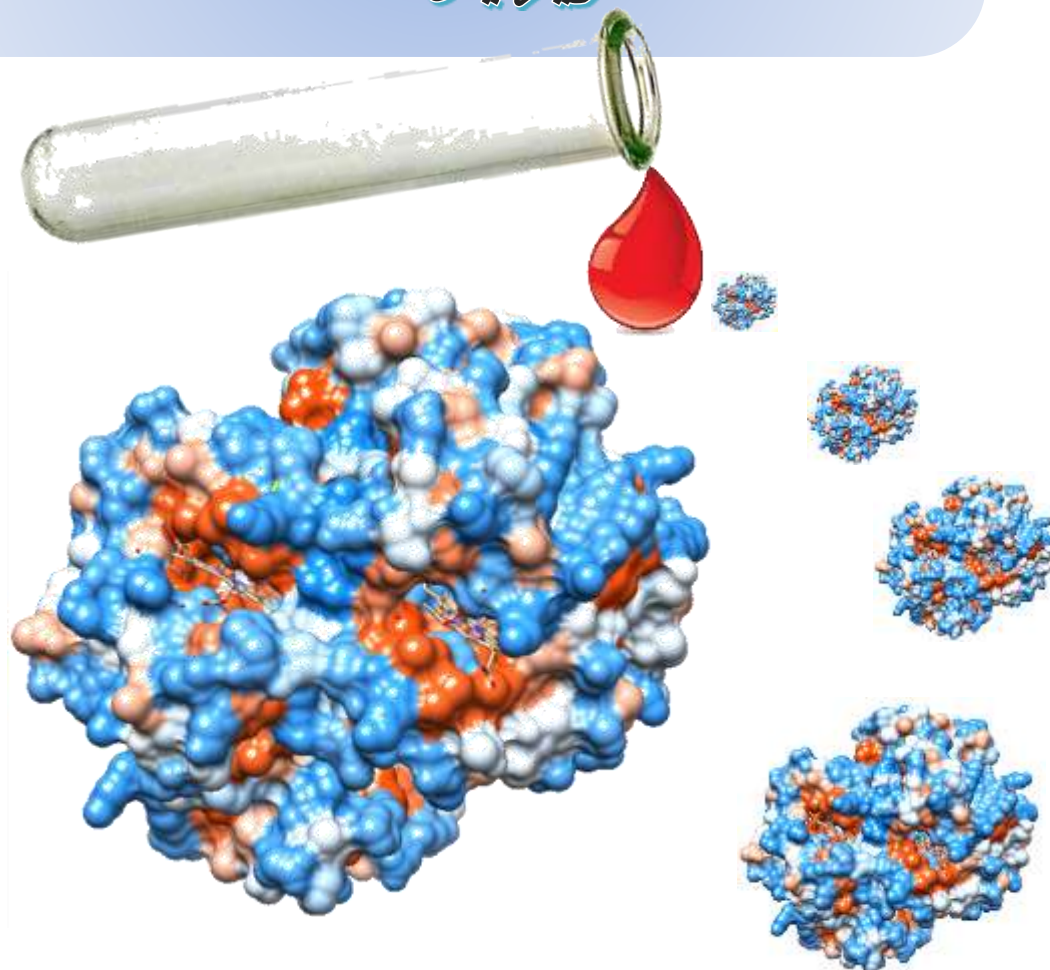


آزمایشگاه بیوشیمی پزشکی و بالینی
ویژه دانشجویان رشته‌های علوم پزشکی

ویرایش نخست

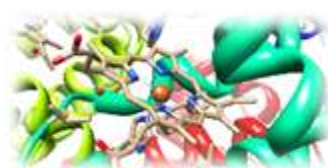


$$C1V1 = C2V2$$

عبدالرحیم آب‌سالان: دانشجوی دکتری تخصصی بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس



فرشته پرتو: کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی





بنام خداوند جان و جهان خداوند بخشنده و مهربان

یکی از مهمترین مسائل مورد ابتلای اساتید و دانشجویان، چگونگی تعامل با روش‌های آموزش است. بطور معمول، کلاس‌های درس آزمایشگاهی برای دانشجویان جذاب و مورد توجه‌اند زیرا آنچه را که جنبه نظری دارد، بصورت عملی و قابل حس درک می‌کنند. دیدگاه اساتید پیشکسوت این است که: تدریس یک هنر است؛ این هنر فراورده دانش، سلیقه و تعهد می‌باشد و استاد هر قدر دانشمندتر، خوش سلیقه تر و متعهدتر باشد، کلاس درسش برای دانشجویان مفیدتر خواهد بود.

بیوشیمی پزشکی و بیوشیمی بالینی جزو واحدهای درسی دانشجویان رشته‌های علوم پزشکی می‌باشند. این دروس به گفته بسیاری از دانشجویان، دروسی دشوار محسوب می‌گردند به این دلیل که: درک آنها نیازمند آشنایی با فیزیولوژی، زیست‌شناسی جانوری و سلولی-مولکولی، ژنتیک، شیمی آلی و معدنی، فیزیک حیاتی و برخی علوم دیگر است. لذا، گستره وسیعی از مرزهای دانش را در بر گرفته و درک مباحث آن دربرخی موارد دشوار است. لیکن، فراموش نکنیم که "مطالب دشوار را با دقت و تکرار می‌توانیم بیاموزیم".

در کتاب حاضر که مبتنی بر رفرانس‌های معتبر و همچنین، برخی تجربیات آموزشی و پژوهشی نویسندگان می‌باشد، تلاش شده تا برخی از مباحث درسی سرفصل‌های درس بیوشیمی پزشکی و بالینی، مطابق سرفصل‌های مصوب وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی به نحوی نگارش شوند که برای تدریس به دانشجویان محترم مفید باشند.

لازم به توضیح است که این کتاب ویرایش اول بوده و بصورت آنلاین منتشر می‌شود. ویرایش بعدی کتاب که دارای محتوای گسترده‌تری خواهد بود، در آینده‌ای نزدیک، به یاری پروردگار، و با همت یکی دیگر از همکاران عزیز بصورت نسخه چاپی منتشر خواهد شد.

لازم است تا از جناب آقای دکتر برد سباستین کمپس، که پیش از این نیز افتخار همکاری با ایشان در انتشار کتب دیگر را داشته‌ایم، تشکر و سپاسگزاری نمایم. این کتاب از وبگاه www.FreeBooks4Doctors.com بصورت رایگان منتشر می‌گردد. از کلیه عزیزانی که این کتاب را در وبگاه‌های خود منتشر می‌کنند، خواهشمندیم، بابت انتشار این کتاب هیچگونه مبلغی از علاقه‌مندان دریافت نکنند.

اساتید گرانقدر و دانشجویان عزیز می‌توانند با پست الکترونیک زیر ما را از دیدگاه‌های ارزشمند خود آگاه سازند:

a.r.absalan@gmail.com

عبدالرحیم آب‌سالان و فرشته پرتو

آبان‌ماه ۱۳۹۳

فهرست عناوین

۱	آشنایی با وسایل آزمایشگاهی
۶	علائم و هشدارها
۸	غلظت ها و محلول سازی
۱۷	اصول اسپکتروفتومتری (سنجش طیف نوری) و رسم منحنی استاندارد
۲۴	آزمایش اندازه گیری قند خون با روش گلوکز اکسیداز
۲۸	آزمایش اندازه گیری اوره (UREA) خون و ادرار
۳۳	آزمایش اندازه گیری کراتینین خون و ادرار
۳۶	آزمایش سنجش کلسترول در خون
۴۰	آزمایش سنجش تری گلیسرید در خون
۴۲	آزمایش سنجش اسید اوریک در خون
۴۴	آزمایش سنجش کلسیم خون
۴۶	آزمایش سنجش فسفر خون
۴۸	عوامل مؤثر بر فعالیت آنزیمها
۵۶	کروماتوگرافی (رنگ نگاری) (Chromatography)
۶۲	سنجش هموگلوبین A ₁ گلیکه (هموگلوبین متصل به قند) با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی
۶۶	الکتروفورز (Electrophoresis)
۷۱	آزمایشهای سریع ادرار
۷۱	آزمایشهای میکروسکپی ادرار:
۷۳	آزمایشهای میکروسکپی ادرار:
۷۶	کریستالهای معمول در ادرار
۸۲	سیلندرها (Casts)
۸۳	برخی انواع عوامل میکروبی در ادرار و شمای یک ادرار عفونی
۸۸	آزمایشهای سنجش ایمنی (Immunoassays)

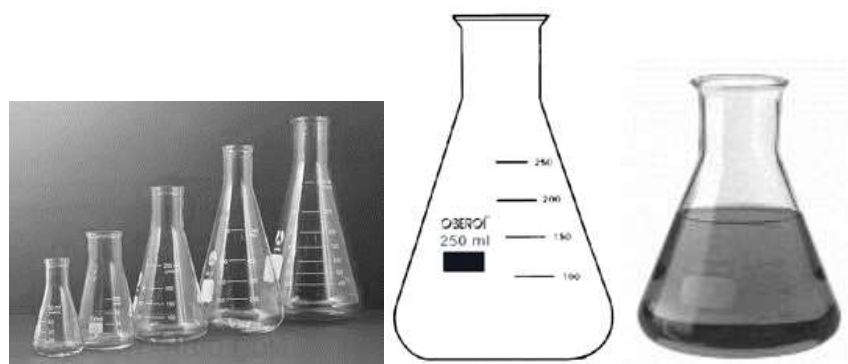
آشنایی با وسایل آزمایشگاهی

برای کار در آزمایشگاه لازم است که با کاربرد هریک از تجهیزات و وسایل موجود در آزمایشگاه آشنا باشیم. اگر کاربرد هریک از این تجهیزات را ندانیم، نخواهیم توانست به نحو صحیح آنها را بکار بگیریم. لذا، در ابتدا نگاهی اجمالی خواهیم داشت به برخی از تجهیزاتی که بطور معمول در آزمایشگاه با آنها سروکار داریم.

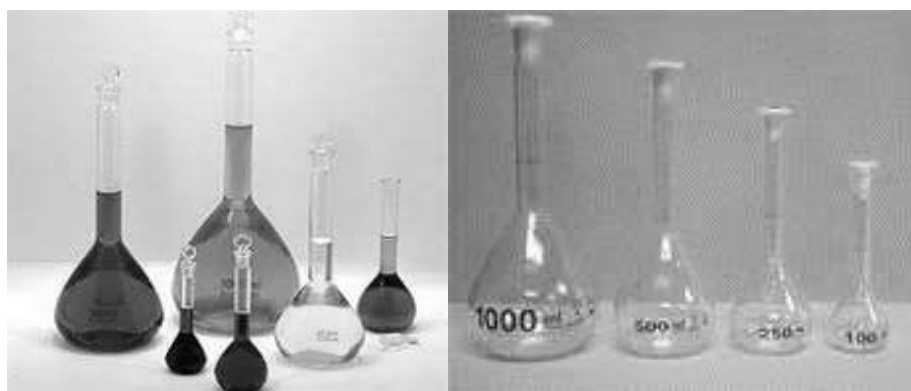
بِشور: ظرفی در حجم‌های مختلف که جهت برداشتن، نگهداری و حرارت دادن مواد استفاده می‌شود و درجه‌بندی آن تقریبی است (دقیق نیست).



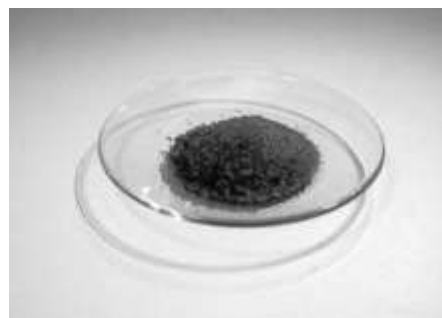
اِرلِن مایر: ظرفی مخروطی شکل جهت انتقال و حرارت دادن مایعات که انواع و حجم‌های مختلفی داشته و درجه‌بندی آن به‌طور تقریبی مشخص شده‌است (دقیق نیست).



بالن: وسیله‌ای شیشه‌ای که انواع مختلف آن کاربردهای متفاوت دارد؛ برای مثال، بالن ژوژه (بالن حجمی) جهت به حجم رساندن در محلول‌سازی به کار می‌رود. بالن ته‌گرد در تقطیر مورد استفاده قرار می‌گیرد. حجم بالن با خطی در قسمت بالایی ظرف مشخص شده‌است. بالن‌ها جزو تجهیزاتی هستند که دقیق می‌باشند و بهتر است برای محلول‌سازی از این ظروف استفاده کنید.



شیشه ساعت: شیشه به شیشه ساعت است و برای وزن کردن مواد جامد، حرارت دادن جهت خشک شدن استفاده می‌شود.



قیف: به صورت پلاستیکی یا شیشه‌ای وجود دارد. برای انتقال مایعات یا مواد پودری یا گرانوله به ظرفهای دهانه باریک مثل ارلن یا بالن و یا بورت استفاده می‌شود. همچنین با گذاشتن کاغذ صافی در قسمت مخروطی قیف و عبور دادن محلولها برای صاف کردن محلولها استفاده می‌شود.



پیپت معمولی و حبابدار: وسیله‌ی لوله‌ای شکل، باریک و بلند است که انواع و حجم‌های مختلفی دارد، مانند پیپت حبابدار، پیپت ساده، پیپت پاستور و پیپت مور. از پیپت‌ها جهت برداشتن و انتقال حجم معینی از مایعات استفاده می‌شود. پیپت مدرج دقیق‌ترین وسیله شیشه‌ای برای اندازه‌گیری حجم محسوب می‌شود و درجه‌بندی آن از بالا آغاز می‌شود. توجه داشته باشید که هیچگاه برای کشیدن مایعات بیولوژی (مانند خون، پلاسما و...) و مواد شیمیایی با پیپت از دهان استفاده نکنید بلکه از وسیله‌ای به نام **پوآر** استفاده نمایید.



پیست یا آفشان: ظرفی پلاستیکی با یک لوله در قسمت بالا یا کناری است که در طرح‌ها و حجم‌های مختلف وجود دارد. با فشردن تنه‌ی ظرف، مایع با فشار از لوله آن خارج می‌شود.

استوانه مدرج یا مزور: وسیله‌ای استوانه‌ای شکل با اندازه‌های مختلف است که درجه‌بندی آن از پایین شروع می‌شود. از این وسیله جهت اندازه‌گیری حجم مایعات و انتقال آنها استفاده می‌گردد.



پوآر: وسیله‌ای پلاستیکی است که به پیت متصل می‌شود و عمل مکش را انجام می‌دهد. ابتدا با فشردن همزمان قسمت حبایی پوآر حباب آنرا را از هوا تخلیه می‌کنیم، سپس پیت متصل به آن را در مایع مورد نظر فرو برده و دکمه تخلیه آنرا به آرامی فشار می‌دهیم تا حجم مورد نظر از پیت خارج شود. طرز کار با آنرا بطور عملی از استاد خود بیاموزید.



پیتور: یک دستگاه ساده برای انتقال حجم معینی از یک مایع و معمولاً مواد سمی می باشد. یک مخزن شیشه‌ای جهت ریختن مایع دارد که یک پیستون با یک لوله جانبی روی آن قرار می گیرد. پیستون را می توان روی حجم مورد نظر تنظیم کرد و با هر بار بالا و پایین کشیدن پیستون حجم تعیین شده از لوله جانبی خارج می شود. در واقع پیتور کار پیت و پوآر را به صورت سریع انجام می دهد.



علائم و هشدارها

توجه به علائم خطر و هشدار برای کار با همه مواد در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی، بالینی و تولیدی بسیار مهم است. چنانچه از درجه خطر یک ماده شیمیایی یا تجهیزات آزمایشگاهی اطلاع ندارید، به هیچ وجه با آن ماده کار نکنید و به آن دست نزنید. هرگز در آزمایشگاه از حس بویایی خود استفاده نکنید و برای دست زدن به ماد شیمیایی یا بیولوژیک از دستکش مناسب استفاده کنید. برخی از مهمترین علائم خطری که روی مواد آزمایشگاهی بصورت برچسب زده می‌شوند را در زیر مرور خواهیم کرد.

قبل از باز کردن درب ظرف و استفاده از هر گونه ماده‌ی شیمیایی باید به علائم و نمادهای نوشته شده توسط شرکت سازنده بر روی ظرف توجه نمود. این علائم شامل هشدارهای خطر (Risk) و هشدارهای ایمنی (Safty) می‌باشند. هشدارهای خطر به صورت R و یک عدد در کنار آن نشان داده می‌شود که به صورت توافقی برای هر عدد یک خطر یا آسیب تعریف شده‌است مثلاً R9 به این معناست که امکان انفجار در صورت مخلوط شدن با مواد قابل اشتعال وجود دارد. ممکن است یک ماده شیمیایی فاقد R باشد یا دارای یک یا گاهی بیش از یک R باشد.

هشدارهای ایمنی به صورت S و یک عدد در کنار آن نشان داده می‌شود که به صورت توافقی برای هر عدد یک نکته ایمنی یا حفاظتی یا مقابله با حادثه تعریف شده‌است مثلاً S8 به این معناست که ظروف را در جای خشک نگهداری کنید. ممکن است یک ماده شیمیایی فاقد S باشد یا دارای یک یا گاهی بیش از یک S باشد.

علاوه بر R و S، نمادهای خطر به صورت تصویر نشان داده می‌شود که هر تصویر بیانگر یک پیام خطر است. مانند شکل زیر؛ نوشته زیر هریک از علائم را ترجمه کنید تا مفهوم آنرا دریابید.



Old Hazard Symbols

یکی از نکات دیگری که باید به آن توجه شود تاریخ انقضا و دما و شرایط نگهداری است که بر روی ظرف حاوی ماده‌ی شیمیایی نوشته شده است. بنابراین مطالعه‌ی دقیق نوشته‌های موجود در برچسب مواد به شما کمک خواهد کرد تا از مواد به طرز صحیح و ایمن استفاده نمایید.

وزن مولکولی، فرمول مولکولی، درصد خلوص از جمله اطلاعات دیگری است که در برچسبها قید می‌شود. در زیر دو نمونه از برچسب‌های مواد شیمیایی آمده‌اند. آیا مفهوم جملائی که روی آنها نوشته شده است را می‌دانید؟ اگر مفهوم این جملات یا اصطلاحات را نتوانستید درک کنید، از استاد خود بخواهید برای شما مفهوم هریک را توضیح دهد.

100 mg A-2169 Lot 92H78011

SIGMA

3'-AZIDO-3'-DEOXYTHYMIDINE
(AZT; Azidothymidine) (30516-87-1)

Desiccate Store at less than 0°C

$C_{11}H_{14}N_4O_4$ FW 267.2
Purity > 99% (HPLC)
For laboratory use only. Not for drug, household or other uses.

TOXIC
Toxic by inhalation, in contact with skin and if swallowed. Target organ(s): Blood. Boric acid: If you feel unwell, seek medical advice (show the label where possible). Wear suitable protective clothing.



SIGMA CHEMICAL CO., P.O. Box 14508 St. Louis MO 63178-8816 USA 314-771-5750

sample 1.00160.9025 25 kg

H₂BO₃
M = 61.83 g/mol
CAS# 10043-35-3
Specifications:
Purity: 99.9% min
Loss on drying: 0.1% max
pH: 4.5-5.5
Residue on ignition: 0.1% max
Heavy metals: 10 ppm max
Microbial: 10⁴ CFU/g max
Complies to Ph. Eur. BP, NF

contains:
boric acid

EMPROVE® exp
Ph Eur, BP, NF
Boric acid
cryst., suitable for use as
excipient
Borsäure



Danger. May damage fertility. May damage the unborn child. Obtain special instructions before use. IF exposed or concerned: Get medical advice/attention. Restricted to professional users. Intended for laboratory and manufacturing use only. Not for drug, food or household use.
Gefahr. Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Nur für gewerbliche Anwender.

Index-No: 005-007-00-2
Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
Tel. +49(0)6151 72-2440
EMD Millipore Corp., 290 Concord Road
Billerica MA 01821, USA
Tel. +1-978-715-1335

Made in Germany

غلظت ها و محلول سازی

غلظت (Concentration): مقدار یک ماده مشخص در یک ترکیب؛ به صورتهای زیر عنوان می شود؛

۱- بر اساس جرم ماده حل شده در محلول؛ مثلاً 15 g/l محلول NaCl یعنی در ۱ لیتر محلول ۱۵ گرم NaCl وجود دارد.

۲- بر اساس ترکیب درصد یا تعداد واحدهای ماده حل شونده در محلول؛ مثلاً محلول 15 g/dl (گرم در دسی لیتر) یا همان 15 g/100 (گرم در ۱۰۰ میلی لیتر = سی سی) ماده NaCl یعنی ۱۵ گرم از NaCl در ۱۰۰ میلی لیتر حل شده است.

محلول ۱۵% نمک طعام (NaCl) (بدون آنکه واحد حجم مشخص باشد) یعنی از هر ۱۰۰ گرم آب مقدار ۱۵ گرم NaCl و مابقی (مقدار ۸۵ گرم) نمک طعام است.

سؤال: تفاوت 15 g/dl با 15 g/ml در چیست؟

محلول (Solution): ترکیب دو یا چند ماده بطوریکه یکی بطور یکنواخت در دیگری حل شده باشد. مثلاً محلول آب قند در تمام قسمتهای محلول غلظت یکنواخت دارد پس یک محلول است.

حلال (Solvent): ماده ای که ماده دیگری در آن حل می شود تا محلولی ساخته شود.

حل شونده (Solute): ماده ای که در محلول حل شده است.

انواع محلولها: گاز در مایع، مایع در مایع، جامد در مایع

مول (Mole): واحد جرم هر ماده می باشد که برای ذرات متنوع و متعددی استفاده می شود (مثلاً برای اتمها، مولکولها، یونها، الکترونها و غیره).
1 مول از هر ماده، معادل 6.02×10^{23} ذره از آن ماده است (عدد Avogadro).

برخی کاربردهای محلول سازی در علوم پزشکی:

تزریق دارو یا محلولهای بافری به بیمار، تهیه و ساخت داروها، تهیه محلولهای شستشوی بدن و ضدعفونی پوست یا زخمها، تهیه محلولهای گندزدا برای استریل کردن محیط، تهیه محلولهای آزمایشگاهی (مثلاً برای رسم منحنی استاندارد، تهیه محلولهای ذخیره و محلول کار) و

محلول ذخیره (Stock solution): محلولی که غلظت بالایی از ماده حل شونده داشته و در محل مناسبی ذخیره و نگهداری می شود. از این محلول برای تهیه محلول کار استفاده می شود. روش تهیه: پس از محاسبه، جرم یا حجم مشخصی از ماده حل شونده را در حلال حل کرده و به حجم می رسانیم. در این محلول غلظت ماده حل شونده در حلال بالاست؛ مزیت این نوع تهیه محلول این است که چون غلظت ماده حل شونده در محلول بالاست (این محلولها غلیظ اند) احتمال رشد قارچها و باکتریها در آنها کمتر است. از طرفی برای رقیق کردن آنها می توان به راحتی از فرمول زیر استفاده نمود تا محلول کار تهیه شود.

محلول کار: محلولی است که مستقیماً و بدون نیاز به رقیق سازی مورد استفاده قرار می گیرد (برای تزریق، ضد عفونی، تهیه استانداردها، گندزدایی و....). این محلول را می توان هر بار از مواد خالص تهیه نمود و یا از محلول ذخیره با استفاده از فرمول زیر تهیه کرد:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

به هر حال، اساس تهیه محلولهای ذخیره یا محلولهای کار یکسان است و فقط غلظت آنها با یکدیگر متفاوت می باشد.

تهیه محلول مایع در مایع: مقدار مایع را بر اساس حجم (V) بیان می کنند لذا محلول مایع در مایع را بصورت V/V نشان می دهند. این نوع محلولها را عمدتاً بصورت درصد بیان می کنند. مثلاً: محلول ۷۰ درصد (درجه) الکل؛ یعنی از هر ۱۰۰ حجم محلول الکل ۷۰ حجم الکل خالص و ۳۰ حجم حلال (آب) است. مثال: ۱۰ میلی لیتر محلول ۷۰ درصد الکل تهیه کنید؛

حجم نهایی محلول	الکل
۱۰۰	۷۰
۱۰	X=۷

در یک مزور ۱۰ میلی لیتری مقدار ۷ میلی لیتر الکل ریخته و حجم آنرا با حلال (که برای این ماده آب خالص است) به ۱۰ میلی لیتر می رسانیم.

مثال: ۱۰۰۰ میلی لیتر محلول ۵٪ اتیلن گلیکول تهیه کنید؛ ۵٪ یعنی از هر ۱۰۰ تا ۵ تا آن پس از هر ۱۰۰۰ تا چندتا می شود؟

حجم نهایی محلول	اتیلن گلیکول
۱۰۰	۵
۱۰۰۰	X=۵۰

پس در یک مزور ۱۰۰۰ میلی لیتری ۵۰ میلی لیتر اتیلن گلیکول ریخته و حجم آنرا با حلال (که برای این ماده آب خالص است) به ۱۰۰۰ می رسانیم (یعنی ۹۵۰ میلی لیتر آب اضافه می کنیم).

محلول جامد در مایع بر حسب گرم در لیتر (g/l): یعنی چند گرم ماده در ۱ لیتر از محلول موجود است. مثلاً محلول ۱۰۰۰ گرم در لیتر گلوکز یعنی ۱۰۰۰ گرم گلوکز را در ۱ لیتر (۱۰۰۰ میلی لیتر حلال حل کرده اند). در اینجا چون وزن (Weight = w) خشک مولکول مهم است نه جرم (Mass = m) آن لذا استفاده از جرم مولکولی ماده کاربرد ندارد و نیاز به هیچ محاسبه ای برای تعیین مول نیست.

مولاریته (محلول مولار) (محلول جامد در مایع بر حسب مولار (Molar Solution): محلولی که در هر ۱ لیتر آن ۱ مول ماده مورد نظر وجود داشته باشد. مثلاً محلول ۱ مولار NaCl یعنی ۵۸.۴۴ گرم NaCl (جرم ۱ مول NaCl) در ۱ لیتر (۱۰۰۰ میلی لیتر) محلول.

مثال: روش تهیه محلول NaCl با چند مولاریته مختلف در جدول زیر آمده است (جاهای خالی جدول را محاسبه کنید):

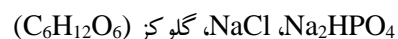
مقدار مورد نیاز برای ۱۰ میلی لیتر	مقدار مورد نیاز برای ۲۵ میلی لیتر	مقدار مورد نیاز برای ۵۰ میلی لیتر	مقدار مورد نیاز برای ۱ لیتر (۱۰۰۰ میلی لیتر)	محاسبه	مولاریته مورد نیاز
		2.922g	58.44 g	$1.0 \times 58.44 \text{ g} =$	1.0 M NaCl
			5.844g	$0.1 \times 58.44 \text{ g} =$	0.1M NaCl
			29.22g	$0.5 \times 58.44 \text{ g} =$	0.5M NaCl
			116.88g	$2.0 \times 58.44 \text{ g} =$	2M NaCl
					1.5M NaCl

اهمیت: در علوم پزشکی، مراکز بالینی و تشخیصی، مراکز تحقیقاتی، محلولها را بر اساس مولاریته تهیه می کنند. مول مهمترین واحد و محلولهای تهیه شده بر اساس مولاریته مهمترین و پرکاربردترین واحد و نوع محلول می باشند.

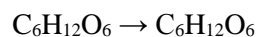
فعالیت: تهیه نرمال سالین (Normal Saline)؛ نامهای دیگر آن سرم نمکی و سرم فیزیولوژی است و درواقع محلول 0.15 نرمال NaCl در حلال آب است. این محلول پرکاربردترین محلول در پزشکی است زیرا هم برای شستشو و تهیه برخی محلولها بکار می رود و هم از نوع استریل آن برای تهیه رفتهای دارویی و یا تزریق مستقیم به بیمار استفاده می شود. این محلول را تهیه کنید.

اهمیت مولکولهای خالص و مرکب در تهیه محلولها: مولکولهایی که فقط از یک نوع اتم تشکیل شده اند با مولکولهایی که از بیش از یک اتم تشکیل شده اند از نظر خواص فیزیکی و شیمیایی و بویژه خواص فیزیولوژیک متفاوت اند؛ مثلاً از نظر ایجاد فشار اسمزی.

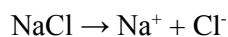
کدام یک از مولکولهای زیر فشار اسمزی بیشتری ایجاد می کند:



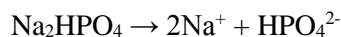
هرقدر تعداد ذراتی که یک مولکول می تواند وارد محلول نماید بیشتر باشد فشار اسمزی بیشتری نیز ایجاد می کند. فشار اسمزی ربطی به وزن مولکولی و نوع اتمها ندارد بلکه بستگی به تعداد ذرات تشکیل دهنده مولکول وابسته است. هرقدر تعداد ذرات تشکیل دهنده مولکول بیشتر باشند فشار اسمزی بیشتری ایجاد می کند. مواد بالا به صورت زیر در آب حل می شوند:



فقط یک ذره ایجاد می کند



تعداد ۲ ذره ایجاد می کند



تعداد ۳ ذره ایجاد می کند (۲ تا سدیم و ۱ ذره هیدروژن فسفات)

نرمالیت (Normality): تعداد مولهای مؤثره ماده (به عبارت بهتر تعداد اکی والانهای ماده) در ۱ لیتر محلول؛ مثلاً در محلولهای اسیدی یا قلیایی تعداد یونهای هیدروژن و یون هیدروکسید مهم تند زیرا در این محلولها H^+ و OH^- مواد مؤثره می باشند. مثلاً سولفوریک اسید (H_2SO_4) در محلول می تواند دو یون هیدروژن آزاد کند (دوتا ظرفیت اسیدی دارد) یعنی ۱ مول اسید سولفوریک می تواند ۲ مول هیدروژن قابل یونیزه شدن آزاد کند؛ پس ۲ نرمال است. قسمتهای خالی جدول زیر را پر کنید:

نرمالیت	مول	ماده
2	1	H_2SO_4
1.2	0.6	H_2SO_4
	2	H_2SO_4
1	1	NaOH
0.5		NaOH
2	1	KH_2PO_4
	0.3	KH_2PO_4
1.2		H_3PO_4

دسته بندی اسیدها و بازها بر اساس تعداد پروتونها:

اگر اسید یک ظرفیت اسیدی (تک پروتون) داشته باشد به آن monoprotic می گویند مثل HCl . اگر دو ظرفیت پروتونی داشته باشد به آن diprotic می گویند مثل H_2SO_4 . اگر اسید سه پروتون اسیدی داشته باشد به آن triprotic می گویند؛ در کل اگر اسید بیش از دو پروتون داشته باشد به آن polyprotic می گویند.

