis) نامیده می‌شود. بدلیل اینکه حتی مفاصل بزرگی مانند زانو بطور طبیعی بیشتر از  $4 \text{ ml}$  مایع سینوویال ندارند بنابراین به جز در مواردی که افزون (نشت) وجود دارد نمونه‌گیری با حجم کم انجام می‌گیرد. در آرترو سنتز روتین سرنگ را با **سدیم هپارین** باید هپارینه نمود. از بکار بردن ضد انعقادهایی مانند اگزالات، پودر EDTA و لیتیم 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 میکروب شناسی.
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 بر روی برخی از باکتریهای پاتوژن دارد.

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

✓ SF اصولاً 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 ارگانسیم مسئول و پاسخ میزبان (WBC, RBC) 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 کدر کند و به رنگ شیری درآورد.

شمارش گلبولهای سفید به علت تخریب سلولی که یک ساعت پس از آرتروستز شروع می‌شود، باید فوراً صورت گیرد.

برای شمارش سلولها می‌توان از شمارشگرهای سلولی خودکار (توماتیک) استفاده نمود ولی استفاده از آنها با خطر انسداد دستگاه همراه است و ذرات غیر WBC (بلورها، گلبولهای چربی) سبب کسب نتایج بالای کاذب می‌شوند.

شمارش سلولی بالای  $50000/\mu\text{L}$  نیازمند رقیق کردن نمونه است اما به منظور جلوگیری از تشکیل لخته موسین و توده‌شدن سلولی، این کار باید با سالیین انجام گیرد نه با اسید استیک.

SF بسیار چسبناک باید قبل از شمارش (بخصوص هنگامی که از شمارشگرهای خودکار استفاده می‌گردد) 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، **آرتريت نقرسی** نامیده می‌شود. شایعترین کریستالهای مسئول آرتريت 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 سریعاً پس از گرفتن نمونه انجام گیرد، زیرا تغییر در حرارت و  $\text{pH}$  مایع می‌تواند روی انحلال پذیری کریستال اثر گذاشته و نتایج غلطی را بدنبال داشته باشد.

قرار دادن نمونه‌ها در یخچال، انحلال پذیری 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 دی‌اکسید کربن،  $\text{pH}$  افزایش یافته و کریستالهای فسفات کلسیم 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 آرتريت میزان آن کاهش می‌یابد. افزودن اسید استیک به SF، باعث رسوب اسید هیالورونیک به صورت لخته موسین می‌گردد که براساس میزان رسوب به سه درجه 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 آرتريتهای 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. ایده آل 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 در حد کمتر از  $10 \text{ mg/dL}$  می‌باشد، اما در آرتریت چرکی و سایر بیماریهای التهابی این تفاوت در حدود  $20-60 \text{ mg/dL}$  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  $3 \text{ gr/dL}$  می‌باشد (تقریباً یک سوم 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 غیرالتهابی به موازات اسید اوریک سرم است.

## آزمایشات میکروشناسی:

استافیلوکوک طلائی، باسیلهای گرم منفی و گنوکوک از شایعترین علل آرتریت چرکی می‌باشد. تمام نمونه‌ها به روش گرم رنگ-آمیزی می‌شوند. در کشت‌های باکتریایی معمولی، حتماً باید یک محیط مغذی مثل شکلات آگار هم وجود داشته باشد، زیرا علاوه بر استافیلوکوک و استریتوکوک، باکتریهای سخت رشد مانند هموفیلوس و نایسریا از معمولترین ارگانیس‌هایی 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 منشأ 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 ضد هسته‌ای (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 بر روی 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 می‌گیرد.

مایعات سروزی بصورت فراپالیده‌ای از پلاسما می‌باشد. مقدار ناچیزی پروتئین به آنها وارد می‌شود که بوسیله سیستم لنفاوی خارج می‌گردد. 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، **توراستتر (Thoracentesis)** نامیده می‌شود، آسپیراسیون مایع پریکارد، **پریکاردیوسنتز (Pericardiocentesis)** و آسپیراسیون مایع صفاق، **پاراستتر (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 می‌توان 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 می‌شود. مانند: نارسایی احتقانی قلب که منجر به تغییر در فشار هیدروستاتیکی درون عروق و نتیجتاً منجر به افوزیون می‌گردد.