توجه: پروتونها باید از نوع اسیدی (قابل یونیزه شدن) باشند و گرنه جزء ظرفیت اسیدی محسوب نمی شوند. مثلاً: استیک اسید CH_3COOH تک پروتونه و مونوپروتیک است زیرا موقع یونیزه شدن بصورت $\text{H}^+ + \text{CH}_3\text{COO}^-$ در می آید.

اگر ماده قلیایی یک ظرفیت هیدروکسیدی قابل یونیزه شدن داشته باشد به آن monobasic مثل هیدروکسید سدیم NaOH ، اگر دو ظرفیت هیدروکسیدی قابل یونیزه شدن داشته باشد به آن dibasic مثل هیدروکسید کلسیم Ca(OH)_2 و اگر سه ظرفیت هیدروکسیدی قابل یونیزه شدن داشته باشد به آن tribasic گفته می شود مثل هیدروکسید آلومینیوم Al(OH)_3 .

ظرفیت: به زبان ساده یعنی تعداد اجزاء قابل تجزیه از یک مول ماده. رابطه ظرفیت، مولاریته و نرمالیت بصورت زیر است:

$$N = n \times M$$

مثلاً نرمالیت اسید سولفوریک ۲ مولار اینطور حساب می شود: چون ۲ ظرفیت اسیدی قابل یونیزه دارد بنابر این می شود $N = 2 \times 2 = 4$

اهمیت: در علوم پزشکی و بویژه تحقیقات پزشکی گاهی اوقات محلولها را بر مبنای نرمالیت محلول تهیه می کنند.

اکی والان و نحوه محاسبه اکی والان (Eq): اکی والان نسبت جرم مولکولی ماده بر ظرفیت آن می باشد. در فرمول زیر m جرم مولکولی و

$$Eq = \frac{m}{n} \quad \text{n ظرفیت است}$$

توجه: اگر عنصر یا ماده مورد نظر تک ظرفیتی باشد، طبق فرمول فوق جرم مولکولی با اکی والان برابر است.

اهمیت: در آزمایشگاههای بالینی و مراکز بهداشتی-درمانی (و بطور کلی در علوم پزشکی) غلظت یونهای سدیم و پتاسیم در مایعات بدن را عمدتاً بر اساس mEq/l (میلی اکی والان در لیتر) گزارش می کنند. مثلاً مقدار طبیعی Na^+ در خون حدود 136-145 mEq/l و مقدار طبیعی K^+ در خون 3.5-5.1 mEq/l می باشد.

مثلاً جرم مولکولی NaOH ۴۰ است و Eq آن نیز ۴۰ است زیرا فقط ۱ ظرفیت دارد. اما H_2SO_4 جرم مولکولی ۹۸ ولی اکی والان آن ۴۹ می باشد.

برای $KMnO_4$ با جرم مولکولی ۱۵۸ مقدار اکی والان آن می شود ۳۱.۶ زیرا ۵ ظرفیت دارد ($\frac{158}{5} = 31.6$).

واحدهای معمول برای مولاریته و نرمالیت: برای مولاریته g/l، برای نرمالیت Eq/l

$$D = \frac{M}{V} \quad \text{چگالی (Density) (جرم حجمی): جرم (M) یک ماده در واحد حجم (V) آن}$$

اهمیت چگالی برای تهیه محلولها: چگالی جرم یک مول ماده را در ۱ لیتر آب مشخص می کند. با استفاده از چگالی می توان موادی را که جرم بیشتری یا کمتری نسبت به آب دارند را مشخص نمود و برای تهیه محلول ها استفاده کرد.

درصد یا درجه خلوص (Purity degree): برخی مواد آزمایشگاهی خالص نیستند، بنابراین در حجم معینی از ماده مرکب جرم معینی از ماده خالص وجود دارد. برای تهیه محلول این نوع مواد از شاخص درجه خلوص هم استفاده می شود.

توجه: روی ظروف حاوی مواد آزمایشگاهی یا برخی محلولها (مثلاً اسیدهای مایع) مشخصات کامل ماده نوشته شده است. مثلاً جرم مولکولی را با علامت MW یا FW می نویسند؛ چگالی ماده را با علامت d نشان می دهند. درجه خلوص را نیز با علامت درصد (%) یا Purity معمولاً نشان می دهند.

به تمرین زیر دقت کنید:

مولاریته اسید کلریدریک غلیظ 31% را مشخص کنید ($d=1.16 \text{ g/ml}$)؟

حل: با توجه به درصد اسید، اگر ۱۰۰ گرم HCl غلیظ داشته باشیم، ۳۱ گرم آن HCl و مابقی (۶۹ گرم) آب است.

از طرفی جرم مولکولی HCl برابر 36.46 g/mol می باشد. پس ۳۱ گرم اسید چند مول می شود:

مول HCl	گرم
1	36.46
X = 0.85	31

در مرحله بعد می گوئیم ۱۰۰ گرم محلول که چگالی آن 1.16 g/ml باشد چه حجمی دارد؟

$$D = \frac{M}{V}$$

$$V = \frac{M}{D} = \frac{100g}{1.16 \frac{g}{mL}} = 86.2mL = 0.0862L$$

پاسخ می شود 86.2 میلی لیتر که معادل 0.0862 لیتر است. توجه کنید که واحد حجم در فرمول چگالی لیتر است لذا باید آنرا تبدیل به لیتر کنید (مثل مثال بالا).

در نهایت طبق فرمول مولاریته تعداد مولهای ماده خالص را در واحد حجم به دست می آوریم:

$$M = \frac{0.85mol}{0.0826L} = 12mol/L$$

لذا محلول اسید مورد نظر ۱۲ مولار است.

سؤال: نرمالیت اسید فوق الذکر را بدست آورید؟

تبدیل واحدها به یکدیگر: این موضوع اهمیت بسیار زیادی دارد زیرا در مراکز تشخیصی درمانی اشتباه در گزارش واحد اندازه گیری گاهاً منجر به تجویز غلط یا عدم تجویز داروی ضروری برای بیمار می شود. این امر در موارد اورژانس می تواند جان بیمار را به خطر بیندازد. مثلاً در کشور ما (ایران) و برخی کشورهای جهان میزان قند خون را بر حسب میلی گرم در دسی لیتر (mg/dl) گزارش می کنند و مقدار طبیعی آن بین 74-115 mg/dl است، در حالیکه در برخی کشورهای دیگر قند خون بر حسب میلی مول در لیتر (mmol/l) گزارش می شود که مقدار طبیعی قند خون با این واحد حدود 4.1-6.4 mmol/l می شود. لذا برای تبدیل واحدها شما نیازمند آشنایی با مفاهیم محلول سازی هستید. با این وجود نحوه تبدیل واحدها به یکدیگر در کتابهای مرجع آمده است.

گاهی برای تبدیل واحدها به یکدیگر نیاز به دانستن اطلاعات اضافی غیر از ضرایب نیز هست؛ مثلاً برای تبدیل واحدهای گرم به مول باید جرم مولکولی یا فرمول مولکولی آنرا بدانیم، تا بتوانیم مقدار (غلظت) آنرا در یک محلول با واحدی مشخص گزارش کنیم.

تبدیل ضرایب به یکدیگر: تبدیل ضرایب به یکدیگر نیز از اهمیت شایانی برخوردار است؛ شما باید بدانید که میلی گرم در لیتر (mg/l) ۱۰۰۰ برابر با میلی گرم در میلی لیتر (mg/ml) تفاوت دارد؛ و یا گرم در لیتر (g/l) نیز ۱۰۰۰ برابر با میلی گرم در لیتر (mg/l) تفاوت دارد. برای تبدیل ضرایب به یکدیگر می توانید از جداول زیر استفاده کنید.

نکات ایمنی: برای رقیق کردن اسیدها همیشه اسید را به آرامی و کم کم به آب اضافه می کنیم. موقع اضافه کردن اسید به آب اینکار را زیر هود انجام دهید. موقع برداشتن اسیدها و مواد دارای بخارات سمی حتماً زیر هود کار کنید و سر، صورت و مسیر تنفسی خود را از رسیدن بخارات چنین موادی دور نگه دارید. به علائم هشدار و ایمنی که روی ظروف محلولهاست توجه نمائید.

ارتباط واحدهای حجم با یکدیگر		
1 kiloliter	1000 L	1,000,000 mL
1 liter (L)	100 mL	1,000,000 μL
1 deciliter (dL)	100 mL	100,000 μL
1 milliliter (mL)	1000 μL	1000,000 nL
1 microliter (μL)	1000 nL	1,000,000 pL

ارتباط واحدهای جرم با یکدیگر		
1 kilogram (kg)	1000 g	1,000,000 mg
1 gram (g)	100 mg	1,000,000 μg
1 decigram (dg)	100 mg	100,000 μg
1 milligram (mg)	1000 μg	1000,000 ng
1 microgram (μg)	1000 ng	1,000,000 pg

رقت سازی متوالی (Serial Dilution):

رقت سازی متوالی یکی از روشهای بسیار مناسب با ضریب خطای کم برای رسم منحنی های استاندارد و بدست آوردن غلظت یا تیتراژ یک ماده خاص می باشد. تیتراژ کردن (Titration) آزمایشی است که در آن هر مولکول از ماده مورد نظر با یک (یا تعداد کاملاً مشخصی) از ماده واکنشگر واکنش می دهد. مثلاً یک مولکول HCl با یک مولکول NaOH واکنش می دهد؛ یا یک مولکول H_2SO_4 با دو مولکول NaOH واکنش می دهد.

مثال رقت سازی متوالی:

تعداد ۶ لوله آزمایش را به ترتیب شماره گذاری نمائید و به همه لوله ها به جز لوله شماره ۱ مقدار ۱ میلی لیتر آب مقطر (یا حلال اضافه کنید)؛ توجه کنید که تمام مراحل زیر را با استفاده از پی پت مدرج و با دقت بسیار زیاد انجام دهید:

در لوله لوله اول ۲ میلی لیتر محلول ۵۰۰ میلی گرم در دسی لیتر گلوکز بریزید؛ غلظت قند در این لوله چقدر است؟

مقدار ۱ میلی لیتر از محلول لوله اول را در لوله دوم بریزید و بخوبی مخلوط کنید؛ غلظت قند در این لوله چقدر است؟

مقدار ۱ میلی لیتر از محلول لوله شماره ۲ را به لوله شماره ۳ اضافه کنید و بخوبی هم بزنید؛ غلظت قند در این لوله چقدر است؟

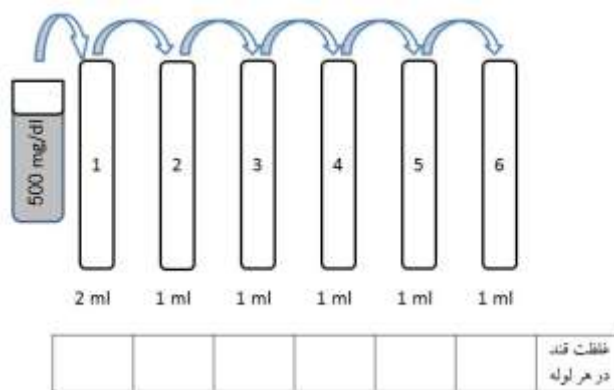
مقدار ۱ میلی لیتر از محلول لوله شماره ۳ را به لوله شماره ۴ اضافه کنید و بخوبی هم بزنید؛ غلظت قند در این لوله چقدر است؟

مقدار ۱ میلی لیتر از محلول لوله شماره ۴ را به لوله شماره ۵ اضافه کنید و بخوبی هم بزنید؛ غلظت قند در این لوله چقدر است؟

مقدار ۱ میلی لیتر از محلول لوله شماره ۵ را به لوله شماره ۶ اضافه کنید و بخوبی هم بزنید؛ غلظت قند در این لوله چقدر است؟

مقدار ۱ میلی لیتر از محلول لوله شماره ۶ را دور بریزید؛ غلظت قند در این لوله چقدر است؟

با توجه به اینکه در هر مرحله از مراحل فوق محلول قندی با ضریب ثابتی و بطور متوالی رقیق تر می شود این روش را رقیق سازی متوالی (Serial Dilution) می گویند.



در شکل روبرو غلظت قند را برای هر لوله مشخص نمائید؟

پس از مشخص شدن غلظت گلوکز در هر لوله می توان با روشهای سنجش گلوکز مقدار جذب نوری (Absorbance) را سنجید و منحنی استاندارد رسم نمود.

از این روش رقیق سازی در بیوشیمی و سرولوژی به مقدار فراوان استفاده می کنند. شما می توانید بیش از ۶ لوله یا کمتر از ۶ لوله را در نظر بگیرید و برای هر یک غلظت ماده حل شونده را بدست آورید. توجه کنید که غلظت محلول اولیه چقدر بوده است.

فعالیت: رقتهای متوالی از یک محلول با غلظت اولیه ۲۰۰ میلی گرم در دسی لیتر از یک ماده حل شونده را برای ۴ لوله بنویسید؟

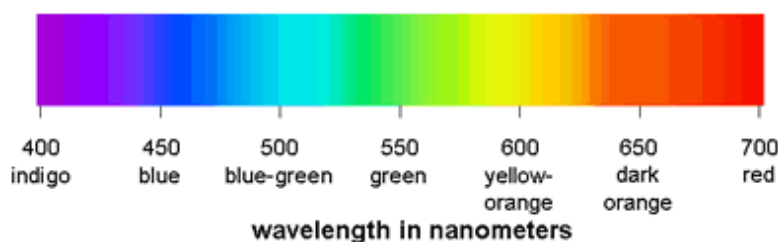
نکات ایمنی: برای رقیق کردن اسیدها همیشه اسید را به آرامی و کم کم به آب اضافه می کنیم. موقع اضافه کردن اسید به آب اینکار را زیر هود انجام دهید. موقع برداشتن اسیدها و مواد دارای بخارات سمی حتماً زیر هود کار کنید و سر، صورت و مسیر تنفسی خود را از رسیدن بخارات چنین موادی دور نگه دارید. به علائم هشدار و ایمنی که روی ظروف محلولهاست توجه نمائید.

اصول اسپکتروفتومتری (سنجش طیف نوری) و رسم منحنی استاندارد

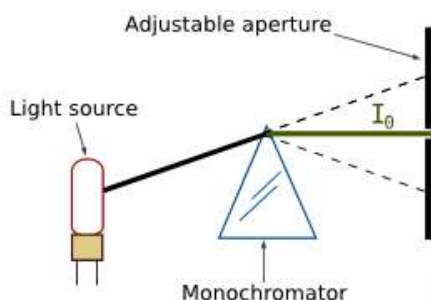
یکی از روشهای مورد استفاده در سنجش مقادیر مواد روش سنجش طیف نوری است. این روش در آزمایشگاهها کاربرد بسیاری داشته و از گذشته تا به امروز اهمیت خود را حفظ نموده است. بسیاری از دستگاههای پیشرفته امروزی نیز از این روش استفاده می کنند و فقط تکنولوژی های برتری به آن افزوده شده است.

اساس سنجش طیف نوری:

نور سفید مجموعه ای از سایر نورهاست لذا وقتی این نور را تجزیه کنیم طیفی از انواع نورها با رنگهای مختلف مشاهده خواهند شد. برای تجزیه نور به رنگهای مختلف می توان از منشور استفاده نمود. اگر نور سفید را از یک شیشه رنگی عبور دهیم همه نورها با رنگهای مختلف جذب شده و تنها نوری عبور می کند که هم رنگ شیشه است. شیشه رنگی که فقط یک نور از خود عبور می دهد را اصطلاحاً فیلتر می گویند. شکل زیر طیف نور را نشان می دهد. اگر نور سفید از یک منشور عبور داده شود این نورهای رنگی را بدون نیاز به وسیله خاصی می توان مشاهده نمود. هر نوری دارای طول موج خاصی است. نورهایی را که بدون نیاز به وسیله خاصی می توان مشاهده نمود در محدوده مرئی طول موج ها هستند. همانطور که در شکل زیر مشاهده می شود طول موج نورهای مرئی حدوداً بین ۴۰۰ الی ۷۰۰ نانومتر می باشند. پائین تر از ۴۰۰ نانومتر را فرابنفش می گویند و بالاتر از ۷۰۰ نانومتر را زیرقرمز می نامند. هر ماده رنگی می تواند در طول موج مربوط به رنگ خود مقداری از نور را جذب کند و مابقی را بتاباند. از این خاصیت برای سنجش غلظت مواد رنگی استفاده می شود.



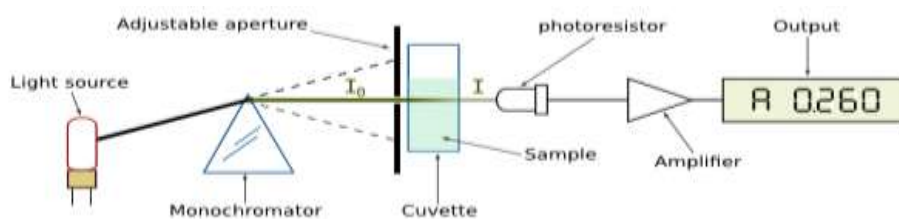
سیستم های تک رنگ ساز (Monochromator)



سیستمهایی هستند که نور سفید از یک طرف به آنها برخورد کرده و از طرف دیگر طیف نوری می دهند که این طیف نوری از یک شکاف باریک عبور نموده و فقط نوری با یک رنگ خاص از شکاف رد می شود. شکل روبرو یک سیستم تک رنگ ساز را نشان می دهد. در این شکل I_0 شدت نور اولیه را نشان می دهد (از کلمه Intensity و به معنی شدت است و علامت 0 برای نشان دادن اولیه می باشد. ادامه مطلب را مطالعه بفرمائید).

اگر یک محلول رنگی را در لوله شیشه ای مناسب بریزیم و بعد نور تکی رنگی که هم رنگ با محلول باشد از آن عبور دهیم، متناسب با غلظت ماده رنگی موجود در محلول، مقداری از نور رنگی جذب (Absorbing) می شود و مابقی عبور (Transmission) می کند. مقدار نور جذب شده را میزان جذب (Absorbance) و مقدار نور عبور کرده را میزان عبور (Transmittance) می گویند. واضح است که هر قدر میزان جذب بیشتر باشد میزان عبور کمتر است. از آنجا که هر قدر غلظت ماده رنگی موجود در محلول بیشتر باشد میزان جذب نیز بیشتر خواهد بود و با توجه به اینکه غلظت بیشتر به معنی وجود مقدار بیشتر و چگالت بیشتر بودن ماده رنگی در محلول است لذا به میزان جذب نوری، چگالتی نوری (Optical Density) نیز می گویند. مقدار نور جذب شده برابر است با لگاریتم شدت نور پیش از ورود نور به لوله حاوی ماده رنگی منهای لگاریتم شدت نور خروجی از لوله حاوی ماده رنگی (میزان جذب نور توسط ماده رنگی = لگاریتم شدت نور پیش از ورود به لوله - لگاریتم شدت نور خروجی از لوله).

شدت نور خروجی را می توان با وسایلی مانند فتوسل و فتودیود (دو نوع از مقاومت های نوری) سنجید؛ این وسایل در اثر برخورد نور، الکترون آزاد می کنند که این الکترون ها توسط دستگاه های تقویت کننده (Amplifier) تقویت شده و بوسیله گالوانومتر نیز می توان شدت جریان الکترونی (الکتریکی) را سنجید. هر قدر نور کمتری از لوله رنگی عبور کرده باشد، جریان الکترونی کمتری برقرار خواهد شد و دستگاه گالوانومتر عدد کوچکی را نشان می دهد. این موضوع نشان دهنده این است که محلول رنگی نور بیشتری را جذب کرده است و به عبارت بهتر غلظت بیشتری داشته که نور بیشتری را جذب و مقدار کمتری را عبور داده است. دستگاه های فتومتر یا اسپکتروفتومتر را به این صورت طراحی کرده اند و برای سنجش غلظت مواد از آنها استفاده می کنند. لیکن روابط فیزیکی در طراحی دستگاه استفاده شده اند. شکل زیر شمای کلی یک دستگاه اسپکتروفتومتر را نشان می دهد.

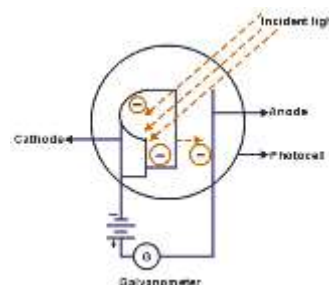


اجزاء یک دستگاه اسپکتروفتومتر

به ترتیب از چپ به راست: منبع نور، سیستم تک رنگ کننده (منشور و شکاف)، جای نمونه (کووت)، مقاومت نوری، تقویت کننده، گالوانومتر (در این شکل سیستمی نشان داده شده که شدت جریان را تبدیل به میزان جذب یا A نموده است).

مکانیسم کارکرد یک فتوسل (Photocell):

هنگامیکه نور به قطب کاتد برخورد می کند، الکترون ها از جدار آن جدا شده و به سمت آند جریان می یابند (یعنی جریان الکتریکی ایجاد می شود). هر قدر نور شدیدتر باشد شدت این جریان بیشتر خواهد بود. شدت جریان توسط گالوانومتر سنجیده می شود.





دو نمونه اسپکتروفتومتر (شکل‌های بالا) و دو نمونه از دستگاه‌های آنالیز آنالیت‌های بیوشیمیایی خون (شکل‌های پائین) که سیستم‌های روباتیک دارند. امروزه از سیستم‌های روباتیک استفاده می‌شود که مبنای کار سنجش آنها همان مبانی ساده‌ای هستند که در اسپکتروفتومترها هست، فقط تکنولوژی آنها پیشرفته‌تر است.

قانون Beer and Lambert در مورد جذب نور:

بیر و لامبرت دو دانشمند بودند که در خصوص جذب نور توسط یک محلول قانون (فرمول) زیر را پیشنهاد دادند. در این فرمول A به معنی جذب نور (Absorbance)، ϵ ضریب خاموشی (extinction coefficient) است (که نشاندهنده ماهیت ماده است و برای هر ماده مقداری مشخص و متفاوت با سایر مواد است)، C غلظت ماده موجود در لوله آزمایش (concentration) و l طول مسیری که نوری طی می کند (length) می باشد.

$$A = \epsilon cl$$

مفهوم این فرمول بیانگر این است که میزان جذب نوری یک ماده بستگی دارد به جنس ماده، غلظت آن و طول مسیری که نور طی می کند. از طرفی همانطور که ذکر شد، میزان جذب نور با شدت نور اولیه - شدت نور خروجی تناسب دارد (یعنی $I_0 - I$ = میزان جذب نور توسط ماده رنگی)؛ لیکن این تناسب بصورت لگاریتمی است، لذا، می توان گفت:

$$A = \log I_0 - \log I \quad \text{و همچنین} \quad A = \epsilon cl$$

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon cl$$

$$\log \frac{I_0}{I} = A (OD) = \epsilon cl$$

میزان جذب نوری (یا چگالی نوری) برابر است با

$$\log \frac{I_0}{I} = A (OD) = \epsilon c$$

اگر طول مسیر نوری (کووت) ۱ سانتی متر در نظر گرفته شود معادله بالا می شود

مقدار ϵ را می توان با آزمایش اندازه گیری نمود (اگر غلظت ماده موجود در لوله آزمایش یک مول باشد آنوقت $\epsilon = OD$ خواهد بود). پس از تعیین مقدار ϵ می توان با تقسیم جذب نوری بر ϵ غلظت ماده مورد نظر را بدست آورد.

روش دیگر برای محاسبه چگالی نوری (OD) یا همان جذب نوری (A):

همانطور که گفته شد وقتی نور از لوله عبور می کند مقداری از آن جذب و مقداری عبور می کند. میزان جذب با غلظت ماده نسبت دارد. اما با مقدار نور عبور کرده نیز نسبت دارد زیرا هر قدر نور جذب شده بیشتر باشد، نور عبوری کمتر خواهد بود. از اینرو با استفاده از مقدار نور عبور کرده نیز می توان میزان چگالی نوری را سنجید:

مقدار نور عبور کرده (Transmittance) که با T نشان می دهند با شدت نور تابیده شده و عبوری دارای این رابطه است:

$$\frac{I}{I_0} = T$$

اگر لگاریتم را بخواهیم محاسبه کنیم و شدت نور اولیه (نور تابیده شده) را نسبت به نور خروجی بسنجیم رابطه به این شکل می شود:

$$\log \frac{I_0}{I} = \log \frac{1}{T}$$

همانطور که می دانیم $\log \frac{I_0}{I}$ برابر است با OD، لذا خواهیم داشت:

$$OD = \log \frac{1}{T}$$

اگر شدت نور اولیه (نور تابیده شده) را ۱۰۰ درصد در نظر بگیریم، با توجه به اینکه حین عبور از لوله آزمایش مقداری از آن جذب می شود و مقداری عبور می کند، می توان روابط بالا را اینطور نوشت:

$$\frac{I}{I_0} = \frac{\%T}{100} \rightarrow \log \frac{I}{I_0} = \log \frac{\%T}{100} \rightarrow \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{100}{\%T} \rightarrow OD = \log \frac{100}{\%T}$$

$$OD = \log 100 - \log \%T \rightarrow A(OD) = 2 - \log \%T$$

به این ترتیب می توان با سنجش شدت نور خروجی، میزان چگالی نور عبوری را سنجید.

کاربرد فرمول جذب یا عبور برای سنجش غلظت یک ماده در محلول

برای سنجش غلظت یک ماده در محلول، یکی از روشهای مورد استفاده روش اسپکتروفتومتری است.

هر ماده رنگی در طول موج ویژه ای نور را هم رنگ خود را جذب می کند. هر قدر غلظت ماده رنگی موجود در محلول بیشتر باشد، نور بیشتری جذب می شود. اگر غلظت ماده حل شده در یک محلول رنگی را بدانیم می توانیم محلولهای مشابه آنرا که غلظت ماده رنگی در آنها مشخص نیست را

تعیین کنیم. درواقع، از اسپکتروفتومتر برای مقایسه میزان جذب نوری دو محلول که یکی غلظت مشخص و دیگری غلظت نامشخص دارد استفاده می کنند.

روش به این شکل است که ابتدا طول موج مناسب برای سنجش رنگ محلول انتخاب می شود. مبنای انتخاب طول موج بهینه برای سنجش رنگ محلول این است که طول موجی انتخاب می شود که در آن طول موج ماده رنگی دارای بیشترین میزان جذب باشد، تا حین سنجش رنگ ماده ماکزیم نور هم رنگ تابیده شده جذب شود و سنجش دقیق باشد. فراموش نکنیم که مواد رنگی می توانند در بیش از یک طول موج دارای جذب نوری بالا باشند ولی معمولاً فقط یکی از آن طول موجهاست که بیشترین میزان جذب در آن رخ می دهد. لذا، همان طول موج انتخاب می شود.

فرض کنید می خواهیم مقدار یک ماده را بسنجیم. ابتدا از ماده مورد نظر محلولی تهیه می کنیم که غلظت مشخصی از آن ماده را دارد؛ به این محلول گفته می شود محلول استاندارد. سپس، جذب نوری هر دو محلول را که یکی غلظت مشخص (استاندارد) و دیگری غلظت نامشخص دارد (مجهول یا نمونه مورد آزمایش) را توسط دستگاه اسپکتروفتومتر می سنجیم. نتیجه براساس فرمول بیر-لامبرت بصورت زیر خواهد بود:

$$A_1 = \epsilon_1 c_1 l_1$$

$$A_2 = \epsilon_2 c_2 l_2$$

اگر مقادیر به دست آمده برای لیکن با نمونه استاندارد و نمونه مورد آزمایش را بخواهیم با یکدیگر مقایسه کنیم، خواهیم دید که ϵ_1 با ϵ_2 برابر است، و اگر از یک کووت برای هر سنجش هم استاندارد و هم نمونه مجهول استفاده کرده باشیم، طول مسیر نوری در هر دو یکی خواهد بود (یعنی l_1 و l_2). لذا مقایسه ما به این شکل خواهد شد:

$$A_1 = c_1$$

$$A_2 = c_2$$

سپس می توانیم بگوئیم:

$$A_1 \rightarrow c_1$$

$$A_2 \rightarrow c_2$$

اگر c_1 غلظت محلول استاندارد باشد، که غلظت آنرا می دانیم، و c_2 غلظت محلول مجهول باشد، که غلظت آنرا نمی دانیم، لذا، با یک تناسب می توانیم غلظت نمونه مجهول را بدست آوریم، زیرا مقادیر جذب نوری را می توانیم بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر بسنجیم. برای مثال، این مقادیر را جایگزین می کنیم: $c_1=100 \text{ mg/dl}$, $A_2=0.3$, $A_1=0.5$:

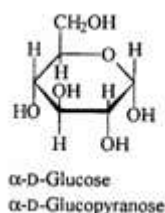
$$c_2 = \frac{c_1 \times A_2}{A_1}$$

$$c_2 = \frac{100 \times 0.3}{0.5} = 60$$

لذا، غلظت ماده مورد نظر در نمونه مجهول 60 mg/dl خواهد بود.

روش بالا یکی از راههای محاسبه غلظت یک ماده مشخص با غلظت مجهول است، ولی تنها روش موجود نمی باشد و روشهای دیگری نیز وجود دارند. برای مثال، روش دیگری که بیشتر در سنجشهای دقیق استفاده می شود و از دقت بسیار بیشتری نسبت به روش فوق الذکر برخوردار است، روش استفاده از منحنی استاندارد بوده که در زیر به آن اشاره خواهد شد. ابتدا روش رقت سازی متوالی را شرح می دهیم که یکی از بهترین روشها برای رسم منحنی استاندارد است.

آزمایش اندازه گیری قند خون با روش گلوکز اکسیداز



گلوکز، ماده ای است قندی که بدن از متابولیسم آن انرژی خود را تامین می کند. سوختن قند منجر به تولید انرژی بصورت ATP می گردد. چنانچه متابولیسم گلوکز در بدن فردی مشکل داشته باشد (به علل بیماریهای مختلف یا شرایط فیزیولوژیک) غلظت قند خون تغییر می یابد. از آنجا که مهمترین منبع تولید انرژی برای بدن مولکول گلوکز می باشد لذا، بدن به طرق مختلف تلاش می کند تا غلظت آنرا در محدوده طبیعی حفظ کند. هورمون گلوکاگن موجب القاء تولید قند گلوکز در بدن و هورمون انسولین موجب القاء مصرف گلوکز در بدن می شود. هورمون های دیگری

نیز وجود دارند که علاوه بر انسولین و گلوکاگن، می توانند موجب القاء تولید گلوکز یا مصرف آن توسط بدن گردند مانند هورمون رشد، آدرنالین و غیره.

در شرایط مختلف غلظت قند خون می تواند تغییر کند لیکن این غلظت معمولاً در افراد سالم در یک محدوده طبیعی حفظ می شود (حدود ۷۰ الی ۱۰۰ میلی گرم در دسی لیتر).

کاهش قند خون کمتر از حد نرمال را هیپوگلیسمی (Hypoglycemia) و افزایش آن بیش از حد نرمال را هیپرگلیسمی (Hyperglycemia) می گویند. حالت های هیپرگلیسمی یا هیپوگلیسمی اگر پایدار بمانند نشانه دهنده بیماری هستند؛ همچنین، این حالت ها به نوبه خود می توانند منجر به بیماری های شوند. هیپوگلیسمی ممکن است در اثر گرسنگی طولانی مدت، مصرف بیش از حد داروهای کاهش دهنده قند خون یا برخی بیماری های متابولیک (بیماری های که مسیر های متابولیسمی بدن را درگیر می کنند) ایجاد شود. هیپرگلیسمی نیز در اثر بیماری های مانند دیابت رخ می دهد. قاعده عملکرد طبیعی بدن این است که با افزایش غلظت قند خون، انسولین از پانکراس ترشح شده و غلظت قند خون را پائین می آورد تا به محدوده نرمال برسد؛ همچنین، چنانچه، قند خون کاهش پیدا کند هورمون های تحریک کننده تولید قند در بدن قند خون را در حد طبیعی نگه می دارند. معمولاً غلظت قند خون را بر حسب میلی مول در لیتر (mmol/L) یا میلی گرم در دسی لیتر (mg/dl) گزارش می کنند که در ایران بیشتر بر حسب mg/dl توسط آزمایشگاه های تشخیص طبی گزارش می شود. برای تبدیل این واحدها به یکدیگر می توان از رابطه زیر استفاده نمود (که بر مبنای جرم مولکولی گلوکز محاسبه شده است):

$$1\text{mmol/L} = 18\text{mg/dL}$$

انواع آزمایش قند خون

قند (گلوکز) خون ناشتا (Fasting Blood Sugar= FBS; Fasting Blood Glucose=FBG):

در این شرایط میزان قند خونی سنجیده می‌شود که فرد به مدت حداقل ۸ الی ۱۲ ساعت ماده غذایی مصرف نکرده باشد (مصرف آب ایرادی ندارد). مقدار طبیعی قند خون در افراد طبیعی و سالم معمولاً در این حالت بین ۷۰ الی ۱۰۰ میلی گرم در دسی لیتر است. اگر غلظت قندخون از 70 mg/dl کمتر باشد، فرد دچار هیپوگلیسمی خواهد بود و اگر بیش از 100 mg/dl باشد فرد دچار هیپرگلیسمی خواهد بود. در موارد هیپوگلیسمی فرد مواد حاوی قند مصرف می‌کند و کاهش قند خون او جبران خواهد شد، یا اگر بیمار بستری در بیمارستان بوده یا کاهش قند خون او بسیار شدید باشد که از سرم حاوی قند برای افزایش قند خون او استفاده می‌شود.

اگر غلظت قند خون فردی نیز بالا باشد، معمولاً ابتدا آزمونهای تأییدی انجام می‌شوند و در صورت تأیید ابتلاء فرد به دیابت، با تجویز دارو دیابت فرد تحت کنترل قرار می‌گیرد.

قند خون ۲ ساعته (۲ ساعت پس از مصرف گلوکز) (2hPP= 2 hours Post Prandial):

این آزمایش برای تأیید تشخیص بیماری دیابت بکار می‌رود. اساس این آزمایش بر این اصل استوار است که هنگام مصرف مقدار مشخصی قند، قند خوراکی جذب شده و وارد جریان خون می‌شود. با ورود گلوکز به جریان خون، ترشح انسولین تحریک می‌شود که این امر باعث برداشت گلوکز توسط سلولهای مختلف بدن از جمله عضلات، بافت چربی و کبد می‌شود. گلوکز جذب شده توسط سلول معمولاً بصورت گلیکوژن در سلول ذخیره می‌شود. لذا، در نهایت در افراد سالم بعد از مصرف گلوکز خالص، چنانچه، انسولین بخوبی ترشح شده باشد، غلظت قند خون بعد از گذشت ۲ ساعت، کمتر از 140 mg/dl خواهد بود. اما در افراد دیابتی یا کسانی که در ابتدای روند دیابتی شدن هستند، مقدار آن از 140 mg/dl بالاتر خواهد شد.

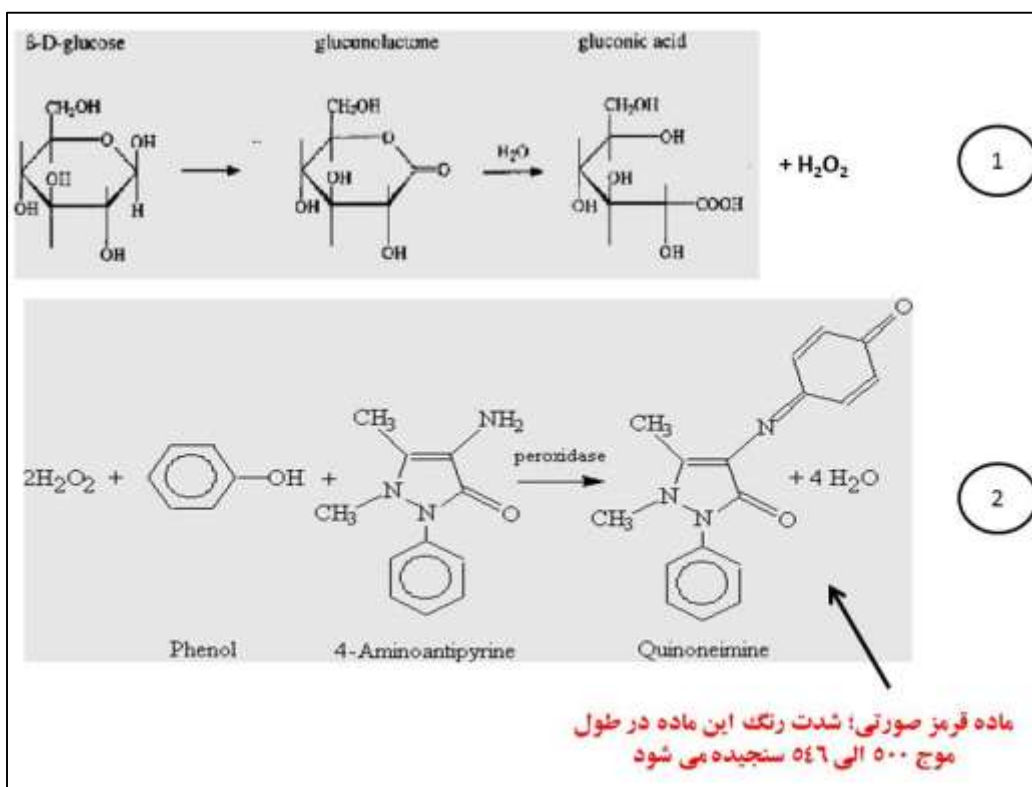
جدول زیر معیارهای تشخیص دیابت را بر مبنای تفسیر نتایج نشان می‌دهد.

Category of a person	Fasting Value		Post Prandial
	Minimum Value	Maximum Value	Value 2 hours after consuming glucose
Normal	70	100	Less than 140
Early Diabetes	101	126	140 to 200
Established Diabetes	More than 126	-	More than 200

روش سنجش قند خون:

برای اندازه گیری قند خون در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی از روشهای آنزیماتیک استفاده می‌شود. لیکن، در گذشته روشهای شیمیایی (اورتوتولوئیدین) نیز موجود بود که امروزه کاربردی در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی ندارند. دو روش آنزیمی که امروزه در آزمایشگاه‌های بالینی استفاده می‌شوند روشهای هگزوکیناز و گلوکز اکسیداز می‌باشند. در روش هگزوکیناز از واکنش فسفوریله کردن گلوکز توسط آنزیم هگزوکیناز استفاده می‌شود در حالیکه در روش گلوکز اکسیداز از واکنش اکسید شدن گلوکز توسط آنزیم گلوکز اکسیداز استفاده می‌شود. با عنایت به اینکه امروزه بیشتر از واکنش گلوکز اکسیداز استفاده می‌شود، اساس این روش را در زیر شرح می‌دهیم:

در این روش مولکول β -D-Glucose که فرم طبیعی گلوکز در بدن است، ابتدا تحت تاثیر آنزیم گلوکز اکسیداز، اکسیده شده و تبدیل به گلوکونولاکتون می‌شود. سپس، گلوکونولاکتون با آب واکنش داده و تبدیل به گلوکونیک اسید + هیدروژن پراکسید (H_2O_2) می‌گردد. H_2O_2 ماده‌ای فعال است که می‌تواند به ساختار فنول و ماده دیگری بنام 4-Aminoantipyrine حمله کرده و با تشکیل پیوند بین این دو ماده یک ماده جدید بنام Quinoneimine تشکیل دهد. گلوکز، فنول و 4-Aminoantipyrin و H_2O_2 همگی موادی تقریباً بی رنگ هستند لیکن، ماده Quinoneimine رنگ قرمز صورتی دارد. با توجه به اینکه محصول این واکنش یک ماده رنگی است، می‌توان گفت، هر قدر غلظت گلوکز در یک محلول (مثلاً سرم یا پلاسمای بیمار) بیشتر باشد، ماده رنگی بیشتری تولید خواهد شد. برای سنجش دقیق غلظت نیز از روش اسپکتروفتومتری می‌توان استفاده کرد که پیش از این توضیح داده‌ایم.



روش کار:

ابتدا سه لوله آزمایش انتخاب نموده و روی آنها به ترتیب B (بلانک یا شاهد)، S (استاندارد) و T (تست) می‌نویسیم. سپس مقادیر زیر را به هریک از لوله ها می‌افزاییم:

توجه: غلظت گلوکز در محلول استاندارد معادل ۱۰۰ میلی گرم در دسی لیتر است.

نام لوله	حجم ماده افزودنی	محلول حاوی آنزیم، 4-Aminoantipyrin و فنول
B (بلانک یا شاهد)	آب مقطر ۲۰ میکرولیتر	۱ میلی لیتر
S (استاندارد)	محلول استاندارد ۲۰ میکرولیتر	۱ میلی لیتر
T (تست)	سرم یا پلاسما بیمار ۲۰ میکرولیتر	۱ میلی لیتر

کلیه لوله‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه (با به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد) نگه می‌داریم. سپس، دستگاه اسپکتروفتومتر را برای طول موج ۵۰۰ نانومتر تنظیم نموده (طول موجی که ماده Quinoneimine در آن طول موج بیشترین توانایی جذب نور را دارد) و میزان جذب نوری دستگاه را با محلول بلانک روی صفر تنظیم می‌نمائیم. سپس، جذب نوری محلولهای استاندارد و تست را بصورت جداگانه توسط دستگاه قرائت و یادداشت می‌نمائیم. با استفاده از فرمول تناسب می‌توان غلظت قند گلوکز در نمونه تست را بدست آورد. این کار را انجام بدهید و جواب آزمایش خود را گزارش نمائید.

مشخص کنید فرد مورد آزمایش دچار هیپر، هیپو یا نرموگلیسمی است؟

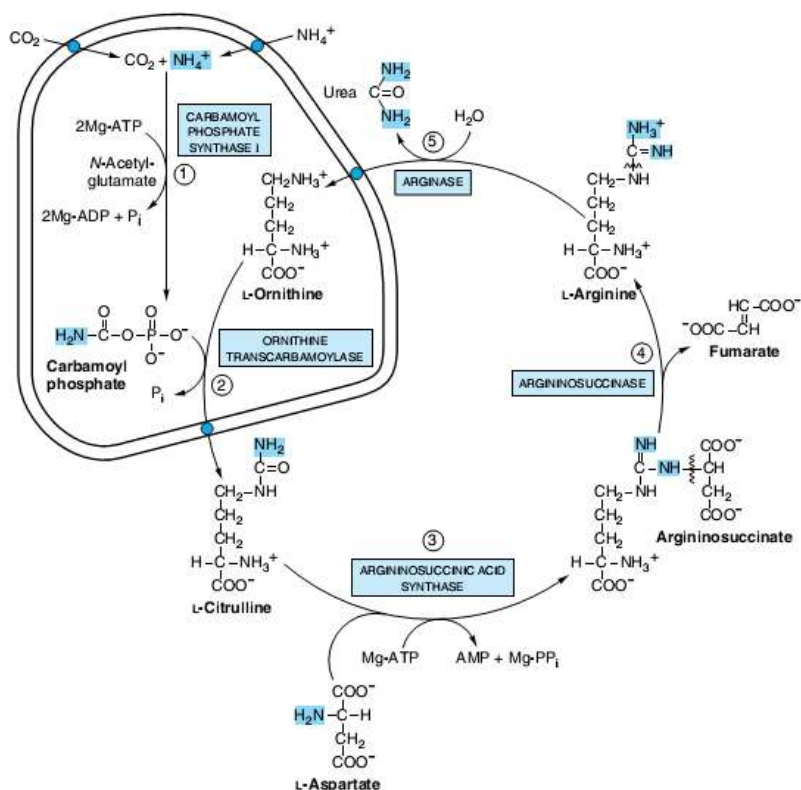
فعالیت فوق برنامه: چارت زیر نشاندهنده چه چیزی است؟ در مورد محتوای این چارت توضیح دهید.



آزمایش اندازه گیری اوره (UREA) خون و ادرار

کاتابولیسم پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک در بدن منتهی به تشکیل اوره و آمونیوم می شود؛ این دو ماده را ترکیبات نیتروژنی غیرپروتئینی می نامند زیرا عمده مواد نیتروژن دار موجود در بدن پروتئین ها هستند. پزشک بالینی برای بررسی وضعیت عملکرد کلیه ها آزمایش سنجش اوره را از آزمایشگاه تشخیص طبی برای بیمار درخواست می نماید. اوره با فرمول $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ و وزن مولکولی ۶۰ دالتون، عمده ترین ترکیب حاصل از کاتابولیسم در انسان است که بعنوان یک ماده دفعی محسوب شده و از طریق ادرار دفع می شود لیکن تا پیش از دفع از بدن به تنظیم فشار اسمزی مایع میان بافتی و خون کمک می نماید. چنانچه غلظت این ماده در جریان خون بیش از حد معمول بالا رود تنظیم فشار اسمزی بهم خورده و فشار اسمزی آب میان بافتی بافت های بدن فرد بیمار به دلیل تجمع اوره در آنها بالا رفته و آب از جریان خون به درون فضای میان بافتی می آید. این فرایند باعث حالت Edema (خیز یا ادم) می گردد. کاهش غلظت اوره کمتر از محدوده طبیعی معمولاً عوارض بیماریزا به همراه ندارد و از جنبه بالینی اهمیت ندارد اما افزایش غلظت آن بیشتر در موارد نارسایی کلیوی مشاهده می شود.

وره طی فرایند تجزیه پروتئین ها درون بدن تشکیل می شود؛ حاصل تجزیه پروتئینها، آمینواسیدها می باشند که بخش آمین آنها توسط واکنشهای ترانس آمیناسیون (انتقال عامل آمین) و دآمیناسیون (جداشدن عامل آمین) از آنها جدا شده، ابتدا به کبد انتقال یافته و در آنجا طی یک سری واکنش های بیوشیمیایی که به آن چرخه اوره گفته می شود، تبدیل به اوره میگردد؛ سپس، مجدداً وارد جریان خون گشته، و در نهایت، عمدتاً از طریق کلیه و ادرار دفع می شود (بیش از ۹۰٪ اوره به این طریق دفع می شود)، لیکن، مقدار ناچیزی هم از طریق مسیر گوارش و پوست دفع می گردد.



واکنش سنتز اوره در سلولهای کبدی:

همانطور که در شکل مقابل مشاهده می شود، یون آمونیوم (NH_4^+) و CO_2 درون میتوکندری با یکدیگر واکنش داده، توسط یک واکنش آنزیمی تبدیل به کرباموئیل فسفات می گردند. سپس کرباموئیل فسفات از درون میتوکندری به سیتوپلاسم برده می شود و طی یکسری واکنشهای آنزیمی دیگر در نهایت اوره درون سلولهای کبدی ساخته می شود.

از آنجا که مسیر دفع عمده اوره بدن کلیه ها هستند لذا

هرگونه اختلالی در عملکرد کلیه ها منجر به افزایش غلظت اوره در خون می شود؛ ازاینرو، از اوره بعنوان شاخصی برای ارزیابی عملکرد کلیه ها استفاده می نمایند. افزایش غلظت اوره در خون را حالت اورمی (Uremic state) یا حالت ازتمی (Azotemic state) می گویند. سالهست که

از اندازه گیری اوره خون و ادرار برای ارزیابی عملکرد کلیه استفاده می شود. همچنین، از سنجش کراتینین نیز برای ارزیابی عملکرد کلیه استفاده می شود.

اهمیت بالینی سنجش اوره یا BUN

مقدار BUN در موارد زیر افزایش می یابد:

- ۱- نارسایی کلیه (Renal insufficiency): که شامل موارد التهاب حاد و مزمن نفرون ها (acute and chronic nephritis)، نارسایی حاد کلیوی (نکروز لوله های کلیوی) (acute renal failure (tubular necrosis))، انسداد مسیر ادراری (Urinary tract obstruction) مثلاً در اثر سنگ کلیه^۱، تومورهای کلیوی که منجر به انسداد یا ناکارایی نفرون ها شوند و بزرگ شدن پروستات
- ۲- افزایش متابولیسم نیتروژن همراه با کاهش جریان خون کلیوی یا ناکارآمدی عملکرد کلیه: کاهش آب بدن به هر علتی که باشد، خونریزی مسیر گوارشی همراه با جذب خونی که در مسیر گوارشی آزاد شده باشد و همراه با کاهش جریان خون کلیوی
- ۳- کاهش جریان خون کلیوی: شوک، نارسایی غده فوق کلیوی (adrenal insufficiency)، نارسایی گذرای احتقانی قلب
- ۴- مصرف بسیاری از آنتی بیوتیک هایی که عملکرد کلیه ها را مختل می کنند: گوانتیدین، متیل دوبا، ایندومتاسین، ایزونیاژید، پروپرانولول، و دیورتیک های قوی (که باعث کاهش حجم خون و جریان خون کلیوی می شوند)

مواردی که اوره یا BUN کاهش می یابند:

- ۱- نارسایی کبدی
- ۲- نفروزی که هنوز منجر به نارسایی کلیوی نشده باشد
- ۳- لاغری مفرط (Cachexia): حالتی است که سلامت عمومی فرد اُفت کرده و دچار ضعف و نارسایی تغذیه ای می باشد

¹ - nephrolithiasis

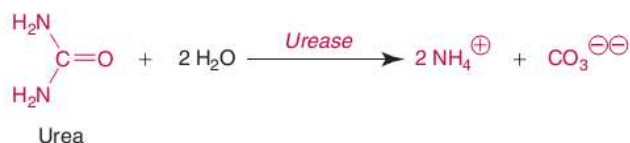
روش سنجش اوره در آزمایشگاه تشخیص طبی

توضیح:

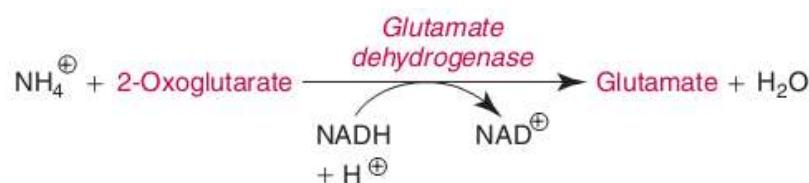
در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی معمولاً بطور مستقیم اوره اندازه گیری نمی‌شود بلکه مقدار نیتروژن اوره خون که به اصطلاح تحت عنوان BUN (Blood Urea Nitrogen) است سنجیده و برای پزشک گزارش می‌گردد. با توجه به اینکه هر مولکول اوره ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}_2$) می‌تواند دو مولکول نیتروژن آزاد کند، که آنهم پس از واکنش با آب بصورت یون آمونیوم (NH_4^+) در محلول است، لذا، مقدار اوره را می‌وان محاسبه نمود. با عنایت به اینکه برای پزشک معالج ملاک مقدار نرمال ماده مورد سنجش است، چندان تفاوتی ندارد که اوره یا محتوای نیتروژن اوره خون برای پزشک گزارش گردد. با توجه به اینکه در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مقادیر و محدوده‌های طبیعی برای هریک از آنالیت‌های موجود در خون روبروی جواب بیمار نوشته می‌شود لذا، مشکل عدم تطابق مقادیر طبیعی نیتروژن اوره خون (BUN) با اوره پیش نمی‌آید.

۱ مولکول گرم (۱ مول) اوره حاوی ۲ مولکول نیتروژن است؛ ۱ مولکول گرم اوره ۶۰ گرم جرم داشته که ۲۸ گرم آن وزن ۲ نیتروژن خواهد بود. اگر عدد ۶۰ را بر ۲۸ تقسیم کنیم، عدد ۲/۱۴ بدست می‌آید که از این عدد می‌توان برای تبدیل مقادیر نیتروژن اوره خون به اوره خون استفاده نمود یا بالعکس. مثلاً فردی که نیتروژن اوره خون (BUN) او ۲۳ باشد مقدار اوره خون او حدود ۴۹ است ($2/14 \times 23 = 49$).

روشهای سنجش اوره در خون و ادرار شامل روشهای مستقیم و غیرمستقیم هستند. امروزه روشهای غیرمستقیم استفاده بیشتری دارند زیرا مبتنی بر واکنشهای آنزیمهای اختصاصی هستند. برای سنجش اوره در مایعات بدن از واکنشی استفاده می‌شود که در آن ابتدا اوره توسط آنزیم **اوره‌آز (Urease)** و در حضور دو مولکول آب تجزیه و تبدیل به ۲ یون آمونیوم می‌شود

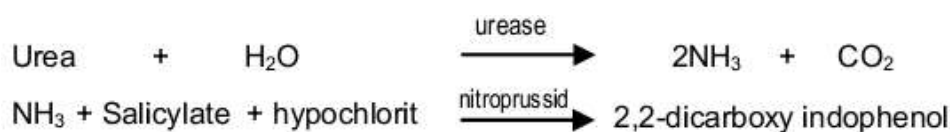


روش اسپکتروفتومتری برای سنجش آمونیوم شامل واکنش برتل (Berthelot Reaction) و آزمون آنزیمی گلوتامات دهیدروژناز است که در آن از سیستم اکسیداسیون-احیاء NADPH_2 و NADP یا NADH_2 و NAD استفاده می‌شود. این روش بعنوان روش مرجع شناخته شده و دستگاه‌های اتوماتیک عموماً برای این روش طراحی شده‌اند. در این روش، یون آمونیوم (NH_4^+) حاصل از واکنش آنزیم اوره‌آز با یک ماده واکنشگر دیگر مثل ۲-اُکسوگلو تارات تحت اثر آنزیم گلو تامات دهیدروژناز و در حضور سیستم کو آنزیم اکسید-احیاء NADP و NADPH_2 یا NAD و NADH_2 ، واکنش داده و آمینواسید گلو تامات و آب حاصل می‌آیند. NADPH_2 در طول موج ۳۴۰ نانومتر (که در محدوده فرابنفش است) جذب داشته و لذا هر قدر غلظت اوره بیشتر باشد، آمونیوم بیشتر، واکنش با ۲-اُکسوگلو تارات بیشتر و مصرف NADPH_2 بیشتر و در نتیجه میزان جذب نوری کمتر خواهد بود. غلظت نمونه مجهول در مقایسه با نمونه استاندارد و طبق همان روش تناسب که در بحث اسپکتروفتومتری ذکر گردید محاسبه می‌گردد.



روشهای دیگر برای سنجش اوره یا BUN

هم در گذشته و هم در حال حاضر روشهای دیگری نیز برای سنجش اوره و BUN وجود داشته اند که امروزه برخی از آنها نیز کاربرد دارند. لیکن اساس بیشتر آنها مبتنی بر آزاد شدن یون آمونیوم از اوره و سپس جفت کردن چند واکنش است که در نهایت فراورده دارای جذب نوری تشکیل شود که شدت نور جذبی آن شاخصی از غلظت اوره باشد. به مثال دیگری که در زیر آمده است و سیستم جفت کردن واکنشهای دیگری برای سنجش اوره را نشان می دهد دقت بفرمائید:



ماده ۲،۲-دی کربوکسی ایندوفنل، در طول موج ۶۰۰ نانومتر دارای ماکزیمم جذب است. لذا، با سنجش میزان جذب این ماده مقدار اوره را می توان محاسبه نمود.

روش انجام آزمایش

ابتدا سه لوله آزمایش انتخاب نموده و روی آنها می نویسیم B (بلانک)، S (استاندارد) و T (نمونه مجهول یا تست). نمونه مورد استفاده می تواند سرم، پلاسما یا ادرار باشد (بسته به درخواست پزشک معالج). برای سنجش میزان اوره یا BUN موجود در خون طبق جدول زیر عمل کنید:

T (تست)	S (استاندارد)	B (بلانک یا شاهد)	
سرم یا پلاسما بیمار ۲۰ میکرولیتر	محلول استاندارد ۲۰ میکرولیتر	آب مقطر ۲۰ میکرولیتر	حجم ماده افزودنی
۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	محلول حاوی آنزیم اوره آز
به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگه داری کنید			
۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	محلول سالیسیلات، هیپوکلریت و محلول بافری
لوله‌ها را در پایان کار بخوبی مخلوط نموده، به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگه داری کنید			

با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و طول موج ۶۰۰ نانومتر میزان جذب نوری برای لوله B را صفر و سپس جذب نوری هر یک از لوله های T و S را قرائت کنید. محاسبات را با استفاده از تناسب انجام داده و غلظت اوره و BUN را گزارش کنید.

فراموش نکنید: برای محاسبه غلظت اوره یا BUN در لوله T بایستی غلظت BUN در لوله S را بدانیم!

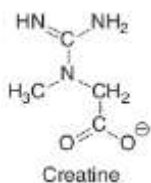
محدوده مرجع

در افراد بالغ غلظت نیتروژن اوره خون معادل ۶ الی ۲۰ میلی گرم در دسی لیتر (mg/dl) (یعنی معادل ۲/۱ الی ۷/۱ میلی مول در لیتر برحسب اوره) و در افراد بالای ۶۰ سال مقدار مرجع بین ۸ الی ۲۳ میلی گرم در دسی لیتر (یعنی معادل ۲/۹ الی ۸/۲ میلی مول در لیتر اوره) می باشد. غلظت اوره آقایان مقداری بیشتر از خانمها و غلظت اوره کودکان و زنان باردار مقداری کمتر از بالغین است.

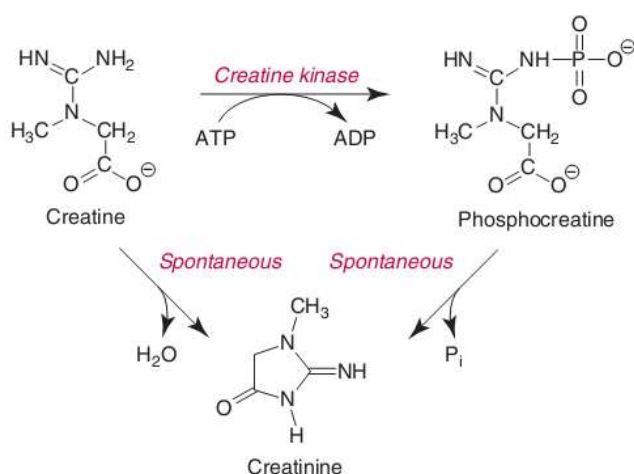
غلظت بالای اوره (یانیتروژن اوره) خون را حالت اورمیک یا هیپراورمی (غلظت بیش از ۲۰ یا ۲۳ میلی گرم در دسی لیتر)، می گویند که از نظر بالینی حائز اهمیت است. کاهش غلظت اوره خون از نظر بالینی اهمیت ندارد و فقط افزایش آن مورد توجه پزشک است.

آزمایش اندازه‌گیری کراتینین خون و ادرار

کراتین ماده‌ای است که توسط کبد، کلیه‌ها و پانکراس تولید می‌شود. کراتین بعد از تولید درون کبد، کلیه‌ها و پانکراس از طریق جریان خون به سایر بافتها و بویژه عضلات و مغز انتقال می‌یابد. در عضله و مغز کراتین فسفوریله شده و فسفوکراتین تولید می‌شود که وظیفه ذخیره انرژی در این بافتها را برعهده دارد. این ماده همانند ATP یک منبع انرژی مهم برای عضله محسوب شده و قدرت انقباضی عضله حین فعالیت را برای مدت طولانی تری حفظ می‌کند.