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 معمولاً 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 سروزی به LDH سرم کمتر از 0/6، شمارش سلولی کمتر از 1000 / $\mu$ L.

### 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 سروزی به LDH سرم بیشتر از 0/6، شمارش سلولی بیشتر از 1000 / $\mu$ L.

## 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 آگزودایی ایجاد می‌کنند. بنابراین تمایز مایع از نظر ترانسودا یا آگزودا می‌تواند با اهمیت باشد. از آنجاییکه مایع پلور صرفاً فراپالیده پلاسمایی است از نظر شیمیایی مقادیر طبیعی آن مانند پلاسما است. علاوه بر آزمونهای شیمیایی که برای افتراق ترانسودا و آگزودا 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 سلولی 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.

با وجود اینکه برآورد شاخصهای توموری از جمله CEA (کارسینو امبریونیک آنتی‌ژن) به عنوان یک تست معمول توصیه نمی‌شود، این نشانگرها می‌توانند در آگزوداهای 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	کدورت: گلبولهای سفید و میکروارگانیسمها
خون: صدمه تروماتیکی، بدخیمی	شیری: مواد شیلی
رنگ آمیزی با سودان III: مواد شیلی	نوتروفیلها: عفونت باکتریایی
لنفوسیتها: سل، بدخیمی	گلوکز طبیعی: به موازات گلوکز سرم است
گلوکز پایین: سل، التهاب روماتوئیدی، بدخیمی	pH پایین: سل، بدخیمی، پارگی مری
افزایش آمیلاز: پانکراتیت	CEA: بدخیمی

## مایع پریکارد (Pericardial Fluid) :

بطور طبیعی تنها مقدار کمی (10 تا 50 میلی لیتر) مایع شفاف به رنگ زرد کم‌رنگ بین غشاهای پریکارد وجود دارد. افزون‌های 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  $1000/\mu\text{L}$ ، 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	شیری: درناژ لنفاوی
کدورت: عفونت، بدخیمی	خون: سل، تومور، سوراخ شدگی قلب
نوتروفیلها: اندوکاردیت باکتریایی	گلوکز پایین: عفونت باکتریایی، بدخیمی
CEA: بدخیمی	

## مایع صفاق (Peritoneal Fluid) :

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

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

- ترانسوداها:

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

- آگزودا:

افزایش نفوذپذیری مویرگی یا کاهش جذب لنفاتیک؛ عفونتها (سل، پریتونیت باکتریایی اولیه، آپاندیسیت)، نئوپلاسمها یا بدخیمی‌ها،

تروما، پانکراتیت، پریتونیت صفاوی (مانند پارگی کیسه صفا)

مایع صفاق طبیعی، همانند مایع پلور و پریکارد، شفاف و به رنگ زرد کم‌رنگ می‌باشد. آگزودا در عفونتهای باکتریایی و قارچی کدر

بوده و در صورت وجود صفا، 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 پاراستتر 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 فیروز کیستی (CF)، الکترولیتهای عرق (سدیم و کلر) را اندازه‌گیری می‌کنند. CF بیماری متابولیکی است که روی غدد ترشح‌کننده موکوس اثر می‌گذارد. چون این بیماری چندین ارگان را گرفتار می‌کند، لذا علائم 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 هر کدام 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 و مجاری 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 هم می‌شود که جذب نشده و توسط باکتریهای روده به پورفیرینهای مشتق از هم تبدیل می‌شوند. خونریزی در نواحی پروگزیمال کولون باعث تجزیه باکتریایی گلوبین و هم 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 هم 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، عمدتاً براساس تشخیص فعالیت شبه پراکسیدازی هم 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.



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 رژیم 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 ایمنوشیمی 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 خون 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، بعداً 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 دنا تورا سیون 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 (Steatorrhea) 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، فیروز 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  $^{14}\text{C}$  و به دنبال آن اندازه‌گیری میزان  $^{14}\text{CO}_2$  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  $\text{CO}_2$  مشتق از متابولیسم اسیدهای چرب تری‌گلیسرید در هوای بازدمی، می‌شود.

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