سرگذشت متابولیسم کراتین را می‌توان به این شکل شرح داد که پس از تولید و انتقال به بافت عضلانی، توسط آنزیم کراتین کیناز تبدیل به فسفوکراتین می‌شود. برای فسفوریله کردن کراتین، در شرایط استراحت سلول عضلانی که ATP به مقدار کافی وجود دارد، فسفر پرانرژی ATP بکار می‌رود و آنزیم کراتین کیناز از این فسفر برای فسفوریله کردن کراتین استفاده می‌کند. فسفوکراتین، که همانند ATP یک منبع انرژی محسوب می‌شود، حین فعالیت انقباضی عضله فسفر خود را از دست می‌دهد و انرژی موجود در فسفر آن آزاد شده تا صرف حرکت عضلانی شود. فسفوکراتین، هنگامیکه فسفر خود را از دست می‌دهد (مجدداً به ATP می‌دهد تا صرف انقباض عضله گردد) تبدیل به ماده‌ای بنام کراتینین می‌شود که از بدن، و بویژه از طریق ادرار، دفع می‌گردد. همچنین، فسفوکراتین و کراتینی که فسفوریله نمی‌باشد نیز می‌توانند بصورت خودبخودی تبدیل به کراتینین گشته و از بدن دفع شوند؛ واکنشهای زیر را ملاحظه فرمائید:



میزان تولید کراتینین در روز برای هر فرد تقریباً ثابت بوده و بستگی به حجم توده عضلانی دارد. هر قدر توده عضلانی فرد بیشتر باشد، مقدار کراتینین تولید شده در طول روز بیشتر خواهد بود. اما، در افراد سالمی که مواد مکمل مانند کراتین مصرف نمی‌کنند، مقدار کراتینین عموماً در محدوده طبیعی باقی خواهد ماند و اینطور نیست که در چنین افرادی مقدار کراتینین آنها از حد طبیعی بالاتر رود. لذا، افزایش غلظت کراتینین در خون نشاندهنده حالت بیماری است.

کراتینین در تمام مایعات بدن وجود دارد، از کلیه‌ها فیلتر شده و به

میزان قابل توجهی توسط لوله‌های کلیوی بازجذب نمی‌شود؛ تمام این خصوصیات باعث شده تا در طب بالینی از کراتینین بعنوان یک مولکول مناسب برای ارزیابی عملکرد کلیه‌ها استفاده شود زیرا در مواردی که اختلال عملکرد کلیه‌ها به علل بیماریهای مختلف پیش می‌آید، غلظت خونی کراتینین افزایش یافته و این افزایش حتی تا اندازه‌ای (نه بطور کامل) متناسب با شدت آسیب کلیه‌هاست. اهمیت سنجش کراتینین آنقدر نزد پزشکان بالینی بالاست که بر مبنای جواب آزمایش کراتینین تصمیم می‌گیرند بیمار مبتلا به نارسایی کلیوی را دیالیز کنند یا اینکه بیمار نیاز به دیالیز ندارد.

آنچه که نشاندهنده کیفیت عملکرد کلیه‌هاست میزان تصفیه مواد زائد یا سمی مانند کراتینین توسط کلیه‌ها می‌باشد. کیفیت عملکرد کلیه‌ها به سالم بودن نفرون‌ها، سرعت جریان خون کلیوی، سرعت فیلتر شدن خون از نفرون‌ها و مواردی از این قبیل بستگی دارد. کلیه‌ها به عنوان یکی از مهمترین اعضاء بدن محسوب می‌شوند که اختلال در عملکرد آنها تهدیدکننده حیات فرد می‌باشد. لذا، سنجش عملکرد آن بسیار حائز اهمیت است. کراتینین در کنار اوره و برخی مولکولهای دیگر از اهمیت ویژه‌ای در ارزیابی عملکرد کلیه و سرعت تصفیه گلومرولهای کلیوی (Glomerular Filtration Rate) برخوردار است. هر قدر سرعت تصفیه کلیوی بیشتر باشد موادی که تجمع آنها برای بدن مضر است سریعتر از بدن دفع می‌شوند؛ مانند اوره و کراتینین. سرعت تصفیه گلومرولی به عوامل بسیار زیادی ربط دارد؛ مثلاً، قدرت پمپاژ قلب، فشار خون، کارآیی نفرون‌ها، بیماریهایی مثل دیابت، بیماریهای ایمنولوژیک، عفونت‌های باکتریایی، مسمومیت با مواد شیمیایی، و..... درواقع در همه این موارد آنچه که تغییر می‌کند میزان GFR است. عواملی که GFR را کاهش دهند موجب بیشتر باقی ماندن مواد سمی درون بدن می‌شوند. لذا، کراتینین بعنوان یکی از شاخص‌های عملکرد کلیه می‌تواند نشاندهنده کیفیت کار کلیه‌ها باشد.

پرسش: مشخص کنید کاهش یا افزایش، وجود یا عدم وجود هر کدام از عوامل زیر احتمالاً چه تاثیر بر غلظت اوره و کراتینین خواهد داشت؟ چرا؟

کاهش قدرت پمپاژ قلب:

بیماری دیابت:

عفونت ادراری طولانی مدت:

مارگزیدیگی (سم مار) که منجر به رسوب پروتئین در نفرون‌ها گردد:

فشار خون پائین:

روش سنجش کراتینین

برای سنجش کراتینین روشهای مختلفی وجود دارد. در این جا به شرح روش شیمیایی کراتینین می‌پردازیم که یکی از قدیمی‌ترین روشها بوده ولی هنوز هم در آزمایشگاههای بالینی کاربرد دارد. در این روش کراتینین در محیط قلیایی با پیکرات واکنش داده و تولید کمپلکس رنگی زرد-نارنجی می‌نماید. از سال ۱۸۸۶ که این روش توسط ژافه ابداع شد تا کنون (سال ۲۰۱۳)، هنوز هم دانشمندان ساختار واقعی کمپلکس رنگی که تشکیل می‌شود را نتوانسته‌اند به درستی شناسایی نمایند.

Creatinine + Sodium Picrate → Creatinine-picrate complex (yellow-orange)

کمپلکس رنگی تشکیل شده در طول موج ۵۱۰ نانومتر دارای جذب نوری بوده که از این خاصیت برای سنجش مقدار کراتینین استفاده می‌شود.

روش کار: طبق جدول زیر سه لوله انتخاب و نامگذاری کنید. سپس، مقادیر نشان داده شده از هر کدام از محلولهای ذکر شده در جدول را به لوله ها اضافه نمایید. توجه نمائید: غلظت کراتینین در ادرار بسیار بالاتر از غلظت آن در سرم است و برای سنجش غلظت کراتینین در ادرار می‌بایست ابتدا آنرا رقیق نمود و بعد از سنجش ضریب رقت را در غلظت بدست آمده ضرب کرد تا مقدار واقعی غلظت کراتینین در ادرار محاسبه گردد. معمولاً ادرار را به نسبت ۵۰ برابر رقیق می‌کنند تا قابل سنجش باشد.

T (تست)	S (استاندارد)	B (بلانک یا شاهد)	
سرم یا پلاسما یا ادرار (رقیق شده) بیمار ۲۰۰ میکرولیتر	محلول استاندارد ۲۰۰ میکرولیتر	آب مقطر ۲۰۰ میکرولیتر	حجم ماده افزودنی
۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	محلول حاوی پیکریک اسید در بافر قلیایی
لوله‌ها را سریع مخلوط نموده و راس ۳۰ ثانیه جذب آنها را بنخوانید. سپس، به مدت ۱ دقیقه صبر کنید و مجدداً جذب نوری لوله‌ها را قرائت کنید.			

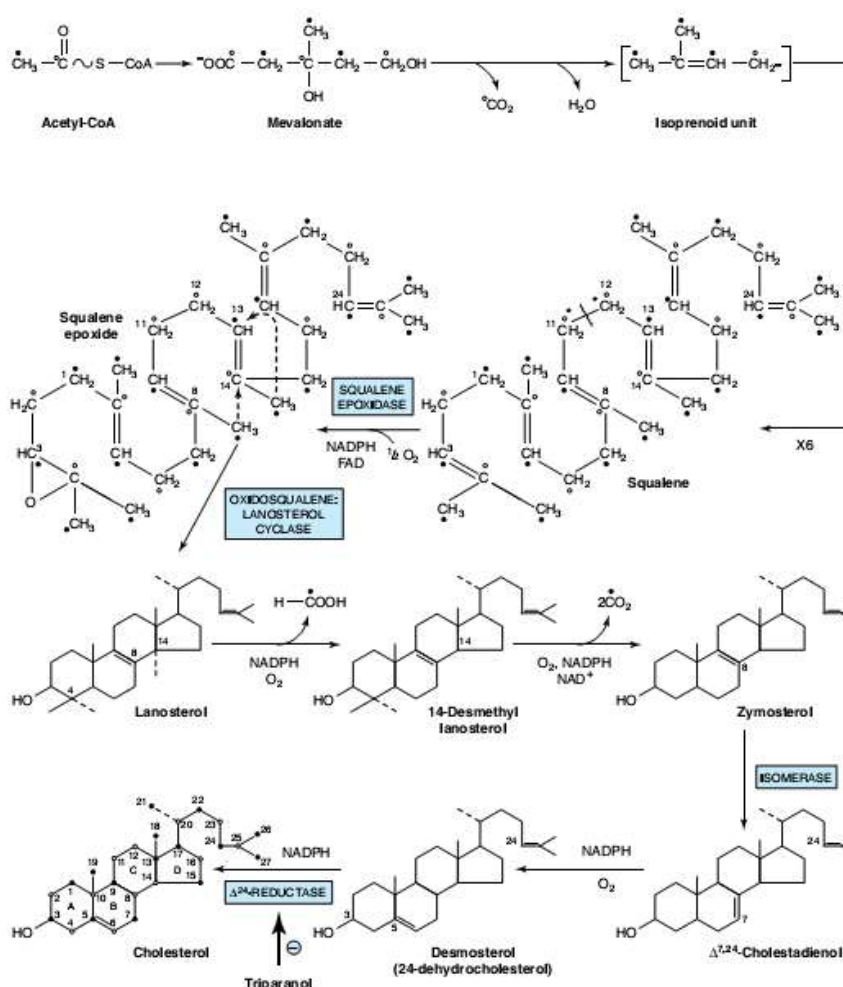
سپس از فرمول زیر مقدار کراتینین را محاسبه و گزارش نمائید. توجه؛ اگر از نمونه ادرار استفاده کرده اید، و نمونه را رقیق نموده اید در نهایت باید پاسخ بدست آمده را در ضریب رقت ضرب کنید و جواب را گزارش نمائید.

$$\text{Creatinin} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right) = \frac{A_{2T} - A_{1T}}{A_{2S} - A_{1S}} \times C_S$$

محدوده مرجع غلظت کراتینین بین ۰/۴ الی ۱/۴ میلی گرم در دسی لیتر است. لذا، مقادیر بالاتر از ۱/۴ را زنگ خطر محسوب می‌نمایند و حالت پاتولوژیک می‌دانند. توجه: گاهی اوقات ورزشکاران و بویژه افرادی که بدن سازی می‌کنند غلظت کراتینین در آنها ممکن است از حد نرمال بالاتر باشد که علت آن مصرف کراتین بصورت مکمل تغذیه‌ای توسط اینگونه افراد است.

آزمایش سنجش کلسترول در خون

هرچند تقریباً تمام موجودات زنده دارای ترکیبات استرول می‌باشند لیکن، کلسترول صرفاً در حیوانات یافت می‌شود و استرول اصلی در بدن حیوانات محسوب می‌گردد. گیاهان نیز دارای استرولها هستند و استرول معروف موجود در آنها را فیتواسترول می‌نامند. لیکن، کلسترول صرفاً در حیوانات موجود است. کلسترول تقریباً در تمام سلولها و مایعات بدن یافت می‌شود. منبع کلسترول موجود در خون یا مواد غذایی هستند و یا کلسترولی که در بافتها تولید می‌شود. مسیر سنتز کلسترول مسیری پیچیده بوده و واسطه‌های زیادی در این مسیر وجود دارند. تقریباً نیمی از کلسترول موجود در جریان خون توسط خود بدن تولید می‌شود و مابقی آن از طریق خوراکی وارد بدن می‌گردد. همه سلولهای هسته دار بدن توانایی تولید کلسترول را دارند. در بافتهای کبد و روده‌ها حدود ۱۰ درصد از کلسترول تولید شده در داخل بدن ساخته می‌شود. پیش‌ساز مولکولهای کلسترول در بدن استیل-کوآنزیم A می‌باشد. استیل کوآنزیم A طی واکنشهایی تبدیل به مولونات شده و مولونات نیز طی واکنشهایی در نهایت تبدیل به کلسترول می‌گردد. مسیر بیوسنتز کلسترول بصورت زیر است:



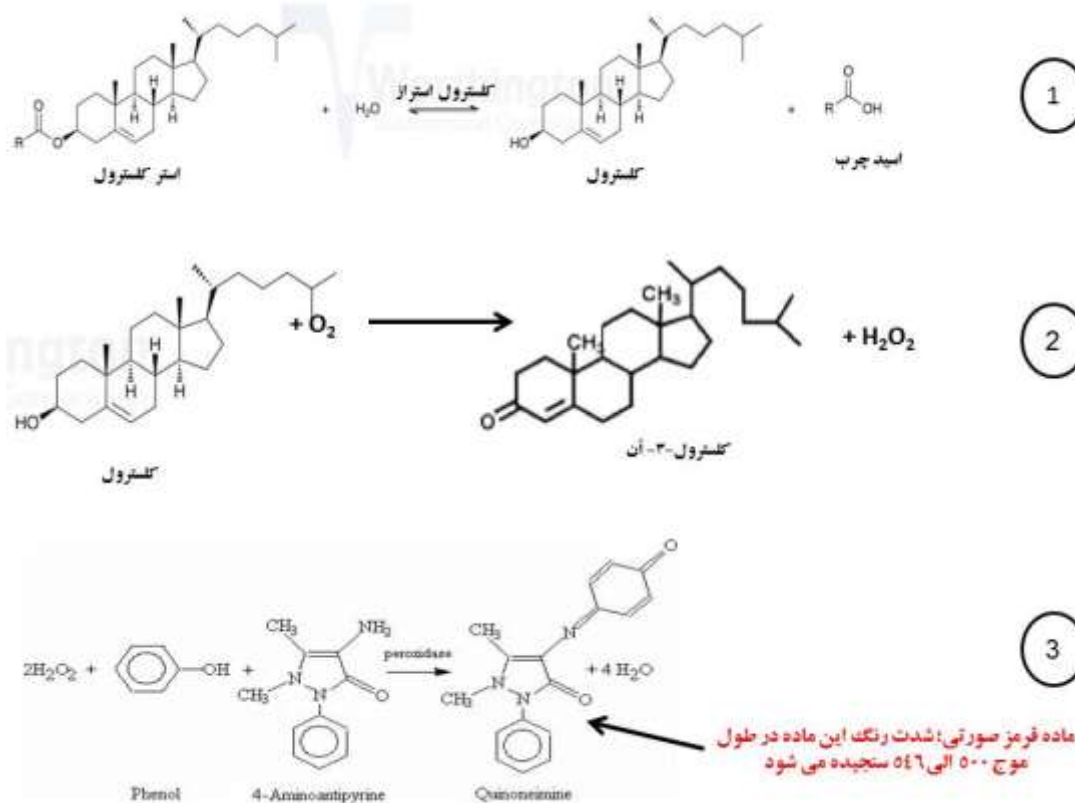
منبع دیگر کلاسترول موجود در بدن از مواد غذایی است. مواد غذایی حاوی کلاسترول موادی هستند که از منابع حیوانی، و نه گیاهی، بدست می آیند. کلاسترول هم در تشکیل ساختار غشاءهای سلولی و هم بعنوان پیش ساز هورمونهای استروئیدی (مثل هورمونهای کورتیزول، آلدوسترون، هورمونهای جنسی استرادیول، تستوسترون و....) نقش دارد. کلاسترول با داشتن یک عامل OH در بخشی از ساختار خود دارای یک سر قطبی خواهد بود. سر دیگر کلاسترول گروهای متیل قرار دارند که خاصیت غیرقطبی به مولکول می دهند، لذا، کلاسترول نیز همانند اسیدهای چرب یک مولکول آمفی پاتیک محسوب می شود. ازاینرو انتهای قطبی آن هیدروفیل و انتهای غیرقطبی آن هیدروفوب است. کلاسترول، هم برای حفظ ساختار بافتها و هم برای تولید هورمونهای استروئیدی در بدن بکار رفته و مصرف می شود. همچنین، اسیدهای صفاوی نیز از این مولکول مشتق می گردند. کلاسترول برای اینکه به بافتهایی که به آن نیاز دارند، یعنی بافتهای تولید کننده هورمونهای استروئیدی و بافتهای در حال تقسیم سلولی (برای ساخت غشاءها)، برسد، می بایستی در جریان خون حمل شود. کار انتقال کلاسترول توسط ساختارهایی بنام لیپوپروتئین ها صورت می گیرد. همچنین، کلاسترول از قسمت گروه OH- خود با عامل اسیدی یک اسید چرب واکنش داده و اصطلاحاً استریفیه شود (یعنی تولید استر نماید). مولکول کلاسترول استریفیه توسط لیپوپروتئین ها در جریان خون حمل می شود.

وجود کلاسترول در ساختار غشاء تا اندازه ای می تواند سیالیت غشاء سلول را افزایش دهد. لیکن، اگر غلظت آن بیش از حد گردد، منجر به سخت شدن غشاء سلول می شود. همچنین، ذخیره بیش از حد کلاسترول در سلولها ماکروفاژ موجود در دیواره رگها باعث اختلال ساختار دیواره رگها می گردد. اختلال ساختار دیواره رگها و ضخیم شدن دیواره رگ می شود. اختلال ساختار دیواره رگها و ضخیم شدن آن باعث تشکیل لخته خون و انسداد مسیر جریان خون، توقف خون رسانی به بافت مبتلا، آنوکسی (قطع اکسیژن رسانی به بافت) و در نهایت مرگ بافت می شود. انسداد رگها و عدم خون رسانی به بافتها را به اصطلاح سکتة یا انفارکتوس (Infarction) می گویند. لذا، افزایش بیش از حد کلاسترول در جریان خون، به مرور زمان احتمال بروز سکتة را در افراد مبتلا به افزایش بیش از حد کلاسترول بالا می برد. سنجش غلظت کلاسترول خون به این دلیل حائز اهمیت است. غلظت بیش از حد طبیعی کلاسترول در جریان خون را هیپرکلاسترولمی می گویند. کاهش بیش از حد طبیعی کلاسترول در جریان خون نیز در طولانی مدت باعث اختلال در تولید هورمونهای استروئیدی می گردد که متناسب با نوع هورمون، علائم بالینی می توانند متفاوت باشند. هرچند، هیپوکلاسترولمی (کاهش غلظت کلاسترول در جریان خون) به ندرت اتفاق می افتد.

بیماران مبتلا به هیپرکلاسترولمی یا مقدار کلاسترول خون آنها آنقدر بالاست که باید داروهای قوی کاهش دهنده غلظت کلاسترول خون دریافت کنند و یا اینکه غلظت کلاسترول آنها در حدی است که می توانند با تنظیم رژیم غذایی غلظت کلاسترول خون را در حد مناسب نگه دارند. لیکن، مواردی نیز وجود دارند که کلاسترول فرد به دلیل استعداد ژنتیکی و ارثی بالا خواهد بود که این افراد نیز ملاحظات درمانی خاص خواهند داشت.

روش سنجش کلسترول

همانند مولکولهای دیگری که قبلاً روش سنجش آنها توضیح داده شد، کلسترول نیز تحت تاثیر واکنشهای نشان داده شده در زیر و تحت تاثیر آنها خاصیتی که در محلول اندازه گیری کلسترول موجوداند در نهایت به نحوی تغییر می کند که فرآورده ای رنگی از واکنشهای آن حاصل می شود. هر قدر غلظت کلسترول در جریان خون بیشتر باشد، شدت رنگ تولید شده بیشتر خواهد بود.



همانطور که در این شکل نشان داده شده است، کلسترول استر تحت تاثیر آنزیم کلسترول استراز و در حضور آب، به کلسترول و اسید چرب تجزیه می شود. سپس، کلسترول آزاد، تحت تاثیر آنزیم کلسترول اکسیداز اکسید شده و کلسترول-۳-آن و همچنین مولکول H₂O₂ را تولید می کند که این مولکول نیز می تواند (مانند واکنشی که برای گلوکز ذکر شد) تحت تاثیر آنزیم پراکسیداز تجزیه شده و رادیکال آزاد ایجاد نماید. رادیکال آزاد به ساختار فنل و ۴-آمینوآنتی پرین حمله کرده و باعث می شود این دو ماده با یکدیگر واکنش داده و کمپلکس قرمز رنگی را ایجاد نماید. شدت رنگ ایجاد شده را در طول موج ۵۰۰ الی ۵۴۶ می توان سنجید.

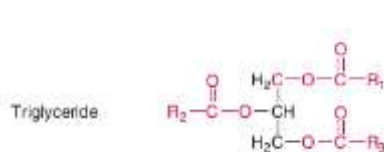
T (تست)	S (استاندارد)	B (بلاتک یا شاهد)	حجم ماده افزودنی
سرم یا پلاسمای بیمار ۲۰۰ میکرولیتر	محلول استاندارد ۲۰۰ میکرولیتر	آب مقطر ۲۰۰ میکرولیتر	

محلول حاوی آنزیمهای مورد نیاز برای سنجش کلسترول	۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر
لوله‌ها را بخوبی هم بزنید و حدود ۱۵ دقیقه در محیط آزمایشگاه نگه دارید. سپس، جذب نوری آنها را در طول موج ۵۰۰ نانومتر بخوانید. فراموش نکنید که از محلول بلانک برای صفر کردن دستگاه استفاده نمائید.			

جواب بدست آمده را تفسیر نموده و مشخص کنید که بیمار دارای غلظت کلسترول خون طبیعی، بالا یا پائین است؟

آزمایش سنجش تری گلیسرید در خون

تری گلیسریدها همانطور که از نامشان پیداست ترکیبی از گلیسرول و سه اسید چرب هستند. اگر به جای یکی از اسیدهای چرب در ساختار نشان داده شده در زیر، یک مولکول فسفات متصل باشد، آنوقت فسفاتیدیل دی گلیسرول تشکیل می شود که عمدتاً در تشکیل غشاءهای سلول نقش دارند.



اما، خود تری گلیسرید، بیشتر نقش ذخیره ای دارد و بعنوان منبع اسیدهای چرب و گلیسرول در

بدن در سلولهای موجود در هر بافت ذخیره می شود. تری گلیسریدهای موجود در بدن یا از

طریق روده بصورت اسید چرب و گلیسرول وارد بدن می شوند یا اینکه توسط بافتهایی مثل روده،

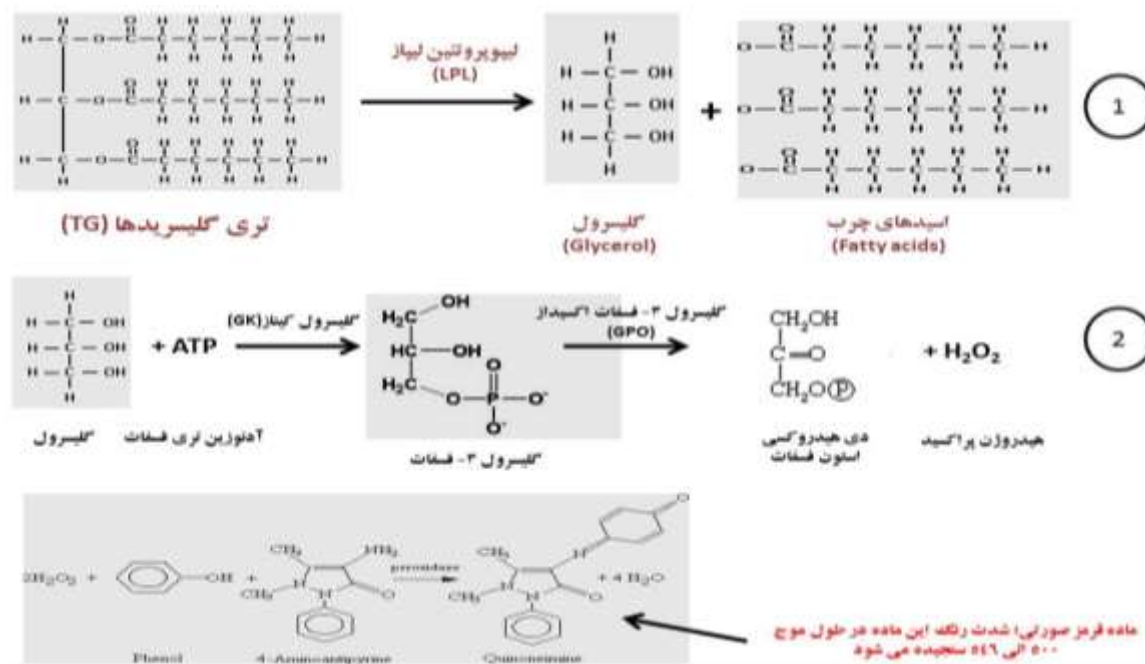
بافت چربی و کبد سنتز می گردند. گلیسرول یا از طریق مواد غذایی یا از طریق واسطه های مسیر گلیکولیز درون بدن برای تولید تری گلیسریدها تامین می شود. اسیدهای چرب نیز یا از طریق غذا وارد بدن می شوند یا اینکه توسط کمپلکس آنزیمی اسیدچرب سنتاز درون سلولها تولید می شوند. تری گلیسریدها عمدتاً درون سلولهای بافت چربی ذخیره می شوند و هرگاه نیاز باشد، تحت تاثیر آنزیم لیپاز (تجزیه کننده لیپیدها) به اسیدهای چرب و تری گلیسرید تجزیه می شوند. اسیدهای چرب در میتوکندری سلولهایی که به انرژی نیاز دارند در مسیر بتا اکسیداسیون، اکسید شده و تولید ATP می کنند. بطور کلی گفته می شود که اسیدهای چرب بیش از مولکول گلوکز انرژی تولید می کنند که این ویژگی به دلیل تعداد کرین بیشتر و بعضاً نوع پیوندهای موجود در ساختار اسیدهای چرب است. گلیسرول نیز می تواند برای تولید مجدد تری گلیسریدها مصرف شود یا اینکه آنهم برای تولید انرژی وارد مسیرهای کاتابولیسمی گردد. تری گلیسریدها برای اینکه بتوانند از بافت چربی به سایر بافتها، مثل کبد، انتقال پیدا کنند باید از طریق جریان خون به سایر بافتها برسند. لیکن، تری گلیسریدها در آب نامحلول اند و برای انتقال آنها از بافت چربی به بافتهای دیگر لازم است تا با پروتئینها پیوند برقرار نمایند. لذا، تری گلیسریدها نیز همانند کلسترول بصورت لیپوپروتئینها در خون نقل و انتقال می یابند. غلظت بالای تری گلیسریدها در خون (که عمدتاً بصورت لیپوپروتئین هستند) نشان دهنده اختلال در مسیر متابولیسم چربی هاست. یعنی، اگر تولید این چربیها در بدن بالا باشد یا مصرف آنها کم بوده و در نتیجه غلظت آنها در جریان خون بالا باقی مانده باشد، این امر نشاندهنده اختلال متابولیسم چربی هاست.

اندازه گیری غلظت تری گلیسریدها شاخصی از وضعیت متابولیسم چربیها در بدن است. هر قدر غلظت این نوع چربیها در جریان خون بالاتر باشد، فرد به میزان بیشتری در معرض خطر بیماریهای قلبی-عروقی خواهد بود. لذا، سنجش تری گلیسریدها، در کنار سنجش کلسترول و لیپوپروتئینها شاخصی برای تعیین میزان خطر بیماریهای قلبی-عروقی و اختلال متابولیسم چربیها می باشد.

غلظت بالای تری گلیسریدها در خون را اصطلاحاً هیپرتری گلیسریدمی، و غلظت بیش از حد پائین تری گلیسریدها در خون را اصطلاحاً هیپوتری گلیسریدمی می گویند. در حالت هیپرتری گلیسریدمی فرد نیازمند رعایت رژیم غذایی و در موارد بسیار شدید نیازمند دریافت داروهای کاهش دهنده چربی خون است. در افراد دیابتی ممکن است اختلال متابولیسم چربیها نیز مشاهده شود که این امر ناشی از عدم تامین انرژی توسط قند و بعوض آن سوخت هرچه بیشتر اسیدهای چرب حاصل از تری گلیسریدهاست. در موارد شدید ممکن است در بیمار دیابتی حالت اسیدوز ایجاد می شود و حیات فرد را تهدید نماید، زیرا، اکسیداسیون اسیدهای چرب می تواند منجر به تولید کتواسیدها شود.

روش کار سنجش تری گلیسریدها

امروزه برای سنجش تری گلیسریدها نیز از روشهای آنزیم استفاده می شود. شکل زیر روند و واکنشهای بیوشیمیایی سنجش تری گلیسریدها را نشان می دهد. هر مولکول تری گلیسرید که کمپلکس گلیسرول با ۳ اسید چرب است تحت تاثیر آنزیم لیپاز به گلیسرول و ۳ اسید چرب تجزیه می شود. سپس، گلیسرول تحت تاثیر آنزیم گلیسرول کیناز به گلیسرول ۳-فسفات تبدیل می شود. آنزیم دیگری بنام گلیسرول ۳-فسفات اکسیداز، گلیسرول ۳-فسفات را اکسید کرده و ایجاد دی هیدروکسی استون فسفات و H_2O_2 می نماید. ادامه واکنش، همانند واکنشهای ذکر شده برای گلوکز و کلسترول است.



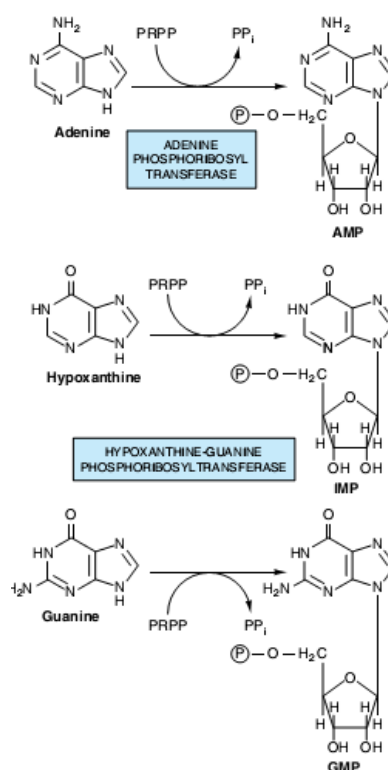
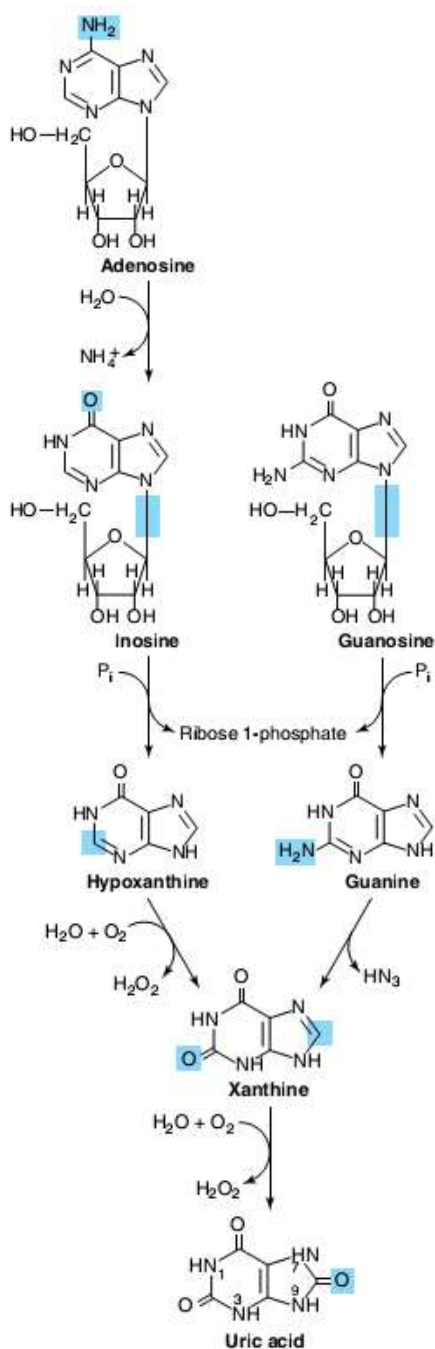
T (تست)	S (استاندارد)	B (بلاتک یا شاهد)	
سرم یا پلاسمای بیمار ۲۰۰ میکرولیتر	محلول استاندارد ۲۰۰ میکرولیتر	آب مقطر ۲۰۰ میکرولیتر	حجم ماده افزودنی
۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	محلول حاوی آنزیمهای مورد نیاز برای سنجش تری گلیسرید
لوله ها را بخوبی هم بزنید و حدود ۱۵ دقیقه در محیط آزمایشگاه نگه دارید. سپس، جذب نوری آنها را در طول موج ۵۰۰ نانومتر بخوانید. فراموش نکنید که از محلول بلاتک برای صفر کردن دستگاه استفاده نمائید.			

جواب بدست آمده را تفسیر نموده و مشخص کنید که بیمار دارای غلظت تری گلیسرید خون طبیعی، بالا یا پائین است؟

آزمایش سنجش اسید اوریک در خون

اسیدهای نوکلئیک متشکل از بازهای آلی پورینی و پیریمیدینی هستند. هنگامیکه اسیدهای نوکلئیک (DNA, RNA) تخریب می‌شوند ترکیباتی

حدواسط را ایجاد می‌کنند؛ یکی از مهمترین مواد حاصل از کاتابولیسم پورینها اسید اوریک است. تولید بیش از حد این ترکیب در بدن باعث تجمع آن شده و نشانه‌دهنده وجود اختلال در مسیر متابولیکی تولید آنهاست. در بدن مسیرهایی برای بازیافت بازهای آلی و تبدیل آنها به نوکلئوتیدها وجود دارد. شکل روبرو و شکل زیر مسیرهای بیوشیمیایی تجزیه و بازیافت نوکلئوتیدهای پورینی را نشان می‌دهد.



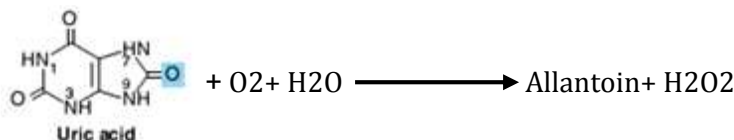
مسیر بازیافت نوکلئوتیدهای پورینی

مسیر تجزیه بازهای پورینی و تولید اسید اوریک

هرگونه اختلال در مسیر کاتابولیسم یا بازایافت نوکلئوتیدهای پورینی منجر به تغییر غلظت اسید اوریک (که متابولیت نهایی متابولیسم بازهای پورینی است) می‌گردد. هیپراوریسمی یا افزایش غلظت اسید اوریک در بیماریهایی مانند اختلال عملکرد کلیه، نقرس (gout)، سرطان خون (لوسمی؛ لوکمی)، پلی سیتی (افزایش بیش از حد تولید گلبولهای قرمز)، آترواسکلروز، دیابت، هیپوتیروئیدیسم (کم کاری تیروئید) یا برخی بیماریهای ژنتیکی، مشاهده می‌شود. تجزیه بازهای پورینی (آدنین و گوانین) که منجر به تولید اسید اوریک می‌شود عمدتاً در کبد صورت می‌گیرد. لذا، در مواردی که بافت کبد دچار مشکل باشد، تولید اسید اوریک کاهش می‌یابد؛ مثلاً در بیماری ویلسون که ناشی از تجمع مس در کبد است.

روش کار سنجش اسید اوریک

برای سنجش اسید اوریک ابتدا از بیمار نمونه خون گرفته، سرم یا پلاسما را جداسازی می‌نمایند. سپس، مقدار اسید اوریک موجود در سرم یا پلاسما را با استفاده از یک روش آنزیمی اندازه‌گیری می‌کنند. اساس روش به این شکل است که اسید اوریک موجود در سرم یا پلاسما تحت تاثیر آنزیم اوریکاز قرار می‌گیرد در حضور آب، اکسیده شده، تولید آلانتوئین و H_2O_2 می‌نماید. H_2O_2 تولید شده تحت تاثیر آنزیم پراکسیداز تجزیه شده و تولید رادیکال آزادی می‌کند که می‌تواند ترکیبی از بنزوئیک اسید را به ۴-آمینوآنتی پیرین متصل نموده و کمپلکس رنگی ایجاد نماید. کمپلکس رنگی حاصله در طول موج ۵۲۰ نانومتر دارای جذب نوری ماکزیمم است؛ لذا، با سنجش جذب نوری آن می‌توان غلظت اسید اوریک موجود در نمونه را در مقایسه با نمونه استاندارد تعیین نمود.



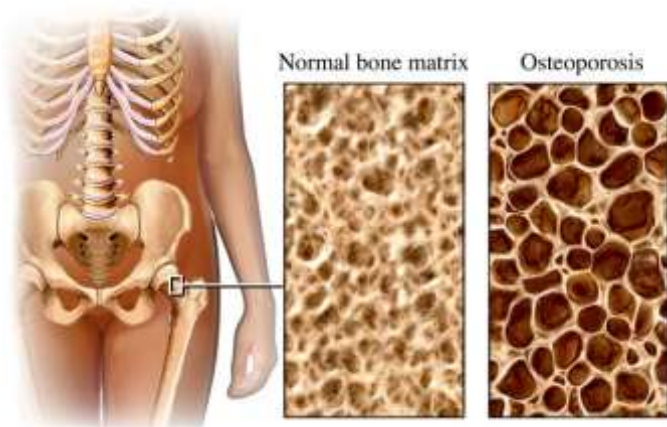
سه لوله آزمایش را طبق جدول زیر مشخص نموده و به لوله‌های مربوطه طبق جدول زیر مواد و معرفهای نشان داده شده در جدول را اضافه نمایید:

T (تست)	S (استاندارد)	B (بلانک یا شاهد)	
سرم یا پلاسمای بیمار ۲۰ میکرولیتر	محلول استاندارد ۲۰ میکرولیتر	آب مقطر ۲۰ میکرولیتر	حجم ماده افزودنی
۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	محلول حاوی آنزیم و معرفهای سنجش اسید اوریک (اوریکاز، پراکسیداز و H_2O_2)
<p>لوله‌ها را بخوبی هم بزنید و حدود ۱۵ دقیقه در محیط آزمایشگاه نگه دارید. سپس، جذب نوری آنها را در طول موج ۵۲۰ نانومتر بخوانید.</p> <p>فراموش نکنید که از محلول بلانک برای صفر کردن دستگاه استفاده نمایید.</p> <p>مقدار اسید اوریک موجود در لوله تست را با استفاده از جذب نوری بدست آمده برای استاندارد و تست و غلظت معین استاندارد بدست آورید.</p>			

آزمایش سنجش کلسیم خون

کلسیم موجود در جریان خون می‌تواند بصورت متصل به پروتئین‌ها یا بصورت آزاد و یونیزه (Ca^{2+}) باشد. کلسیم به عنوان یکی از یونهای تنظیم کننده انقباض عضلانی، انتقال پیامهای عصبی و فعال کننده برخی واکنشهای بیوشیمیایی مانند فعال کردن آنزیمهای دخیل در انعقاد خون یکی از حیاتی‌ترین یونهای فلزی محسوب می‌شود. همچنین، نباید فراموش کرد که یکی از مهمترین نقشهای یون کلسیم حضور در بافت استخوان و دندان بصورت هیدروکسی آپاتیت است؛ این ترکیب که در بافت استخوان و دندان در اطراف رشته‌ای کلاژن رسوب می‌نماید موجب استحکام بافت پیوندی گشته و آن چیزی را پدید می‌آورد که اسکلت بدن (استخوان) و دندان خواهد بود. اختلالات کاهش یا افزایش غلظت کلسیم موجود در

جریان خون می‌تواند با بروز علائم شدید مانند تشنج یا گرفتگی شدید عضلانی همراه باشند. اختلالات مزمن نیز با بیماریهای مانند پوکی استخوان (osteoporosis) و نرمی استخوان همراه اند.



منبع شکل: <http://www.livtherapy.eu/education/osteoporosis.html>

در انسان حدود ۹۹ درصد کلسیم بدن در استخوانها و دندانها جای دارد. در جریان خون حدود ۵۰ درصد کلسیم بصورت آزاد (یونیزه) و بقیه آن بصورت متصل به پروتئینهاست. غلظت کلسیم یونیزه بدن تحت تاثیر شرایط اسید و باز قرار دارد؛ هر قدر شرایط بافت اسیدی تر باشد میزان کلسیم یونیزه نیز بیشتر خواهد بود و در شرایط قلیایی میزان یونیزاسیون کلسیم کمتر می‌شود.

غلظت کلسیم موجود در جریان خون تحت تاثیر هورمونهای پاراتیروئید (پاراتورمون)، کلسیتونین و ویتامین D می‌باشد، بطوریکه هورمون پاراتورمون باعث افزایش غلظت کلسیم یونیزه خون شده و کلسیتونین اثر معکوس دارد. پاراتورمون با اثر بر استخوان و فعال کردن فرایند تجزیه بافت استخوان، افزایش جذب کلسیم از دستگاه گوارش و کاهش دفع آن و افزایش بازجذب کلسیم از کلیه‌ها موجب افزایش غلظت کلسیم در جریان خون می‌شود. ویتامین D فعال (کلسی تریول فعال) نیز به جذب کلسیم تحت اثر هورمون پاراتورمون کمک می‌کند. از طرفی، کلسیتونین باعث افزایش دفع کلسیم شده و بدین طریق تنظیم هورمونی شرایط هوموستاز کلسیم را در بدن ایجاد می‌کند.

افزایش غلظت کلسیم را هیپرکلسیمی می‌گویند که در موارد افزایش فعالیت غده پاراتیروئید (hyperparathyroidism) به دلیل افزایش ترشح هورمون پاراتیروئید (Paratormon)، بیماریهای نئوپلاستیک (مثل سرطان پستان، سرطان برونش، تومور پانکراس)، استئوپورز، بیماری پاژت (Paget's disease)، بیماری آدیسون (addison's disease) و مصرف بیش از حد ویتامین A و D ایجاد می‌شود.

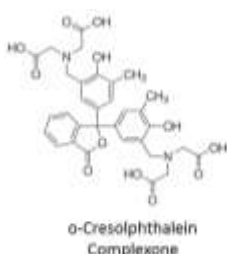
کاهش غلظت کلسیم در خون (هیپوکلسمی) نیز در موارد کم کاری غده پاراتیروئید یا هیپوپاراتیروئیدیسم (hypoparathyroidism)، اختلالات جذب، نارسایی مزمن کلیه، سندرم نفروتیک، سیروز کبدی و پانکراتیت حاد (التهاب حاد پانکراس) مشاهده می شود.

عموماً تست سنجش کلسیم جزء تستهای اورژانس بویژه در مواردی است که فرد با علائم تشنج به پزشک مراجعه کرده است. کاهش غلظت کلسیم به دلیل نقش آن در فرایند انقباض عضلانی، نیز منجر به گرفتگی های عضلانی حاد یا مزمن می شود. از اینرو، سنجش کلسیم برای تشخیص هریک از اختلالات فوق الذکر ضروری است.

روش سنجش کلسیم

پربکاربردترین روشی که برای سنجش کلسیم استفاده می شود، روش اورتو-کرزول فتالین است که در این روش کلسیم با ماده مذکور و در محیط قلیایی واکنش داده و کمپلکس رنگی ایجاد می نماید. لذا، به این روش کرزول فتالین کمپلکسون (o-Cresolphthalein Complexone =CPC) گفته می شود. کمپلکس رنگی ایجاد شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر ماکزیمم جذب را دارد.

نکته حائز اهمیت در خصوص سنجش کلسیم این است که چون کلسیم به مقدار زیاد در گلبولهای قرمز موجود است لذا، همولیز بودن نمونه های بیماران موجب بروز خطا و گزارش مقدار بیش از حد واقعی کلسیم خواهد شد. همچنین، ظروف، پی پت ها، سرسمپلرها و کلیه وسایل مورد استفاده در سنجش نباید آغشته به کلسیم یا یونهای دیگر باشند. لذا، ظروف مورد استفاده را باید ابتدا شستشوی اسیدی نمود یا از ظروف و وسایل یکبار



مصرف تمیز استفاده کرد. امروزه کیت های تجاری طوری طراحی شده اند که خطاهای ناشی از آلودگی ها را به حداقل می رسانند، مثلاً لوله های محتوی معرف های آنها یکبار مصرف و آماده مصرف اند.

برای سنجش غلظت کلسیم در یک نمونه مجهول سه لوله آزمایش به شکل جدول زیر تهیه نموده و مقادیر معرفها را طبق جدول به لوله های آزمایش اضافه نمایید.

T (تست)	S (استاندارد)	B (بلانک یا شاهد)	حجم ماده افزودنی
سرم یا پلاسما بیمار ۲۰ میکرولیتر	محلول استاندارد ۲۰ میکرولیتر	آب مقطر ۲۰ میکرولیتر	
۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	محلول حاوی اورتو-کرزول فتالین
لوله ها را بخوبی هم بزنید و حدود ۵ دقیقه در محیط آزمایشگاه نگه دارید. سپس، جذب نوری آنها را در طول موج ۵۷۰ نانومتر بخوانید. فراموش نکنید که از محلول بلانک برای صفر کردن دستگاه استفاده نمایید.			

مقدار کلسیم موجود در لوله تست را با استفاده از جذب نوری بدست آمده برای استاندارد و تست و غلظت معین استاندارد بدست آورید.

آزمایش سنجش فسفر خون

متابولیسم فسفر در بدن وابستگی شدیدی به کلسیم دارد، زیرا همانند کلسیم، بخش عمده فسفر در استخوانها و بصورت فسفات کلسیم موجود است. حدود ۸۰ درصد فسفر بدن در استخوانها موجود بوده و مابقی آن بصورت فسفاتهای آلی درون سلولی است که در ساختار فسفولیپیدها، اسیدهای نوکلئیک و ATP یا بصورت فسفات غیرآلی (معدنی) بیرون سلولی است. معمولاً در بدن بین غلظت کلسیم سرم و فسفات معدنی نوعی ارتباط معکوس وجود دارد، یعنی جذب و احتباس یکی از این دو همراه است با دفع دیگری.

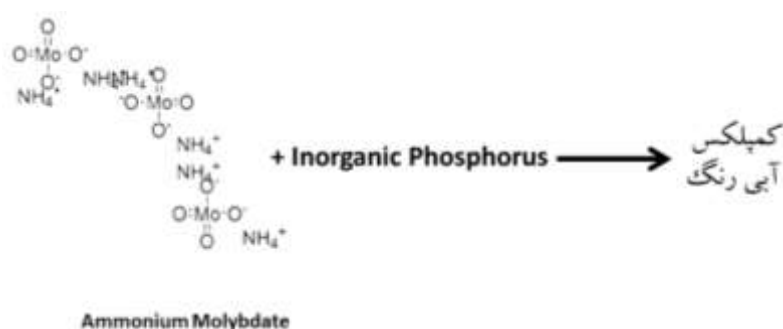
افزایش غلظت فسفر سرم در بیماری کلیوی، هیپوپاراتیروئیدیسم و مصرف بیش از حد ویتامین D مشاهده می شود. غلظت پائین آن نیز در بیماری ریکتز (Rickets)، نرمی استخوان یا ریکتز بالغین (Adult Rickets)، هیپوپاراتیروئیدیسم و کومای دیابتی مشاهده می شود.

فسفات در ساختار دندان و استخوان بصورت هیدروکسی آپاتیت موجود بوده و موجب استحکام آن می شود. کلسیتونین و پاراتورمون هورمون دو هورمونی هستند که در متابولیسم فسفات نقش دارند. لیکن، به دلیل اینکه منابع غنی از کلسیم و فسفات درون بدن وجود دارند، عموماً شرایط بالینی کمبود کلسیم و فسفر موقعی اتفاق می افتد که کمبود شدید باشد و منابع موجود در بدن براحتی نتوانند کاهش غلظت خونی این دو یون را جبران کنند. بطور کلی pH اسیدی در بافتهای استخوان و دندان موجب تجزیه و حل شدن هیدروکسی آپاتیت و pH قلیایی موجب رسوب هر چه بیشتر آن می گردد و استحکام بافت را تقویت می نماید.

کمبود با افزایش غلظت خونی فسفر که منجر به بروز وضعیت حاد بالینی شود به ندرت اتفاق می افتد که علت آن می تواند منابع غنی از فسفر در بدن باشد.

اساس روش اندازه گیری

بسیاری از روشهای سنجش فسفات در سرم براساس تشکیل فسفومولیدات و متعاقب آن احیاء شدن و تشکیل کمپلکس آبی رنگ می باشد.



با سنجش شدت رنگ کمپلکس آبی رنگ می توان غلظت مقدار فسفر را مورد سنجش قرار دارد.

امروزه روش فوق الذکر را اصلاح نموده اند تا کمپلکس دارای جذب نوری پایدارتر باقی بماند. از اینرو، برای سنجش فسفر از روشهایی استفاده می شود که در طول موج اشعه های فرابنفش جذب نوری دارند و سنجش آن را در طول موج ۳۴۰ نانومتر انجام می دهند.

روش انجام آزمایش:

مراحل سنجش فسفر را طبق دستورالعمل جدول زیر انجام دهید:

T (تست)	S (استاندارد)	B (بلانک یا شاهد)	
سرم یا پلاسما بیمار ۲۰ میکرولیتر	محلول استاندارد ۲۰ میکرولیتر	آب مقطر ۲۰ میکرولیتر	حجم ماده افزودنی
۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	محلول حاوی اورتو-کرزول فتالین
لوله‌ها را بخوبی هم بزنید و حدود ۵ دقیقه در محیط آزمایشگاه نگه دارید. سپس، جذب نوری آنها را در طول موج ۳۴۰ نانومتر بخوانید. فراموش نکنید که از محلول بلانک برای صفر کردن دستگاه استفاده نمائید.			

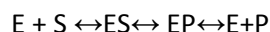
توجه: طول موجهای فرابنفش موقع عبور از شیشه‌های معمولی بیش از حد دچار شکست می‌گردند، لذا، باید از کووت‌های از جنس کوارتز استفاده نمائید که نور UV را جذب نمی‌نمایند.

مقدار فسفر یک نمونه سرم را بسنجید و محاسبات آنرا با توجه به غلظت نمونه استاندارد انجام داده و غلظت فسفر خون را گزارش دهید.

افزایش غلظت فسفر در جریان خون را هیپرفسفاتیسمی و کاهش غلظت آنرا هیپوفسفاتیسمی می‌گویند.

عوامل مؤثر بر فعالیت آنزیمها

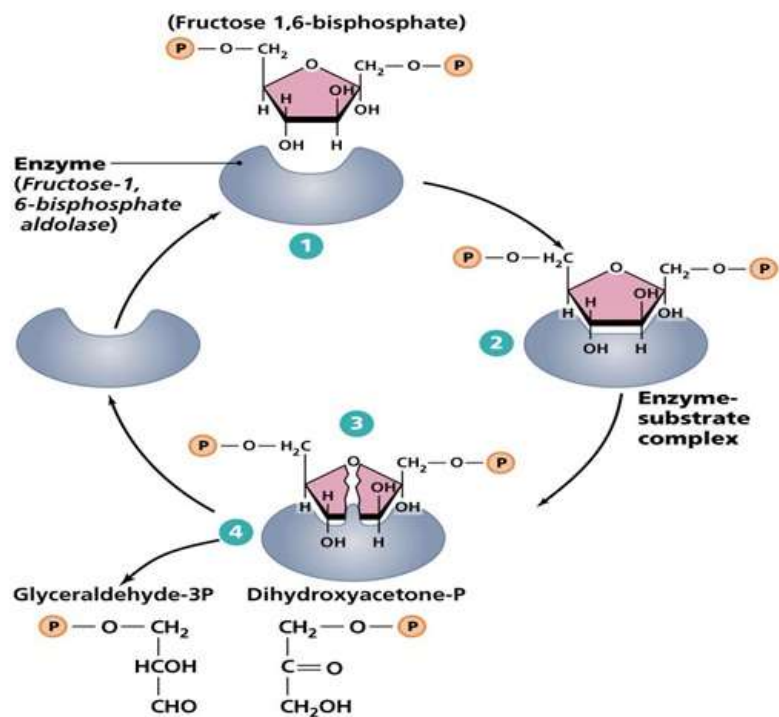
آنزیمها را کاتالیزورهای حیاتی می نامند. این کاتالیزورها سرعت انجام واکنشها را افزایش می دهند. یک واکنش ساده آنزیمی را می توان بصورت زیر نشان داد:



در واکنش بالا E نشاندهنده آنزیم است، S پیش ماده (Substrate)، ES کمپلکس آنزیم با پیش ماده است که در یک لحظه زمانی بسیار کوتاه تشکیل شده و بعد خیلی سریع پیش ماده دچار تغییر شده و توسط آنزیم تبدیل به فراورده می شود. لذا کمپلکس آنزیم-فراورده EP پدید می آید. P فراورد (Product) است که در نهایت از آنزیم جدا می شود و آنزیم می تواند مجدداً با یک مولکول سوبسترای دیگر وارد واکنش شود. توضیح: واکنشهای آنزیمی مدل‌های متنوعی دارند که در اینجا جای بحث آنها نیست.

فعالیت: چه نکته ای در شکل بالا مشاهده می کنید که در این متن توضیح داده نشده است؟ این نکته را توضیح دهید؟

فعالیت: شکل زیر قسمتی از مسیر گلیکولیز را نشان می دهد. الف- مشخص کنید سوبسترای آنزیمهای شماره ۱، ۲ و ۳ چه هستند؟ ب- مشخص کنید فراورده های آنزیمهای ۱، ۲ و ۳ چه هستند؟



با وجود تنوع واکنشهای آنزیمی یک سری قوانین کلی در مورد آنزیمهای بدن موجودات زنده برقراراند. مثلاً در مورد آنزیمها برخلاف مولکولهای شیمیایی موجود در بدن غلظت آنزیمها اهمیت ندارد بلکه فعالیت آنها مهم است زیرا ممکن است غلظت آنزیمی بالا باشد ولی ساختار آن دچار مشکل بوده و فعالیت کاتالیتیکی کمی داشته باشد. لذا فعالیت آنزیم مهم است نه غلظت آن.

برخی آنزیمها یک مولکول را می شکند و آن را به دو یا چند فرآورده تبدیل می کنند (مثلاً لیپازها، پروتئازها، نوکلئوتیدازها و...). برخی ۲ یا چند مولکول را به یکدیگر متصل کرده و پلیمر می سازند یا یک ماده مرکب می سازند (مثل ریپوزومها، DNA پلیمرها، RNA پلیمرها و...). لذا فعالیت آنزیمها ممکن است کاتابولیک یا آنابولیک باشد.

ساختار آنزیمها: عمده آنزیمها ساختار پروتئینی دارند ولی امروزه مشخص شده برخی RNAها و حتی DNAها بصورت آنزیم عمل می کنند (مثلاً RNAهای کوچک موجود در هسته سلول که hnRNA را ویرایش کرده و تبدیل به mRNA می کنند، یا DNAzyme که مولکولهای DNA دارای فعالیت کاتالیتیکی هستند).

آنزیمها یا ساده اند یا مرکب. آنزیمهای ساده نیازی به هیچ عامل کمکی ندارند ولی آنزیمهای مرکب اجزاء کمکی در ساختارشان دارند که بدون این اجزاء یا واکنش آنزیمی اصلاً انجام نمی شود یا خیلی کند انجام می شود.

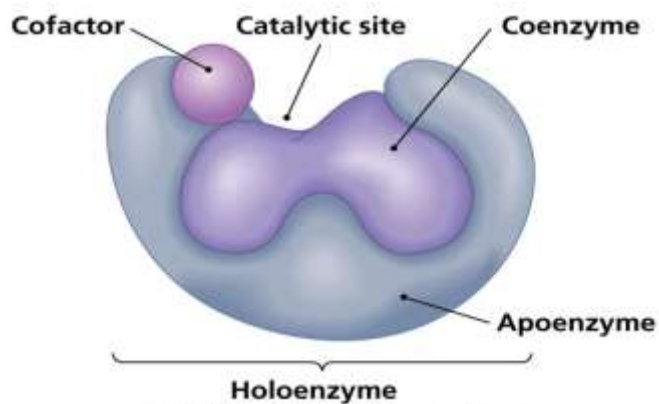
اجزاء موجود در آنزیمهای مرکب: آنزیمها عموماً برای انجام فعالیت خود نیازمند عوامل کمکی هستند. این عوامل را عامل کمکی (Co-Factor) می گویند.

۱- اگر کوفاکتور آنزیم یک مولکول شیمیایی مثل عنصر آهن، منیزیم، روی، مس، و... باشد از همان اصلاح کوفاکتور استفاده می شود.

۲- لیکن اگر ساختار کوفاکتور یک ساختار آلی باشد (مثل ویتامین های خانواده B، ویتامین A، ویتامین C، ویتامین K و ...) به آن کوآنزیم (Co-Enzyme) گفته می شود.

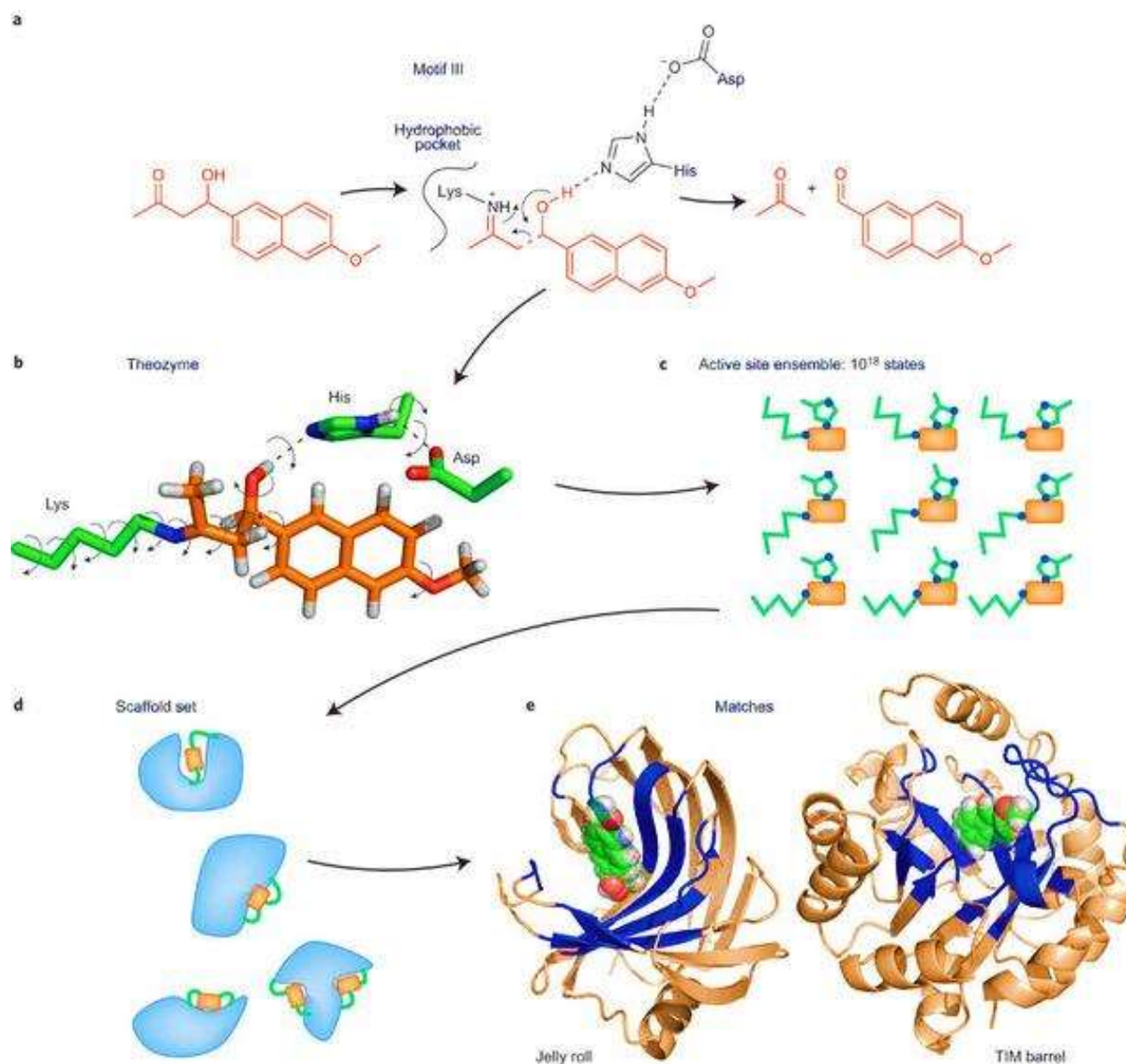
۳- گروه پروستتیک: نوع دیگری از مولکولهای آلی هستند که اگرچه ویتامین نیستند ولی جزئی غیرپروتئینی بوده و بعنوان بخشی از ساختار آنزیم می باشند. مثلاً مولکول هم (Heme) در ساختار آنزیمهای سیتوکروم اکسیداز. این گروهها بیشتر اوقات در کنار فلزاتی مثل مس و آهن نقش اصلی کاتالیز واکنش آنزیمی را بهعهده دارند.

یک آنزیم کامل (Holoenzyme) معمولاً از این اجزاء تشکیل یافته است: جزء دارای فعالیت آنزیمی که جایگاه فعال روی آن قرار دارد (Apoenzyme)، کوآنزیم یا کوفاکتور و یا هردو. شکل زیر را ملاحظه کنید.



اگر جایگاههای فعال یک آنزیم را از جنبه مولکولی بررسی کنیم مشاهده خواهیم کرد که در جایگاه فعال آنزیم (یعنی محلی که سوبسترا را به فراورده تبدیل می کند) گروههای فعال (مثلاً اسیدی، بازی، فنلی، تیولی، و...) وجود دارند که می توانند با گروههای فعال یا حتی غیرفعال مولکولهای سوبسترا واکنش داده و پیوندهای آنها را بشکنند یا پیوندهای جدید تشکیل دهند. در واقع این واکنشها همانند واکنشهای اسیدی-بازی هستند.

فعالیت: شکل زیر را بدقت بررسی کنید و توضیح دهید که چه نتیجه ای از این شکل می گیرید (فقط کلیات واکنش را در نظر بگیرید):



همانطور که در شکل بالا مشاهده می کنید واکنش جایگاه فعال آنزیم یک واکنش شیمیایی است لذا شرایط محیطی می تواند روی آن اثر بگذارد. مثلاً تغییرات دما می تواند میزان یونیزاسیون گروههای فعال را بیشتر کند. یا pH محیط می تواند آمینواسید را به سمت pH ایزوالکتریک ببرد، یا یک گروه را خنثی کند یا یک گروه را یونیزه کند.

مهار کننده ها: برخی مولکولها می توانند با جایگاه فعال آنزیم یا جایگاههای دیگر روی آنزیم واکنش داده و آنزیم را از کار ببندازند. به این مولکولها مهار کننده (Inhibitor) گفته می شود. مثلاً گازهای جنگی و شیمیایی مورد استفاده در جنگ باعث مهار برخی آنزیمها می شوند. یا سموم دارای فسفر آلی (سموم ارگانوفسفره) که در کشاورزی کاربرد دارند باعث مهار برخی آنزیمهای بدن می شوند. هر قدر غلظت مهار کننده ها بیشتر باشد میزان فعالیت مقدار مشخصی از آنزیم کمتر خواهد شد.

هر قدر غلظت آنزیم بیشتر باشد، در یک مدت زمان مشخص، تعداد مولکولهای سوبسترای بیشتری را می تواند به فراورده تبدیل نماید. لذا برای مقدار مشخصی از آنزیم میزان فعالیت بیشتری را مشاهده خواهیم نمود.

هر قدر غلظت سوبسترا بیشتر باشد در یک مدت زمان مشخص، برای مقدار مشخصی از آنزیم میزان فعالیت بیشتری را مشاهده خواهیم نمود تا اینکه تمام مولکولهای آنزیم اشباع شده و دیگر با افزودن مقدار سوبسترای بیشتر افزایش فعالیت مشاهده نخواهد شد.

با افزایش دما فعالیت آنزیم بالا می رود زیرا انرژی جنبشی مولکولها بیشتر شده و بهتر می توانند با آنزیم برخورد نموده و واکنش دهند لیکن اگر دما از حدی معین برای آنزیم بالاتر برود دنا توره شده یا فعالیت آن کم می شود لذا برای هر آنزیمی یک محدوده دمای بهینه (Optimum) تعریف می کنند (محدوده دمایی که در آن محدوده آنزیم بیشترین میزان فعالیت را دارد).

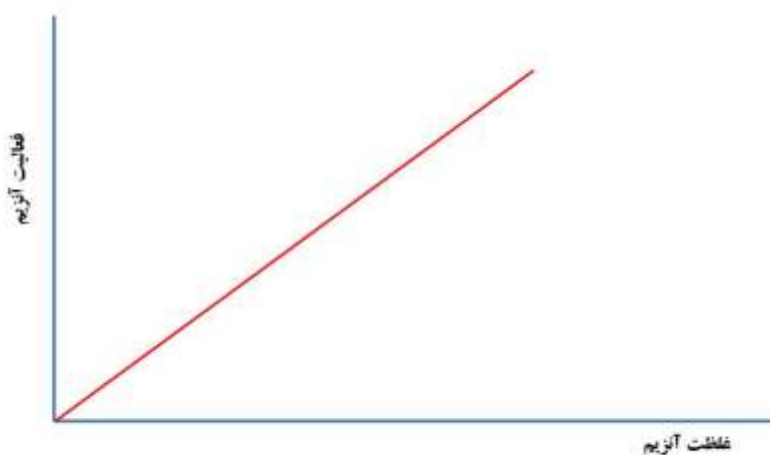
در مورد pH نیز شبیه به دما یک محدوده pH بهینه برای هر آنزیم تعریف می شود؛ یعنی محدوده ای از pH که در آن آنزیم بیشترین میزان فعالیت را دارد.

آنزیمها برای اینکه بتوانند فعالیت خود را بخوبی انجام دهند باید در شرایط مناسب قرار گرفته باشند.

برای بررسی فعالیت آنزیمها در لوله آزمایش هم آنزیم و هم سوبسترا قرار می دهیم. همه شرایط جز یکی را ثابت می گیریم. سپس اثر شرایط متغیر روی آنزیم مشخص می گردد.

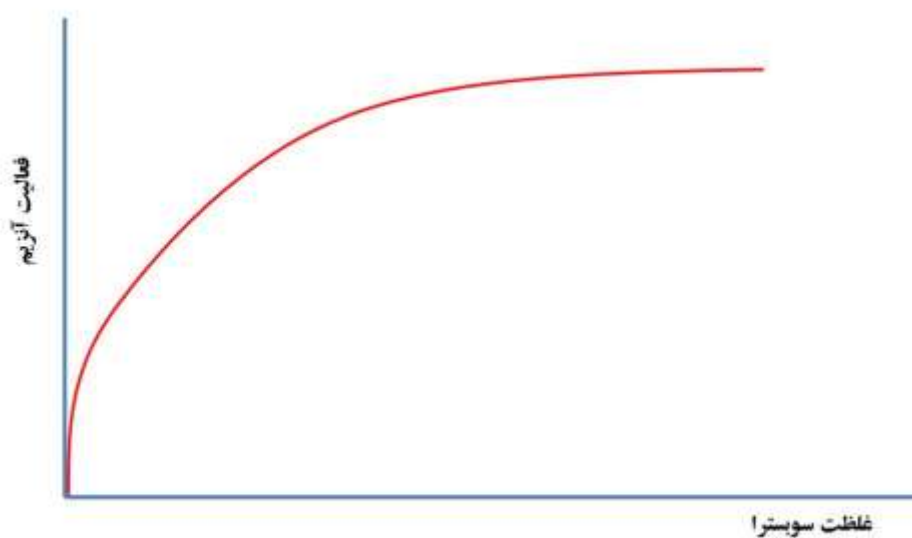
بطور کلی شرایطی که بر فعالیت آنزیمها تاثیر می گذارند عبارتند از:

۱- غلظت آنزیم (Enzyme Concentration)



با افزایش غلظت آنزیم میزان فعالیت آن در محلول واکنش افزایش می یابد

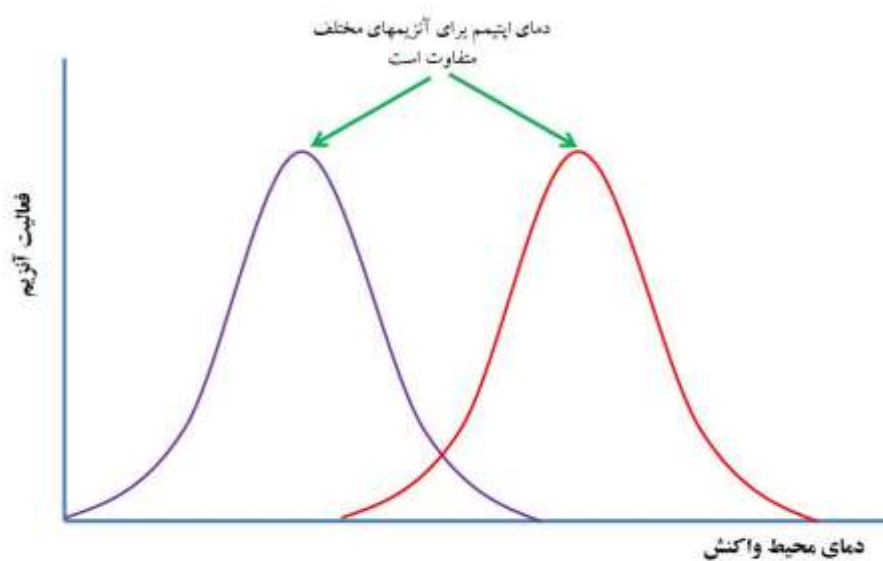
۲- غلظت سوبسترا (Substrate Concentration)



با افزایش غلظت سوبسترا فعالیت آنزیم در محیط واکنش افزایش می یابد تا جاییکه تمام آنزیمها اشباع شوند

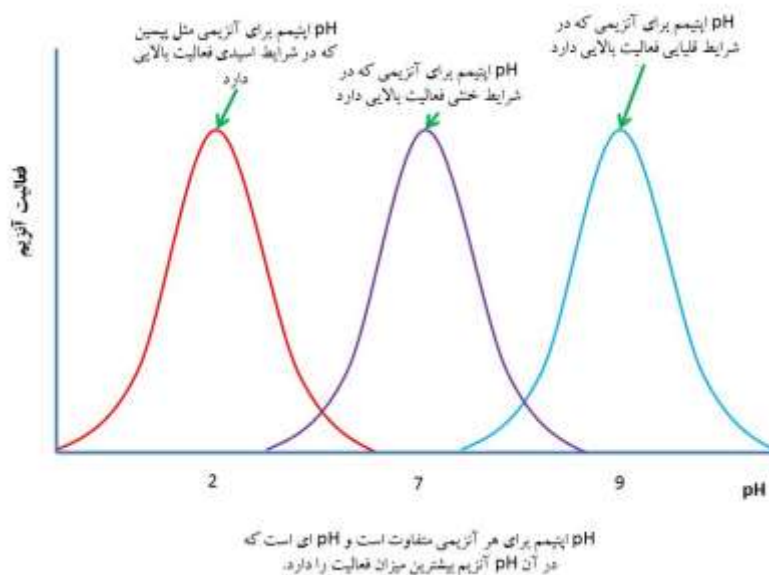
۳- مهارکننده ها (Inhibitors)

۴- دما (Temperature)



دمای اپتیم برای هر آنزیمی متفاوت است و دمایی است که در آن دما آنزیم بیشترین میزان فعالیت را دارد.

pH-۵



فعالیت‌های عملی

برای بررسی شاخصهای فعالیت آنزیمی عموماً از مثال آنزیم آمیلاز بزاق استفاده می‌شود؛ آنزیم آمیلاز نشاسته را تجزیه و به واحدهای سازنده اش، یعنی گلوکز تبدیل می‌کند. لیکن می‌توان از آنزیمهای دیگر نیز بهره برد. در مثالهای زیر ما از آنزیم گلوکز اکسیداز موجود در کیت‌های تجاری سنجش گلوکز استفاده نموده‌ایم. آنزیم گلوکز اکسیداز گلوکز را اکسید نموده و واکنش کامل آن در روش سنجش گلوکز، پیش از این توضیح داده شده است (به مبحث سنجش گلوکز خون مراجعه نمایید).

اثر غلظت آنزیم:

۲ لوله آزمایش را انتخاب نمایید و با علائم A و B مشخص نمایید؛ درون لوله A مقدار ۲ میلی لیتر محلول گلوکز اکسیداز و درون لوله B ابتدا ۲ میلی لیتر آب مقطر ریخته، سپس ۵۰ میکرولیتر آنرا خارج کنید و به جای آن ۵۰ میکرولیتر محلول گلوکز اکسیداز بریزید (شما با اینکار آنزیم را در لوله B رقیق کرده‌اید). سپس ۲۰ میکرولیتر محلول استاندارد ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر گلوکز (که بصورت آماده در کیت‌های تجاری هست و یا اینکه می‌توانید آنرا با استفاده از پودر گلوکز خالص تهیه نمایید) به هر کدام از لوله‌ها اضافه نموده (سعی کنید سریع و تقریباً همزمان با هم گلوکز را اضافه نمایید) و تغییرات را در هر لوله مشاهده نمایید. در کدام لوله رنگ قرمز صورتی سریعتر تشکیل می‌شود؟ علت را توضیح دهید؟

اثر غلظت سوبسترا

۲ لوله آزمایش را با علامت A و B مشخص کنید. درون هر کدام از لوله ها ۲ میلی لیتر محلول گلوکز اکسیداز بریزید. به لوله A ۱۰۰ میکرولیتر محلول استاندارد گلوکز و به لوله B ۲۰ میکرولیتر محلول استاندارد گلوکز اضافه نمایید (سعی کنید محلول گلوکز را همزمان با هم به هر دو لوله اضافه نمایید). در کدام لوله رنگ قرمز صورتی سریعتر و شدیدتر ایجاد می شود؟ علت را توضیح دهید؟

اثر دما

تعداد ۳ لوله آزمایش را با علائم A، B و C مشخص کنید. در هر کدام از لوله ها مقدار ۲ میلی لیتر محلول آنزیمی گلوکز اکسیداز بریزید. سپس، لوله A را به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش، لوله B را درون ظرف حاوی یخ، لوله C را در محیط آزمایشگاه یا دمای ۳۷ درجه سانتی گراد (مشابه دمای بدن) نگه دارید. به هر کدام از لوله ها در همان حالی که در حمام آب جوش، ظرف یخ و محیط آزمایشگاه یا دمای ۳۷ درجه هستند مقدار ۲۰ میکرولیتر استاندارد گلوکز اضافه نمایید. چه تغییراتی را مشاهده می کنید؟ در کدام لوله رنگ قرمز صورتی سریعتر تشکیل می شود؟ و در کدام یک دیرتر؟ علت را توضیح دهید؟

اثر pH

تعداد ۳ لوله آزمایش را با علائم A، B و C مشخص کنید. درون هر کدام از لوله ها مقدار ۲ میلی لیتر محلول آنزیمی گلوکز اکسیداز اضافه نمایید. سپس، به لوله A مقدار ۱ میلی لیتر محلول اسید کلریدریک غلیظ و به لوله B مقدار ۱ میلی لیتر محلول سود ۲ نرمال اضافه کنید. به لوله C ۱ میلی لیتر آب مقطر اضافه کنید. در نهایت به هر کدام از لوله ها مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول استاندارد گلوکز اضافه نمایید. در هر کدام از لوله ها چه تغییری مشاهده می نماید؟ علت را توضیح دهید؟

اثر مهارکننده ها

بررسی اثر مهارکننده های آنزیم نیازمند آزمایشگاه تخصصی بیوشیمی آنزیم است. لیکن اثرات مهارکننده ها نیز مشابه آن چیزی خواهد بود که در مورد pH مشاهده نمودیم. در لوله A مربوط به اثر pH چنانچه pH محیط را خنثی کنیم و آنزیم بتواند به حالت قبل برگردد، واکنش صورت خواهد گرفت و قند اکسید می گردد. در خصوص مهارکننده ها نیز به همین شکل است؛ تا موقعی که مهارکننده در محیط باشد برای واکنش با آنزیم در رقابت با سوبسترا خواهد بود ولی با افزایش غلظت سوبسترا می توان اثر آنرا از بین برد. در مورد سایر مهارکننده ها پیشگویی کنید چه اتفاقی خواهد افتاد. به مطالب تئوری بحث بیوشیمی پزشکی مراجعه نموده و پیشگویی کنید انتظار چه اتفاقی را خواهید داشت؟

کروماتوگرافی (رنگ نگاری) (Chromatography)

کروماتوگرافی یکی از مهمترین و به جرأت می توان گفت پرکاربردترین روش جداسازی مواد مختلف از یک مخلوط یا محلول است. روش کروماتوگرافی توسط یک گیاه شناس روسی، بنام میخائیل سمینوویچ تیسوت (Mikhail Semenovich Tsvett) اختراع شد. تیسوت در کشور لهستان برای جداسازی مخلوط رنگدانه های گیاهان، که از نظر شیمیایی بسیار شبیه به هم هستند، کروماتوگرافی را اختراع نمود. امروزه از این روش برای جداسازی و اندازه گیری مولکولهای مختلف استفاده می شود. در آزمایشگاههای تشخیص طبی انواعی از این روش برای سنجش هموگلوبینهای مختلف استفاده می شوند. همچنین برای جداسازی اسیدهای نوکلئیک و آزمایشگاههای مولکولی از این روش استفاده می شود.

اساس کروماتوگرافی:



Mikhail Semenovich
Tsvett

به زبان ساده کروماتوگرافی روشی است که در آن دو فاز وجود دارد که یکی ثابت بوده و دیگری متحرک است. فاز ثابت همانند غربالی می ماند که با عبور فاز متحرک مولکولهای موجود در فاز متحرک می توانند غربال شوند. لذا سرعت حرکت هر مولکول می تواند متناسب با وزن مولکولی آن یا میزان و نوع بار الکتریکی آن یا میزان تمایل آن به فاز ثابت متفاوت باشد. به این شکل مولکولهایی که شرایط متفاوت داشته باشند از یکدیگر جدا می شوند. یکی دیگر از علل جداسازی مولکولها تفاوت میزان حلالیت آنها در دو فاز متفاوت است؛ در کروماتوگرافی حلالهای متفاوتی استفاده می شود لذا مواد براساس میزان حلالیتشان در هر کدام از حلالها به نسبتهای متفاوتی حرکت می کنند.

تفاوت سرعت حرکت مولکولهای مختلف موجب حرکت سریعتر برخی مولکولها و حرکت آرامتر برخی دیگر می شود.

نکته: در کروماتوگرافی میزان حلالیت مواد در حلالهای مختلف، اندازه مولکولها، بار الکتریکی مولکولها، pH محیط، دمای محیط، شرایط ستون یا جداری که مولکولها روی آن حرکت می کنند، میزان تمایل مولکولهای در حال حرکت به مولکولهایی که در فاز ساکن قرار دارند و عواملی از این قبیل می توانند نقش داشته باشند.

بدیهی است پس از جداسازی باید با شناساگرهای مناسب هر مولکول را شناسایی نمود. مثلاً اگر مولکول چربی جدا شده باشد می توان اشباع یا غیراشباع بودن آن را مشخص نمود. یا اگر قند جدا شده باشد می توان آنرا تعیین هویت نمود. برای سایر مولکولها نیز به همین شکل است.

اصول انواع روشهای کروماتوگرافی

کروماتوگرافی را می توان براساس نوع فازهای متحرک و ساکن، یا براساس نوع مولکولها یا نوع واکنش مولکولهایی که جدا می شوند یا مکانیسم جداسازی مولکولها تقسیم بندی نمود. یک نوع تقسیم بندی ساده در زیر آمده است که بر مبنای نوع فازهای متحرک و ساکن است:

• کروماتوگرافی مایع - جامد: شامل انواع؛

۱. کروماتوگرافی جذب سطحی
۲. کروماتوگرافی لایه نازک
۳. کروماتوگرافی تبادل یونی
۴. کروماتوگرافی ژلی

• کروماتوگرافی گاز - جامد

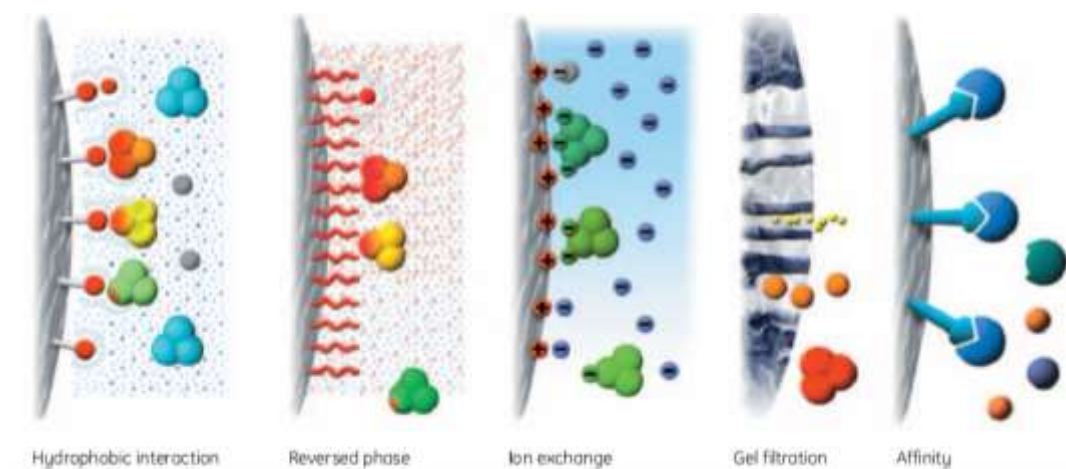
• کروماتوگرافی مایع - مایع

۱. کروماتوگرافی تقسیمی
۲. کروماتوگرافی کاغذی

• کروماتوگرافی گاز - مایع

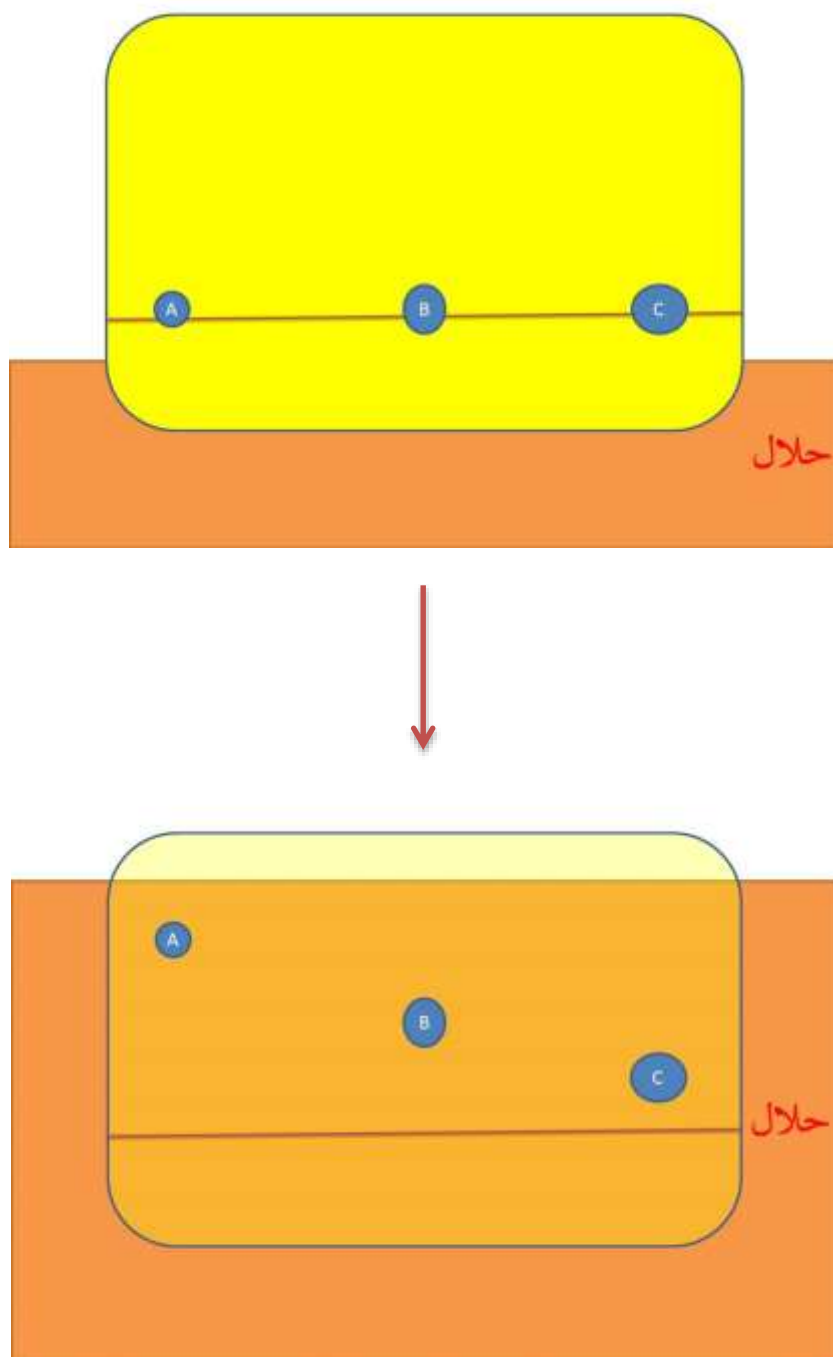
۱. کروماتوگرافی گاز - مایع
۲. کروماتوگرافی ستون موئین

اساس برخی از انواع کروماتوگرافی در شکل زیر نشان داده شده اند:



در نظر بگیرید طبق شکل زیر روی یک کاغذ صافی مولکولهای A، B و C را قرار داده ایم. سپس کاغذ را در محلول بافری مناسبی گذارده و اجازه می دهیم تا بافر حرکت کند و به سمت بالای بیاید. همانطور که می دانید ساختار کاغذ صافی همانند غربال و لوله های موئینه می ماند که مایعات طبق خاصیت موئینه می توانند از این ساختارها بالا بیاند و کاغذ را خیس کنند. همزمان با حرکت مایع به سمت بالا مولکولهایی نیز که در مسیر حرکت مایع هستند با توجه به میزان حلالیتشان و با توجه به اندازه و وزن مولکولیشان و سایر عوامل حرکت نموده و بالا می آیند. اما این میزان حرکت برای هر مولکول متفاوت است. پس از گذشت مدت زمان مشخصی (یعنی مدت زمانی که مایع یا همان حلال بخوبی روی کاغذ صافی بالا آمده باشد) می توان این میزان حرکت را محاسبه نمود. این میزان حرکت را Rate of flow یا میزان جریان می گویند و بصورت R_f نشان میدهند و برابر است با فاصله حرکت جسم از مبدأ تقسیم بر فاصله حرکت حلال از مبدأ:

$$R_f = \frac{\text{فاصله حرکت جسم از مبدأ}}{\text{فاصله حرکت حلال از مبدأ}}$$



با اندازه گیری میزان R_f مولکولهای مختلف می توان آنها را شناسایی نمود.

بدیهی است اگر در کنار نمونه های مجهول نمونه هایی که می دانیم ماهیتشان چیست قرار دهیم به این شکل می توانیم مولکولهای مجهول را شناسایی کنیم و یا حداقل حدس بزنیم که باید دنبال چه چیزی باشیم. هر قدر R_f دو مولکول بیشتر بهم نزدیک باشد احتمال تشابه آنها بیشتر است.

کروماتوگرافی کاغذی اسیدهای آمینه:

مواد مورد نیاز:

۱- تانک کروماتوگرافی و درپوش آن (می توان از یک بشر ۵۰۰ میلی لیتری و ورق آلومینیوم بعنوان درپوش استفاده نمود)

۲- کاغذ کروماتوگرافی

۳- نمونه های آمینواسیدهای معلوم و مجهول

۴- حلال: شامل بوتان ۱-۱-آل: استیک اسید: آب به نسبت های ۳:۱:۱

۵- سینی فلزی برای قرار دادن در آون

۶- مداد و خط کش، دستکش مناسب

۷- محلول معرف نین هیدرین

۸- آون ۱۰۰ درجه سانتی گراد

توجه: حتی الامکان لبه های کاغذ کروماتوگرافی را بگیرید و از دست زدن به صفحه وسط جداً خودداری نمائید.

با استفاده از مداد حدود ۱/۵ سانتی متر از لبه پائین کاغذ کروماتوگرافی را همانند شکل مثال بالا خط کشی نمائید. سپس در فواصل ۲ سانتی متری تعداد ۴ جایگاه با نقطه مشخص کنید.

با استفاده از پیتتهای موئینه نمونه های آمینواسید معلوم را روی جایگاههای مشخص شده علامتگذاری کنید. نمونه مجهول را نیز در جایگاهی که علامتگذاری نموده اید قرار دهید. سپس اجازه دهید تا اثر آنها کاملاً خشک شود. بهتر است کار نمونه گذاری در جایگاههای قبلی را تکرار کنید تا مقدار بیشتری آمینواسید روی کاغذ قرار گیرد. اگر این کار را تکرار کردید مجدداً اجازه دهید کاغذ کاملاً خشک شود.

فراموش نکنید که جایگاههای علامتگذاری شده را با مداد مشخص نمایند که مربوط به کدام آمینواسید است.

پس از خشک شدن، لبه های کاغذ را بسورت لب به لب در کنار هم قرار داده و استوانه نمائید و با چسب کاغذی فیکس کنید.

در بشر آماده شده برای انجام کروماتوگرافی تا سطح ۱ سانتی متر حلال بریزید و انتهای کاغذ را همانند شکل مثال بالا در حلال بصورت ایستاده قرار دهید.

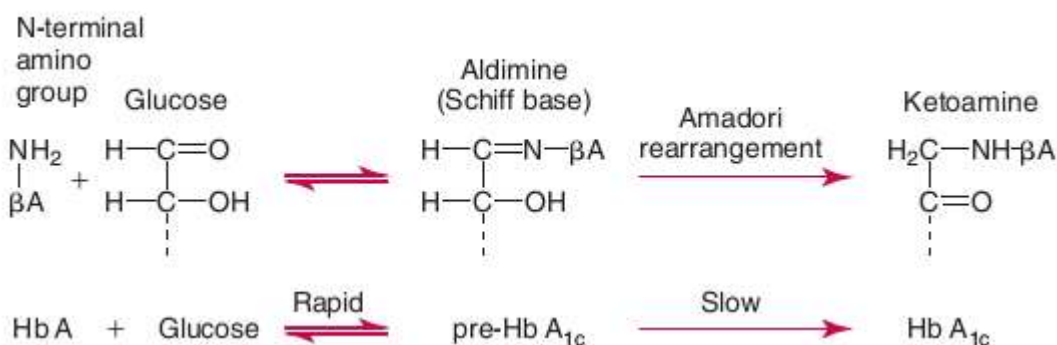
درب بشر را با استفاده از ورق آلومینیومی کاملاً بپوشانید. این کار بسیار ضروری است زیرا باید محیط درون بشر از بافر اشباع شود. حدود ۱ ساعت زمان بگیرید تا بافر به سطح نزدیک به انتهای کاغذ صافی برسد.

سپس کاغذ را از بشر خارج کرده و دو لبه انتهایی که اثر حرکت بافر روی آن مانده است را کاملاً مشخص نموده و با مداد علامت بزنید. سپس با استفاده از اسپری نین هیدرین کاغذ را آغشته به نین هیدرین نموده و در آون خشک نمائید.

مقدار R_f را برای هر آمینواسید مشخص کنید و بر اساس آن پیشگویی کنید که نمونه آمینواسید مجهول شما احتمالاً چه بوده است.

سنجش هموگلوبین A₁ گلیکه (هموگلوبین متصل به قند) با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی

گلبولهای قرمز انسان حدود ۹۰ الی ۱۲۰ روز عمر می کنند. همانطور که می دانیم گلبولهای قرمز کیسه های پر از هموگلوبین هستند که در بیشتر افراد بیش از ۹۷ درصد از هموگلوبین از نوع هموگلوبین A₁، و مقدار کمتری هموگلوبینهای A₂ و F هستند. هموگلوبین A₁ خود دارای ۳ نوع متفاوت است که عبارتند از: HbA_{1a}، HbA_{1b} و HbA_{1c} که مقدار HbA_{1c} به نسبت دو نوع دیگر بیشتر است. در جریان خون حدود ۵ درصد از هموگلوبین موجود در گلبولهای قرمز می تواند بصورت غیر آنزیمی گلیکه شود، یعنی مولکول گلوکز از طریق کرین آلدئیدی خود به انتهای آمین پروتئین هموگلوبین (زنجیره β) متصل گردد. این واکنش بصورت خودبخودی و به شکل زیر رخ می دهد. هر قدر غلظت گلوکز خون بیشتر باشد مقدار بیشتری HbA₁ می تواند به گلوکز متصل گردد. هموگلوبین متصل شده به گلوکز را هموگلوبین گلیکه (Glycated hemoglobin) می گویند. اتصال گلوکز به هموگلوبین هر چند خودبخودی صورت می گیرد لیکن اتصال برگشت ناپذیر است و تاموقعی که هموگلوبین تخریب نشود (یعنی تا زمانی که طول عمر گلبول قرمز به اتمام نرسد)، این اتصال باقی می ماند.



از آنجا که عمده هوگلوبین موجود در گلبولهای قرمز از نوع هموگلوبین A₁ است، و از آنجا که طول عمر گلبولهای قرمز می تواند بین ۹۰ الی ۱۲۰ روز در انسان متغیر باشد، لذا، از سنجش هموگلوبین گلیکه A₁ (HbA_{1c}) برای ارزیابی تغییرات غلظت قند خون طی حدوداً دو الی سه ماه گذشته (یعنی تقریباً حدود طول عمر اغلب گلبولهای قرمز) در فرد استفاده می شود.

چنانچه فرد مبتلا به دیابت طی حدود ۳ ماه گذشته رژیم مصرف قند یا تزریق انسولین خود را رعایت نکرده باشد یا به هر علتی غلظت قند خون او بیش از حد بالا رفته باشد، سنجش HbA_{1c} کمک می کند تا پزشک معالج او تصمیم صحیح تری برای ادامه روند درمان بگیرد.

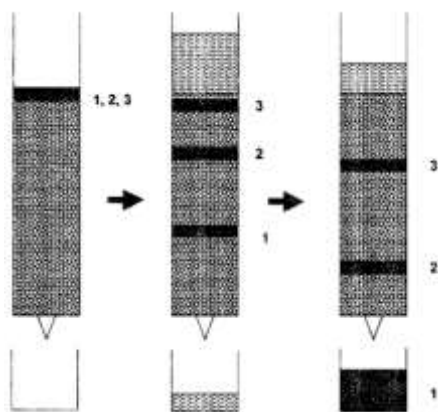
روش سنجش هموگلوبین گلیکه (HbA_{1c})

امروزه روشهای متنوعی برای سنجش این ماده وجود دارند که از این بین می توان به روشهای کروماتوگرافی تعویض یونی، کروماتوگرافی تمایلی، الکتروفورز، ایزوالکتریک فوکوسینگ و ایمنواسی اشاره نمود. از بین روشهای مذکور روش کروماتوگرافی تعویض یونی را شرح خواهیم داد؛ این روش امروزه در اغلب آزمایشگاههای ایران کاربرد فراوان دارد و روشهای دیگر کمتر بکار برده می شوند.

کروماتوگرافی تعویض یونی (Ion-Exchange Chromatography) برای جداسازی HbA_{1c}:

مولکولهای هموگلوبین را می توان براساس شارژ الکتریکی که دارند از یکدیگر جداسازی نمود. در این روش ابتدا مقداری خون از فرد گرفته می شود و در ظرف حاوی ماده ضدانعقاد ریخته می شود. سپس، گلبولهای قرمز فرد را با استفاده از یک محلول ایزوتونیک سه بار شستشو داده و سپس غشاء گلبولهای قرمز، که کیسه های پر از هموگلوبین هستند، تخریب می شوند تا هموگلوبین بیرون بریزد. سپس با استفاده از یک روش کروماتوگرافی تعویض یون و با استفاده از بافرهای مناسب در هر مرحله مولکولهای هموگلوبین HbA_{1c} را از سایر هموگلوبین ها جدا می کنند و درصد آنرا تعیین می کنند.

هموگلوبین های آزاد شده در محلول بافری قرار دارند که باعث می شود بار الکتریکی آنها مثبت باشد (کاتیون). لذا، آنها را وارد ستونی کروماتوگرافی می کنند که از جنس رزین خاصی با شارژ الکتریکی منفی بوده و فاز ثابت ستون کروماتوگرافی را تشکیل می دهد. به این شکل بار مثبت کاتیونها (هموگلوبین ها) باعث اتصال انواع هموگلوبین به ستون می شود، لیکن چون انواع هموگلوبین دارای بار الکتریکی متفاوتی هستند لذا، قدرت اتصال آنها به اجزاء دارای بار منفی در ستون کروماتوگرافی متفاوت است؛ چنانچه در مرحله بعد بافری استفاده شود که بتواند HbA_{1c} را جدا کند ولی مابقی انواع HbA باقی بمانند، به این شکل با سنجش جذب نوری محلول بافری که هموگلوبین را می شوید و و از ستون جدا می کند، می توان درصد یک نوع از HbA ها را نسبت به انواع دیگر سنجید. درعمل فقط HbA_{1c} را جدا می کنند و جذب نوری آنرا با جذب نوری همان محلول همولیزات (محلولی که پس از شستشوی گلبولهای قرمز) مقایسه نموده و درصد HbA_{1c} را نسبت به کل محتوای هموگلوبین می سنجند.



در شکل روبرو بطور شماتیک روش جداسازی یک مولکول از ترکیبی چند مولکول با استفاده از ستون نشان داده شده است. همانطور که در شکل مشاهده می شود، مولکول شماره ۱ از دو مولکول دیگر جدا شده است.

روش کار

الف- همولیز کردن نمونه:

برای انجام آزمایش از کیت‌های تجاری موجود می‌توان استفاده نمود که بصورت ستون‌های حاوی رزین مخصوص (دی اتیل آمینواتیل DEAE) می‌باشند. در این تست ما از کیت **شرکت درمان کاو** استفاده نموده‌ایم. چنانچه از کیت‌های تجاری شرکت‌های دیگر استفاده می‌کنید، طبق دستورالعمل روش کار همان کیت مراحل را انجام دهید.

مقدار ۵۰ میکرولیتر از خون تهیه شده روی ضدانعقاد EDTA یا هپارین را با ۲۵۰ میکرولیتر از یک بافر هیپوتونیک (شماره ۱) (بافری که بتواند غشاء گلبول‌های قرمز را تخریب کند) در یک لوله آزمایش تمیز مخلوط می‌نمائیم و اجازه می‌دهیم تا کاملاً همولیز گردد.

ب- اندازه‌گیری هموگلوبین تام (HbTotal):

به ۱۲ میلی لیتر بافر همولیز کننده نمونه ۵۰ میکرولیتر از نمونه همولیز شده افزوده و مخلوط می‌کنیم و در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل بلانک آب مقطر جذب آنرا اندازه‌گیری می‌نمائیم و ثبت می‌کنیم.

ج-تهیه ستون کروماتوگرافی:

۱- درب بالایی ستون را برداشته و نوک انتهایی آنرا بشکنید و آنرا درون لوله‌ای قرار دهید تا بافر درون آن خارج شود (این ستونها را می‌توانید خودتان نیز بسازید لیکن کار با ستونهای تجاری برای افراد مبتدی نتیجه بهتری بدنبال دارد). این ستونها دارای موادی مانند دی اتیل آمینواتیل هستند که یکی از انواع رزینهای تعویض یون است. شکل تعویض یون (Ion Exchange) را در مباحث قبل ملاحظه بفرمائید.

۲- در قسمت بالای ستون آماده مصرف فیلتری قرار دارد که محل قرار دادن نمونه همولیزات است. مقدار ۵۰ میکرولیتر از نمونه همولیزات روی آن بریزید و اجازه بدهید تا کاملاً پائین بیاید و با رزین بخوبی واکنش دهد.

۳- مقدار ۲۰۰ میکرولیتر بافر شستشو دهنده ستون هموگلوبینهای HbA_a و HbA_b (که توسط شرکت سازنده تهیه شده و باعث می‌شود تا هموگلوبین بخوبی با بارهای منفی ستون واکنش دهد) به ستون بیافزائید و اجازه بدهید کاملاً جذب ستون شود

۴- مقدار ۲ میلی لیتر از بافر شستشو (شماره ۲) به ستون بیافزائید و ستون را با آن شستشو دهید تا محلول به سطح رزین برسد و تا اینجا کلیه محلولهای خارج شده از ستون را دور بریزید. تا این مرحله هموگلوبینهای HbA_a و HbA_b از ستون خارج شده‌اند و HbA_{1c} متصل به ستون باقی مانده است.

۵- مقدار ۴ میلی لیتر از بافر شماره ۳ به ستون بیفزائید و محلول زیر ستون را که حاوی HbA_{1c} می باشد در یک لوله جمع آوری نمائید. لازم است اجازه دهید تا همه محلول از ستون خارج گردد.

۶- جذب نوری محلول حاصل را در موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل آب مقطر بسنجید. این میزان جذب مربوط به HbA_{1c} است.

۷- برای محاسبه درصد HbA_{1c} از فرمول زیر استفاده نمائید:

$$HbA_{1c} = \frac{OD_{Hb\ A1c}}{OD_{Hb\ Total}} \times \frac{4\ ml}{12\ ml} \times 100$$

به این شکل درصد هموگوبین گلیکوزیله محاسبه خواهد شد.

مقادیر نرمال HbA_{1c} در افراد غیردیابتی بین ۴ الی ۶ درصد است؛ در افرادی که دیابت خود را کنترل نموده اند این مقدار بین ۶ الی ۶/۵ درصد است؛ کسانی که به حد متوسط قند خود را کنترل نموده اند و باید مراقبت کنند مقدار HbA_{1c} آنها حدود ۶/۵ الی ۸ درصد است؛ و کسانی که کنترل خوبی روی قند خود نداشته اند HbA_{1c} آنها ممکن است به بیش از ۸ درصد نیز برسد.

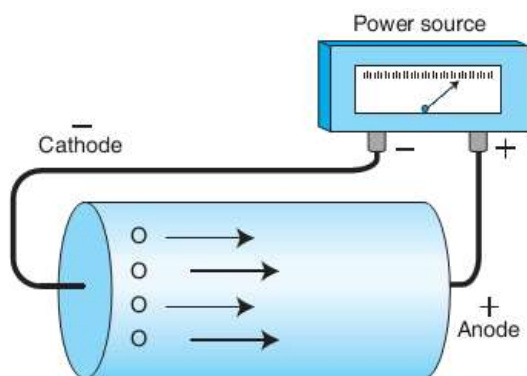
بطور کلی این آزمایش نمونه ای از یک روش کروماتوگرافی در آزمایشگاه بیوشیمی بالینی است که بر مبنای تعویض یون سورت می گیرد.

توجه داشته باشید که این روش به دما حساس بوده و چون اساس آن مبتنی بر تعویض یون است لذا، تغییرات دمایی می تواند با واکنش بیشتر یا کمتر یونها با ستون همراه باشد.

الکتروفورز (Electrophoresis)

الکتروفورز به حرکت ذرات باردار در میدان الکتریکی گفته می‌شود. از این روش برای جداسازی، شناسایی و تعیین مقدار مولکولهای بزرگ و کوچک می‌توان استفاده نمود. امروزه انواع بسیار زیادی روشهای الکتروفورز وجود دارند که هر کدام مبتنی بر اساس و اصول خاصی طراحی شده است. مثلاً برخی از روشهای الکتروفورز مبتنی بر جداسازی مولکولها با استفاده از میزان بار الکتریکی آنها، یا مبتنی بر وزن مولکولی آنها، یا با استفاده از pH ایزوالکتریک آنها می‌باشد.

شکل روبرو اصول کلی الکتروفورز را نشان می‌دهد:

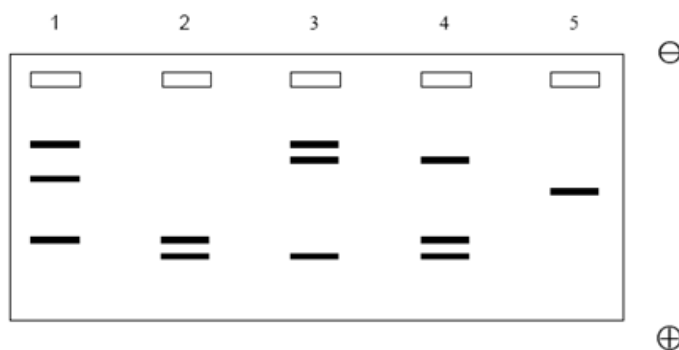


اسیدهای آمینه، پپتیدها و پروتئینها، لیپوپروتئینها، RNA و DNA از جمله ملکولهایی هستند که با روش الکتروفورز می‌توان جداسازی نمود. در این روش نمونه محتوای ماده مورد نظر را روی بستر آغشته به بافر مناسب قرار می‌دهند؛ جنس این بستر می‌تواند استات سلولز، ژل آگارز، ژل پلی آکریل آمید یا موادی از این قبیل باشد که انتخاب هر کدام از اینها بستگی دارد به ماهیت مولکول مورد نظر و اساس جداسازی مولکولها. پس از نمونه گذاری روی بستر مناسب جریان الکتریکی برقرار می‌گردد که این جریان موجب حرکت مولکولها شده و مولکولهای مختلف از یکدیگر جدا می‌شوند. جریان الکتریکی توسط منبع تغذیه الکتریکی که جریان مستقیم را برقرار می‌کند تامین می‌شود؛ چنانچه در این میدان الکتریکی مولکولهای دارای بار الکتریکی خالص مثبت موجود باشند، به سمت قطب منفی حرکت می‌کنند؛ آنها که دارای بار الکتریکی خالص منفی هستند به سمت قطب مثبت می‌روند؛ آنها که بار الکتریکی خالص صفر دارند، حرکت نکرده و سر جای شان می‌مانند. pH بافر محیط الکتروفورز طوری تنظیم شده باشد که همه مولکولها دارای بار الکتریکی منفی باشند، همگی به سمت قطب مثبت و چنانچه همگی دارای بار الکتریکی خالص مثبت باشند همگی به سمت قطب مثبت می‌روند لیکن تعداد بارهای الکتریکی مثبت و منفی در این حالت حائز اهمیت و تعیین کننده سرعت مولکولهاست. هر قدر تعداد بار الکتریکی خالص یک مولکول بیشتر باشد سرعت حرکت آن نیز بیشتر است. با عنایت به اینکه بسیاری از مولکولهای مورد نظر ما تعداد بار الکتریکی خالصشان با هم فرق دارد، لذا، تعداد زیادی از مولکولها را به این شکل می‌توان از یکدیگر جداسازی نمود.

گاهی اوقات از موادی استفاده می‌شود که باعث می‌گردد مولکولها همگی دارای بار الکتریکی تقریباً یکسان باشند، سپس آنها را در میدان الکتریکی قرار می‌دهند؛ در این حالت چون همگی دارای بار الکتریکی مشابه هستند، بر مبنای وزن مولکولیشان از یکدیگر جداسازی می‌شوند؛ در واقع در این روش تاثیر بار الکتریکی بر فرایند جداسازی، از بین رفته است.

در سایر انواع روشهای الکتروفورز نیز برای جداسازی مولکولهای مورد نظر یکی از شاخصها (pH، بار خالص الکتریکی، وزن مولکولها) تاثیرگذار خواهد بود و اثر مابقی شاخصها حذف می گردد. به این شکل می توان مولکولهای مختلف را از یکدیگر تفکیک و شناسایی نمود.

پس از جداسازی مولکولها عموماً بیشتر مولکولها بی رنگ یا خیلی کم رنگ هستند؛ لذا، برای مشاهده بهتر و سنجش مقدار آنها، از روشهای رنگ آمیزی هر نوع مولکول خاص استفاده می کنند. مثلاً برای رنگ آمیزی پروتئینها از رنگهای شیمیایی استفاده می کنند که باعث می شوند پروتئینها رنگ گرفته و واضح شوند؛ در مرحله بعد نیز رنگهای اضافی را با استفاده از حلالهای خاصی پاک می کنند؛ نتیجه کار بطور شماتیک در شکل زیر نشان داده شده است که در آن در هر ستون، همانطور که مشاهده می کنید، چند پروتئین از یکدیگر جداسازی شده اند. در شکل زیر اگر فرض کنیم پروتئین موجود در ستون شماره ۵ وزن مولکولی مشخص داشته باشد، و نمونه استاندارد محسوب گردد، پروتئینهایی که بعد از جداسازی توسط الکتروفورز، در سایر ستونها، مقابل این خط قرار گیرند، مشابه این پروتئین هستند. همین روش را می توان برای DNA، RAN یا سایر بیومولکولها، بویژه ماکرومولکولها، بکار برد.



کاربرد الکتروفورز در تشخیص بیماریها

امروزه روش الکتروفورز در آزمایشگاههای تشخیص طبی و تحقیقاتی علوم پزشکی جزء روشهای بسیار پر کاربرد می باشد. پس از جداسازی و شناسایی بیومولکولها با استفاده از روش الکتروفورز می توان وجود یا عدم وجود بیومولکول خاصی را مشاهده نمود؛ یعنی می توان مشاهده کرد آیا مولکول مورد نظر ساخته شده است؟ آیا مقدار آن کافی می باشد؟ آیا بیش از حد طبیعی افزایش نیافته است؟

آیا درصد انواع مختلف آن پروتئین (ایزوآنزیمها و ایزوفرمها) کم و زیاد نشده اند؟

در ادامه روش الکتروفورز پروتئینهای سرم که جزء پرکاربردترین روشهای الکتروفورز در آزمایشگاههای تشخیص طبی است را بر مبنای دستورالعمل کیت تجاری شرکت Helena توضیح خواهیم داد. سپس، مثالهایی از بیماریها را جهت تبیین ارزش انجام روش الکتروفورز را ذکر می‌کنیم.

تهیه نمونه جهت الکتروفورز پروتئینهای سرم

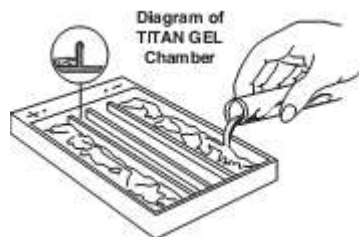
پروتئینهای سرم دارای انواع بسیار زیاد هستند که این انواع نیز دارای غلظت‌های مختلف می‌باشند. تغییرات انواع یا درصد پروتئینهای خون گاهی اوقات در شناسایی بیماریها کمک کننده است. لذا، در مواردی که لازم باشد تا نسبت پروتئینهای خون تعیین گردند، بیمار به آزمایشگاه تشخیص طبی مراجعه نموده و پس از خونگیری از او سرم خون با استفاده از سانتریفوژ جدا می‌شود. سرم جدا شده برای آزمایش الکتروفورز بکار می‌رود. روش زیر را برای مایع مغزی نخاعی و ادرار نیز می‌توان استفاده نمود لیکن باید این قبیل نمونه‌ها را تغلیظ کرد.

۱) آماده سازی ژل استات سلولز: ابتدا بافر الکتروفورز آماده مصرف، که از نوع



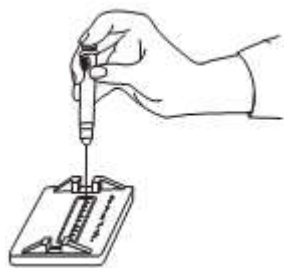
سیستم بافری باریتورات است، طبق دستورالعمل کیت آماده می‌نمائیم (پودر بافر را در بالن حجمی ریخته و آنرا به حجم یک لیتر می‌رسانیم). مقداری از بافر را درون ظرف مناسبی ریخته و ژل از لبه‌ها گرفته، در راک مخصوص ژل قرار داده و آنرا به مدت ۲۰ دقیقه در بافر غوطه ور سازید (طبق شکل روبرو).

۲) آماده سازی اتاقک الکتروفورز: به مقدار مناسب (حدود ۱۰۰ میل لیتر)

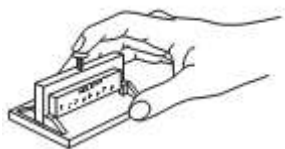


بافر تهیه شده را نیز در دو طرف اتاقک مخصوص الکتروفورز می‌ریزیم (مانند شکل روبرو).

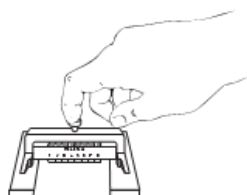
۳) آماده سازی نمونه: نمونه‌های سرم بیماران را در چاهک‌های مخصوص توزیع می‌کنیم.



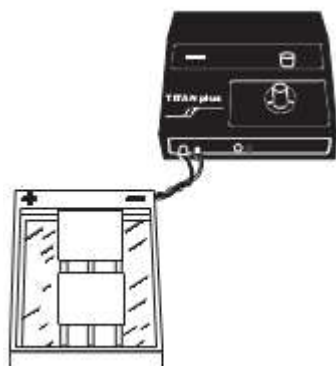
۴) **نمونه برداری:** با استفاده از سمپلر مخصوص، نمونه برداری انجام می دهیم (طبق شکل)



۵) **نمونه گذاری روی ژل:** ژل مرطوب شده را از ظرف بافر خارج نموده و در جایگاه نمونه گذاری قرار می دهیم. سپس با استفاده از آپلیکاتور آغشته به نمونه ها عمل نمونه گذاری را انجام می دهیم.

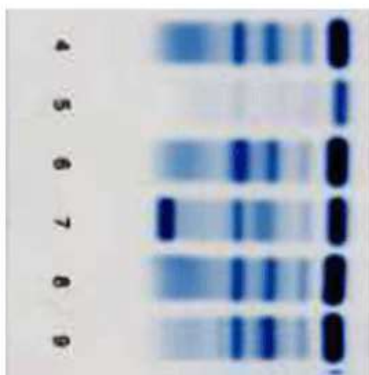


۶) **انجام فرایند الکتروفورز:** ژل را در اتاقک الکتروفورز قرار داده و پس از بستن درب اتاقک و اطمینان از ایمنی کامل شرایط، الکترودهای مثبت (آند) و منفی (کاتد) دستگاه منبع تغذیه را متصل نموده، دستگاه را روشن می کنیم. سپس، ولتاژ دستگاه را روی ۱۸۰ ولت قرار داده و به مدت ۱۵ دقیقه زمان می دهیم تا پروتئینهای موجود روی ژل از یکدیگر جدا شوند (شکل روبرو). سپس، منبع تغذیه را خاموش کرده، سیم برق منبع تغذیه را از برق شهر جدا می کنیم، الکترودها را خارج و درب اتاقک را باز می کنیم. لبه های ژل را به آرامی گرفته و از ظرف خارج می نماییم. اکنون ژل برای ظاهر سازی پروتئینها آماده است.



۷) **ظاهر سازی پروتئینها:** پس از اتمام الکتروفورز ژل را در راک مخصوص ژل قرار داده و درون ظرف رنگ مناسب (کوماسی بلو یا پانسو آ S) غوطه ور می کنیم (۶ دقیقه). سپس، به مدت چند دقیقه (تا وقتی پس زمینه ژل مقداری بی رنگ گردد) در ظرف استیک اسید ۵ درصد قرار می دهیم. در مرحله بعد ژل را ظرف دیگری که آنهم محتوی استیک اسید ۵ درصد است قرار می دهیم تا رنگهای اضافی کاملاً پاک شود و باندهای پروتئینی متظاهر گردند. می توان ژل را از حالت شیری رنگ به حالت کاملاً شفاف نیز تبدیل کرد؛ برای اینکار از محلول اتیلن گلیکول استفاده می شود. اگر ژل را ابتدا در متانل خالص قرار دهیم، آب موجود د ژل گرفته می شود؛ سپس ژل را در محلول اتیلن گلیکول قرار می دهیم. در مرحله بعد نیز، ژل را در فور (آون) ۵۰ الی ۶۰ درجه قرار می دهیم. حرارت باعث تغییر پیوندهای ژل استات سلولز شده و ظاهری شفاف به ژل می دهد. نتیجه کار به شکل زیر خواهد بود.

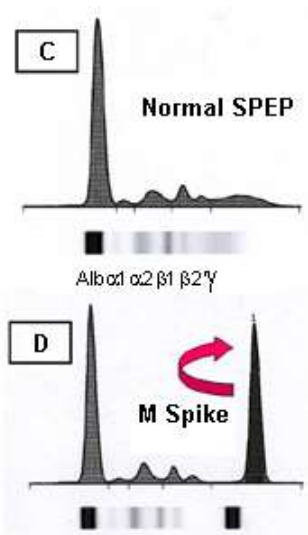
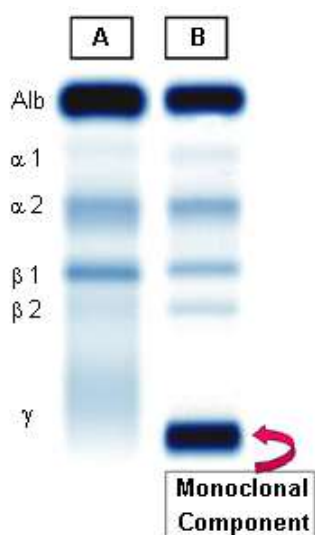
ژل استات سلولز که با استفاده از رنگ کوماسی آبی (کوماسی بلو) رنگ آمیزی شده است.



۸) تعیین درصد پروتئینها: در ژل مقابل، هر ردیف مربوط به یک بیمار است. همانطور که مشاهده می شود از باندهایی متظاهر شده اند که اولین باند سمت راست مربوط به آلبومین است، بعد از آن آلفا-۱ گلوبولینها هستند، سپس باند آلفا-۲ گلوبولینها، سپس، بتا-۱ گلوبولینها و باند بعدی بتا-۲ گلوبولینها و در نهایت گاما-گلوبولینها هستند. چنانکه مشاهده می شود، شدت رنگ گرفتن هر باند بین بیماران مختلف متفاوت است و این نشان می دهد

که غلظت آن نوع پروتئین با سایر پروتئینها فرق می کند. با استفاده از روشهای دانسیتومتری (عکس گرفتن از ژل و تعیین شدت رنگ هر باند) می توان درصد تک تک باندها را تعیین نمود؛ برای این منظور نرم افزارهایی نیز طراحی شده اند. خروجی این نرم افزارها بصورت منحنی هایی قابل مشاهده اند. این منحنی ها در افراد سالم و طبیعی الگوی خاصی دارند و چنانچه الگوی الکتروفورزی پروتئینهای سرم در فردی مشابه این الگوهای نباشد، آن فرد بیمار در نظر گرفته می شود.

تفسیر بالینی نتایج:



در تصویر مقابل الگوی الکتروفورزی دو فرد طبیعی و بیمار با یکدیگر مقایسه شده اند. منحنی های نشان داده شده، شکلهایی هستند که توسط نرم افزار به تصوی درآمده اند.

همانطور که مشاهده می شود، در جایگاه باند گاما گلوبولینها، فرد بیمار (الگوی B و منحنی D که برای آن رسم شده است) غلظت بیشتری وجود دارد. با توجه به اینکه عمده پروتئینهای موجود در این ناحیه از نوع ایمنو گلوبولینها هستند، لذا، این فرد دچار بیماری افزایش

ایمنو گلوبولینهای خون است؛ در این بیماری که نوعی سرطان خون محسوب می شود، سلولهای سازنده آنتی بادی (لنفوسیت های B بالغ یا سلولهای پلازما Plasma cells) تعدادشان بیش از حد افزایش یافته است و مدام تولید آنتی بادی می نمایند. لذا، این آنتی بادیها را در باند گاما گلوبولینها می توان بوضوح تشخیص داد.

آزمایشهای سریع ادرار

تمام مواد دفعی بدن که محلول در آب باشند، چه در بدن تولید شده باشند و چه از طریق مواد غذایی وارد بدن شده باشند، از طریق ادرار دفع می‌شوند. مواد نامحلول در آب نیز عمدتاً توسط آنزیمهای کونژوگه کننده موجود در کبد به مولکولهای قطبی مثل سولفات و گلوکوکورونیک اسید بصورت قطبی درآمده و بصورت محلول در آب وارد جریان خون و در نهایت از توسط کلیه تصفیه و دفع می‌شوند. لذا، تعدادی از مواد حائز اهمیت بالینی را می‌توان در ادرار جستجو نمود و تغییرات متابولیسمی بدن را از طریق سنجش آنها برآورد کرد.

حجم دفع ادرار:

مقدار دفع ادرار روزانه حدود ۰/۵ الی ۲ لیتر در روز است، لیکن این مقدار نیز خود تحت تاثیر شرایط مختلف می‌تواند کم و زیاد باشد. عموماً دفع بیش از حد یا کاهش شدید حجم ادرار یا توقف دفع ادرار نشانه‌دهنده وجود بیماری است. چنانچه دفع ادرار روزانه به کمتر از ۱۰۰ میلی لیتر در روز برسد، این حالت را آنوری (Anuria)، اگر بین ۱۰۰ الی ۴۰۰ میلی لیتر در روز باشد به آن اولیگوری (Oliguria) و اگر به بیش از ۳ لیتر در روز برسد به آن پلی اوری (Polyuria) گفته می‌شود.

در بین مواد دفعی یک سری مواد بصورت دائم و با غلظت بالا وجود دارند، مانند اوره، کراتینین، اسید اوریک و ... وجود دارند. برخی مواد نیز به مقدار بسیار ناچیز در ادرار دفع می‌شوند که عمدتاً آنقدر غلظت آنها در فرد سالم پائین است که عملاً مقدار آنها را در آزمایشگاه در حد صفر در نظر می‌گیرند؛ مانند، گلوکز، پروتئین، مواد کتون و

هم در مورد موادی که با غلظت بالا و هم موادی که با غلظت بسیار ناچیز در ادرار دفع می‌شوند یک سری تستهای آزمایشگاهی ابداع شده اند که عموماً اساس واکنشهای آنها همانند همان روشهای سنجش بیوشیمیایی است که پیش از این با استفاده از روشهای فتومتری در خصوص آنها بحث شده است.

آزمایش ادرار (Urine Analysis = U/A)

آزمایشهای ادرار شامل دو دسته از تستهای ماکروسکپی (خصوصیات ظاهری و فیزیکی ادرار) و میکروسکپی (اجزاء سلولی یا مواد قابل مشاهده با میکروسکپ) هستند.

آزمایشهای ماکروسکپی ادرار:

ادرار طبیعی باید رنگ زرد کهربایی، بوی آمونیاک و ظاهری شفاف داشته باشد.

تغییرات رنگ ادرار: تغییرات رنگ ادرار ناشی از تغییرات میزان آب بدن یا وجود مواد دفعی غیر معمول در ادرار است. پر رنگ شدن رنگ زرد ادرار در بیشتر اوقات ناشی از کمبود آب بدن (دهیدراته بودن) است، لیکن می‌تواند به دلیل لیز و از بین رفتن غیر طبیعی گلبولهای قرمز یا مصرف ویتامینهای خانواده B یا مصرف غذایی برخی مواد شدیداً رنگزا باشد. در برخی بیماریهای خاص نیز رنگ ادرار قرمز بنفش می‌شود. ادرار ممکن است شیری رنگ، سبز، قرمز شفات یا بی رنگ نیز باشد که هر کدام از این رنگها ممکن است حاصل مصرف مواد غذایی یا اختلالات متابولیکی

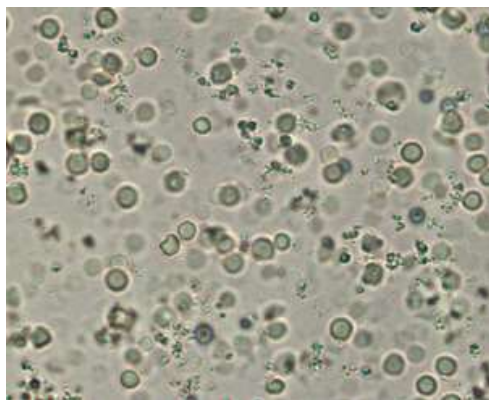
خاص باشد. چنانچه کلیه‌ها به مقدار زیاد آب دفع کرده باشند رنگ ادرار ممکن است حتی کاملاً بی‌رنگ نیز باشد. رنگ شدیداً زرد ادرار ممکن است ناشی از وجود موادی مانند بیلی‌روبین یا اوروبیلینوژن و بطور کلی پورفیرینها باشد.

ظاهر ادرار: ادرار طبیعی باید ظاهری کاملاً شفاف داشته باشد. کدورت ادرار می‌تواند ناشی از وجود سلول (مثلاً سلولهای اپیتلیال مسیر تناسلی - ادراری و بویژه در دوره قاعدگی) بوده یا به دلیل وجود باکتری، گلبول قرمز و سفید یا مجموعه اینها باشد. لذا، کدورت ادرار یا طبیعی است (ناشی از خونروشی) یا غیرطبیعی (عفونت ادراری).

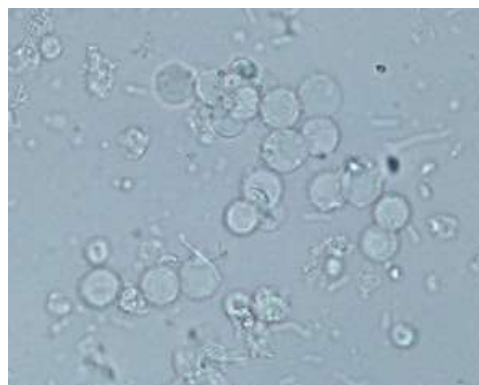
بوی ادرار: ادرار طبیعی بوی آمونیاک می‌دهد. گاهی اوقات در برخی بیماریها بوی ادرار تغییر نموده و بوی خاص از آنها استشمام می‌گردد. مثلاً، در بیماری شربت افرا (maple syrup urine disease) که بیماری مسیر متابولیسم اسیدهای آمینه شاخه‌دار است همانطور که از نام آن برمی‌آید بوی خاص شربت افرا را می‌دهد. همچنین، بوی موش و کپک نیز در بیماری فنیل کتونوری که ناشی از اختلال در مسیر متابولیسمی فنیل آلانین است استشمام شود.

آزمایشهای میکروسکپی ادرار:

آزمایشات میکروسکپی ادرار شامل بررسی میکروسکپی وجود سلولهای اپیتلیال، گلبولهای قرمز، گلبولهای سفید، سیلندرها (یا کست‌ها Cast)، که ناشی از ترشح پروتئین خاصی در مجرای لوله‌های ادراری هستند، باکتریها، انگل‌های خاص، کریستالها و هر چیز غیر طبیعی در ادرار می‌باشد. ادرار طبیعی دارای صفر الی ۲ سلول از هر کدام از سلولهای نامبرده شده است و به همین دلیل ظاهر ادرار کاملاً شفاف به نظر می‌رسد. برای مشاهده محتویات میکروسکپی ادرار از عدسی‌های ۱۰ و ۴۰ چشمی میکروسکپ استفاده می‌شود. در شکلهای زیر برخی از سلولها، کریستالها، سیلندرها و اجزایی که در میکروسکپی ادرار ممکن است مشاهده شوند نشان داده شده اند.



گلبولهای قرمز (RBC): عموماً، در مواردی که فرد دچار خونریزی در مجرای تناسلی باشد (دوره قاعدگی در خانمها)، در مواردی که فرد دچار خونریزی در مجاری ادراری باشد (مثلاً به دلیل وجود سنگهای مجاری ادراری)، یا دچار تخریب بخشی از بافت کلیه باشد، دیده می‌شوند. در عفونت ادراری نیز که منجر به آسیب بافت کلیه‌ها یا مجاری ادراری گشته باشد نیز گلبولهای قرمز مشاهده می‌شوند. بطور طبیعی، ممکن است تا ۵ گلبول قرمز نیز با عدسی شماره ۴۰ ششی میکروسکپ در هر شاین مشاهده شود. وجود مقدار زیاد خون در ادرار را اصطلاحاً هماجوری (Hematuria) می‌گویند.



گلبولهای سفید (WBC): عموماً، در مواردی که فرد دچار عفونت در مجرای تناسلی-ادراری یا التهاب باشد مشاهده می‌شوند. همچنین، در موارد خونریزی همراه با گلبولهای قرمز نیز مشاهده می‌گردند. معمولاً، وجود گلبول سفید همراه با باکتری شاخصی از عفونت ادراری است. بطور طبیعی، ممکن است صفر تا ۵ گلبول سفید نیز با عدسی شماره ۴۰ ششی میکروسکپ در هر شاین مشاهده شود. بیش از این مقدار را در صورت وجود علائم بالینی می‌توان بعنوان عفونت ادراری تلقی نمود و با انجام کشت ادرار ابتلاء به عفونت را تأیید نمود. در این شکل باکتریها نیز کاملاً واضح و مشخص هستند، لذا، می‌توان گفت این تصویر مربوط به فردی مبتلا به عفونت ادراری است.



سلولهای اپیتلیال سنگفرشی (Squamous epithelial cells): بطور

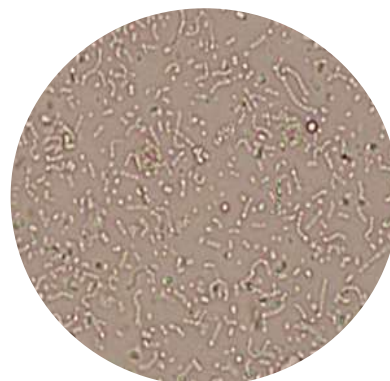
طبیعی تعداد محدودی سلول اپیتلیال در ادرار مشاهده می‌شود لیکن در خانمهای دچار فرایند قاعدگی به تعداد بسیار زیاد در ادرار دفع می‌گردند که ناشی از تخریب لایه اندومتر است. سلولهای اپیتلیال سنگفرشی بزرگترین سلولهای موجود در ادرار هستند.



تصاویر دیگری از سلول‌های اپی‌تلیال



باکتریهای میله‌ای شکل (Bacilli form bacteria): بطور طبیعی در ادرار نباید باکتری مشاهده شود، لیکن از آنجا که برخی باکتریها بطور طبیعی در ابتدای مجرای ادراری موجود هستند، چنانچه فرد اصول نمونه گیری ادرار را رعایت نکرده باشد، ممکن است تعدادی باکتری که در ابتدای مجرای ادراری هستند وارد نمونه شوند. چنانچه در نمونه ادراری تهیه شده از بخش میانی ادرار باکتری موجود باشد، نشاندهنده عفونت ادراری است که باید با انجام کشت باکتریایی ادرار و با توجه به علائم بالینی وجود عفونت تأیید شود.



باکتریهای گرد شکل (Cocci form bacteria): نوعی دیگری از باکتریایی که در موارد عفونت ادراری در ادرار دیده می‌شوند. در این تصویر باکتریهای گرد شکل بطور زنجیره‌وار در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند.



مخمرها (Yeast): مخمرها، سلولهای قارچهای میکروسکوپی هستند که گاهی اوقات در ادرار دیده می‌شوند. این سلولها یا بصورت تک سلولی گرد یا بیضی هستند یا بصورت سلولهای جوانه زده‌اند که ریشه کاذب (pseudo hypha) ایجاد می‌نمایند. گاهی اوقات به دلیل آلوده شدن نمونه و به مدت طولانی باقی ماندن نمونه ادرار در نمونه دیده می‌شوند لیکن چنانچه نمونه ادرار تازه باشد نشاندهنده عفونت قارچی است که بویژه در بیماران دچار نقص سیستم ایمنی مشاهده می‌شود.

کریستال‌های معمول در ادرار

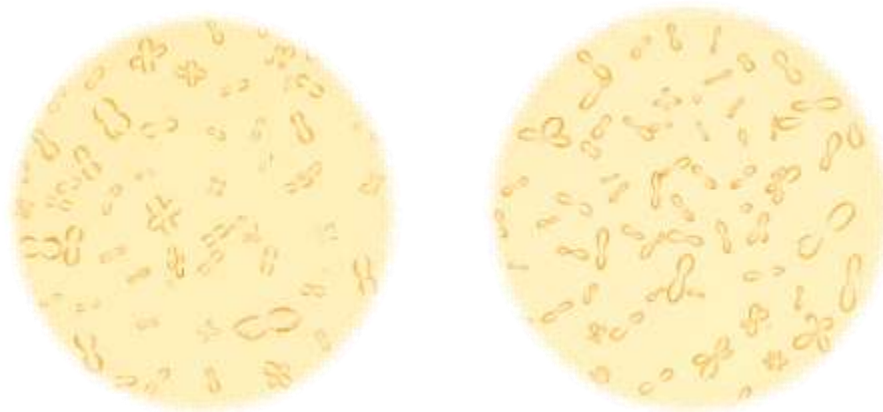
کریستال‌های ادراری جزو مواردی هستند که در میکروسکوپی ادرار ممکن است مشاهده شوند. کریستال‌های ادراری می‌توانند بصورت شن کلیوی یا سنگ‌های کلیوی درآیند و عامل سوزش یا درد شدید در حین دفع باشند.

جنس کریستال‌ها

کریستال‌های ادراری از مواد موجود در بدن تشکیل می‌شوند، مانند: اگزالات کلسیم، کلسیم کربنات، اسید اوریک، آمونیوم اورات، آمونیوم فسفات، بیلیروبین، برخی آمینواسیدها مانند کریستال سیستین، کریستال کلسیترول و غیره. برخلاف تصور عوام که مصرف آب پراز املاح بر تشکیل کریستال‌ها اثر می‌گذارد و منجر به سنگ کلیه می‌شود، تشکیل این سنگ‌ها و شن‌های کلیوی چندان به نوع آب آشامیدنی مربوط نیست؛ بلکه، اختلال متابولیسم موادی مانند اسید اوریک، کم نوشیدن آب، pH ادرار، و عواملی از این قبیل بر تشکیل سنگ‌های کلیوی اثر می‌گذارند. گاهی اوقات نوع رژیم غذایی بر تشکیل کریستال‌های ادراری اثر می‌گذارد؛ برای مثال، فردی که ماست خورده، ممکن است در ادرار او کریستال‌های کلسیم اگزالات فراوان دیده شود.

دفع کریستال‌های ادراری گاهی منجر به سوزش و دفع خون، به دلیل آسیب مجاری ادراری، می‌شود. لذا، دفع خون، همراه با دفع کریستال‌ها ممکن است دفع پروتئین یا هموگلوبین نیز رخ دهد. در ادامه تصاویر برخی از کریستال‌های ادراری را مشاهده خواهیم نمود. سپس، برخی تصاویر پاتولوژیک میکروسکوپی ادرار را نیز مرور خواهیم کرد.

نکته: فراموش نکنیم، میکروسکوپی ادرار و تشخیص شکل‌های مختلف کریستال‌ها، اجزاء و شرایط پاتولوژیک نیازمند تجربه و دقت بسیار زیاد است. ازاینرو، آشنایی دانشجویان تنها در این حد که بطور مقدماتی با برخی اصطلاحات و تصاویر کریستال‌ها، سیلندرها، سلول‌ها و سایر عوامل پاتولوژیک آشنا باشند کافی است. به منظور کسب اطلاعات بیشتر در این زمینه، علاقه‌مندان را به مطالعه کتاب‌های تخصصی تر و اطلس‌های تجزیه ادرار، توصیه می‌کنیم.



کریستال‌های کلسیم کربنات؛ دوطرفه، متقاطع و گل‌رُز شکل. این کریستال‌ها در pH قلیایی مشاهده می‌شوند.



کریستال‌های کلسیم اگزالات؛ بصورت بی‌شکل، چهار زاویه‌ای، هرمی شکل و هشت وجهی؛ دارای اندازه‌های مختلف هستند و در pH اسیدی مشاهده می‌شوند.



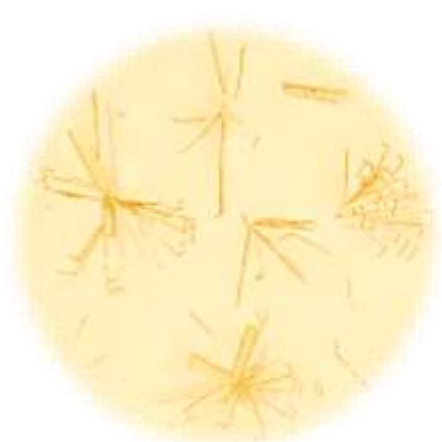
کریستال اسید اوریک؛ سوزن‌های زرد رنگ که به شکل کلاف و گل رُز می‌باشند. همچنین، به اشکال مختلف دیگر نیز مشاهده می‌شوند. مثلاً به رنگ بنفش خاکستری یا کاملاً تیره.



کریستال اسید اوریک؛ سوزن‌های زرد رنگ که به شکل کلاف و گل رُز می‌باشند. همچنین، به اشکال مختلف دیگر نیز مشاهده می‌شوند. مثلاً به رنگ بنفش خاکستری یا کاملاً تیره.



کریستال‌های فسفات آمورف (بی‌شکل)؛ در
pH خنثی مشاهده می‌شوند



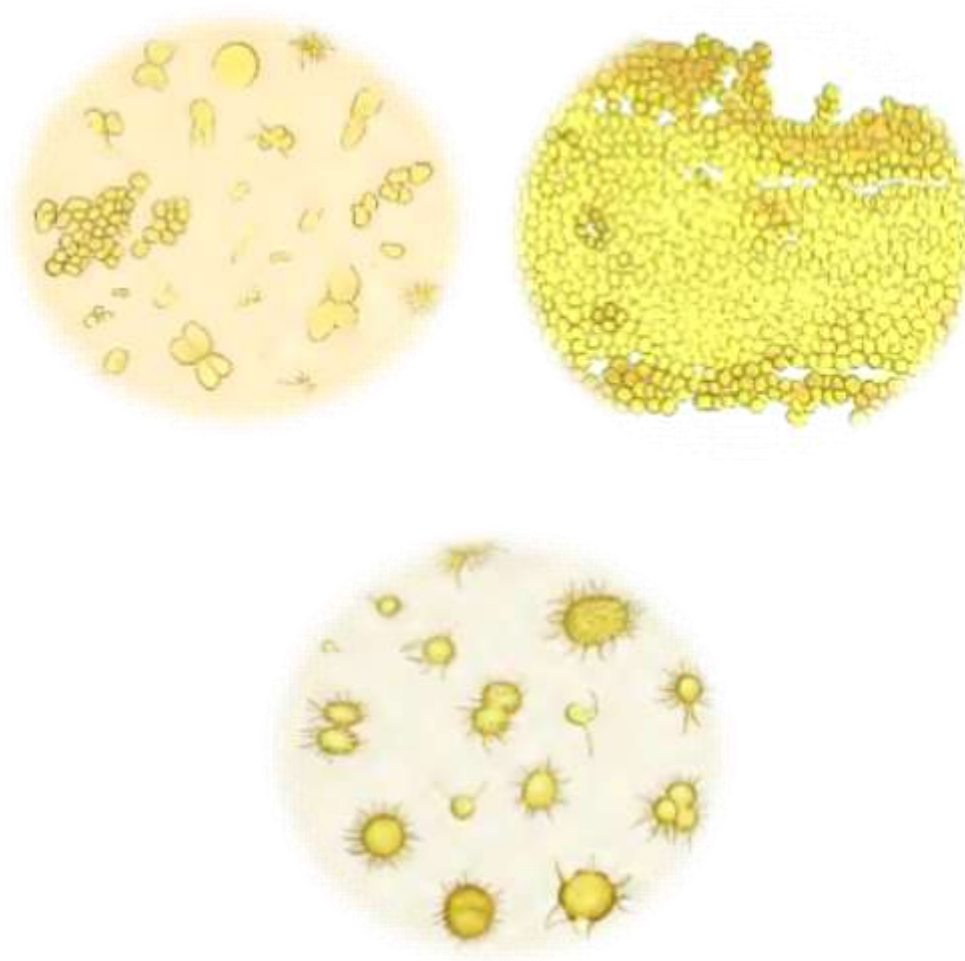
کریستال‌های کلسیم فسفات؛ بصورت منشور، مستطیل -
های رُز مانند یا دسته‌های به هم چسبیده و در pH خنثی
بیشتر مشاهده می‌شوند



کریستال‌های اورات آمورف (بی‌شکل)؛ در
pH اسیدی مشاهده می‌شوند



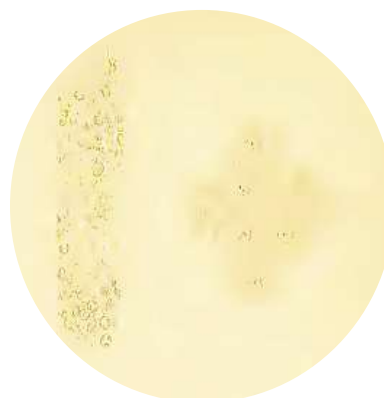
کریستال‌های آمونیوم اورات؛ به شکل ریشه‌ای هستند. در pH
اسیدی مشاهده می‌شوند. در این شکل کریستال کلسیم
اگزالات هم وجود دارد.



سایر شکل های کریستال های آمونیوم اورات که در pH اسیدی مشاهده می شوند.

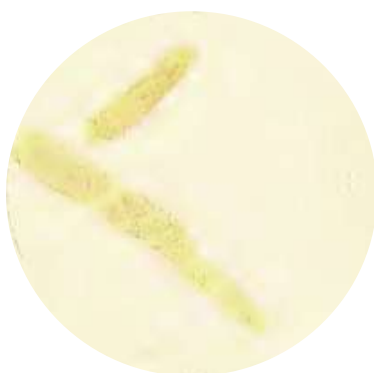
سیلندرها (Casts)

سیلندرها یا کست‌ها اجزایی هستند که از جنس پروتئینی به نام "تام-هورس-فال" بوده و از سلول‌های مجاری ادراری ترشح می‌شوند. این پروتئین گاهی به میزان فراوان توسط سیستم مجاری ادراری ترشح می‌گردد. در حین ترشح اگر اجزای خون مانند گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز یا سلول‌های اپی‌تلیال مجرای ادراری در مسیر باشند، در این پروتئین‌ها گیر افتاده و کست‌های گلبول سفید (WBC cast)، گلبول قرمز (RBC cast) و سلول‌های اپی‌تلیال (Epithelial Cast) تشکیل می‌شوند. اگر تعداد سیلندرها در ادرار زیاد باشد، انتظار داریم که آزمایش پروتئین ادرار نیز مثبت شود.



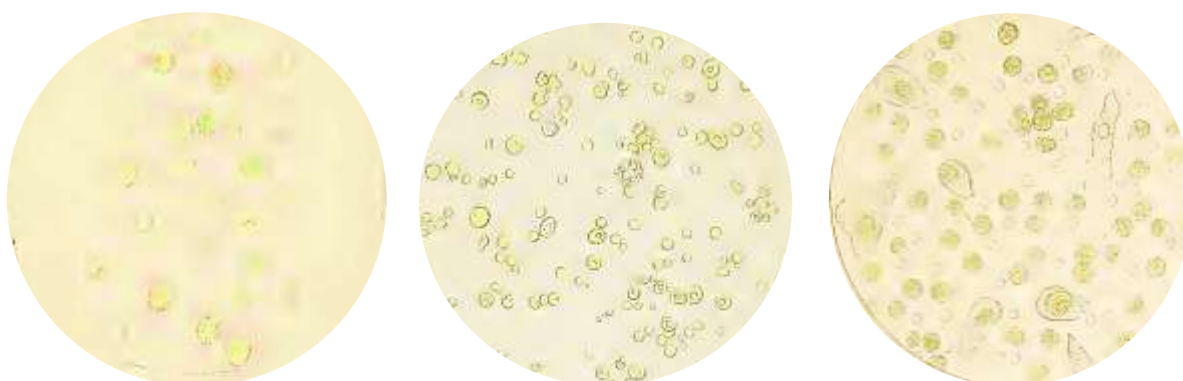
سیلندر (Cast) واکسی؛ این سیلندرها شفاف هستند و اغلب به راحتی دیده نمی‌شوند و نیاز به دقت کارشناس است.

سیلندر (Cast) مرکب؛ این سیلندر دارای گلبول‌های قرمز، سفید و دانه‌های اورات بی شکل است. در سمت راست این شکل نیز تعدادی سلول اپی‌تلیال وجود دارد.



سیلندر (Cast) گرانولار؛ ناشی از تجمع گلبول‌های سفید درون سیلندر بوده، به مرور غشای گلبول‌های سفید از بین رفته و این سیلندرها بصورت گرانولار دیده می‌شوند.

سیلندر (Cast) هیالین و تجمع باکتری‌ها بصورت سیلندر؛ سیلندری که شفاف است از نوع هیالین بوده و در ادرار فرد سالم نیز ممکن است دیده شود؛ در این تصویر به دلیل وجود باکتری، احتمال ابتلای فرد به عفونت ادراری وجود دارد.



گلبول‌های قرمز و سفید در ادرار (Hematuria): گلبول‌های قرمز فاقد هسته و گلبول‌های سفید دارای هسته می‌باشند.

گلبول‌های قرمز اگر تعدادشان خیلی زیاد نباشد، زیر میکروسکوپ بصورت شفاف دیده می‌شوند. اندازه و شکل گلبول‌های قرمز می‌تواند متفاوت و متنوع باشند؛ برای مثال، شکل طبیعی (مقعرالطرفین با لبه‌های گرد و صاف)، مژرَس (دارای غشای کنگره مانند) یا برخی نیز میکروسیت (اندازه کوچک) باشند. گلبول‌های سفید در موارد عفونت و التهاب در ادرار ظاهر می‌شوند.

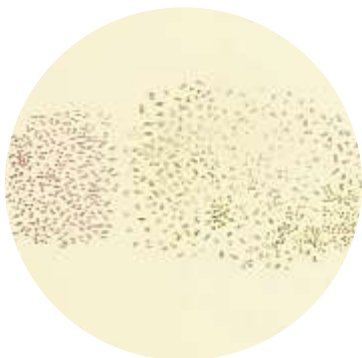


اسپرماتوزوا: سلول‌های جنسی مردانه

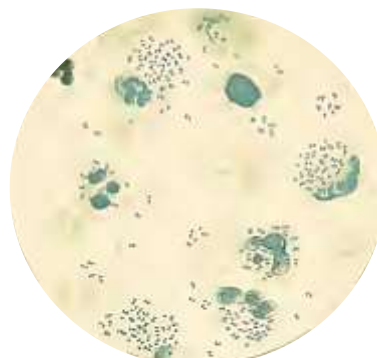
انواعی از سیلندرها: از چپ به راست به ترتیب ۱. سیلندر لکوسیت (گلبول‌های سفید)؛

۲. سیلندر گلبول‌های قرمز؛ ۳. سیلندر ذرات چربی

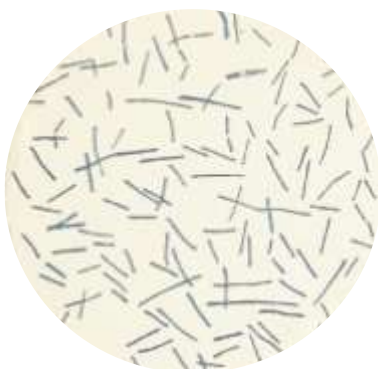
برخی انواع عوامل میکروبی در ادرار و شمای یک ادرار عفونی



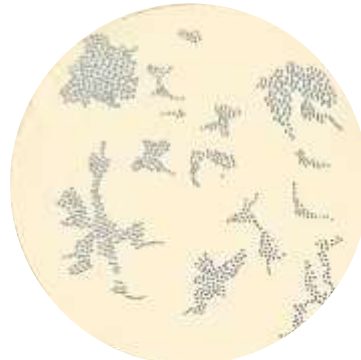
باکتری‌های میکروکوکوس در ادرار



باکتری‌های گونوکوک در ترشحات سیستم تناسلی



باکتری‌های باسیلوس (میله‌ای) در ادرار



تجمعات باکتری‌های استافیلوکوکوس در ادرار



قارچ‌های میکروسکوپی رشته‌ای که
تشکیل میسلیوم داده‌اند



شمای یک ادرار عفونی: باکتری، گلبول‌های سفید، سلنדרهای هیالین، گرانولار،
گلبول سفید، و اپی‌تلیال نیز مشاهده می‌شوند.

آزمایشهای بیوشیمیایی ادرار

این دسته از آزمایشات امروزه بصورت آزمایشات سریع طراحی شده‌اند و گرچه از همان اساس آزمایشات بیوشیمیایی معمول تبعیت می‌کنند لیکن انجام آنها ساده‌تر و با دقت و حساسیت کمتر همراه است. عمده این آزمایشها با استفاده از نوارهایی که آغشته به چند معرف بیوشیمیایی بوده انجام می‌شوند. این معرف‌ها حین واکنش با مواد موجود در ادرار همانند واکنش‌های ذکر شده در مورد مولکولهای موجود در خون در بخشهای قبل، با مولکول مورد نظر واکنش داده و موجب تغییر رنگ یک معرف می‌شوند. عموماً در این واکنشها از معرفهای حساس به تغییر pH استفاده می‌شود که در اثر واکنش آنزیمی یا شیمیایی مولکول مورد نظر منجر به تغییر pH محیط و نوار شده و لذا تغییر رنگ ویژه نوار نشان‌دهنده وجود مقادیر طبیعی یا بالاتر از حد طبیعی است.

همانطور که می‌دانیم مواد ضروری موجود در بدن عموماً براحتی وارد ادرار نمی‌شوند یا چنانچه وارد شوند بازجذب می‌گردند (مثل قند، اسیدهای آمینه و پروتئینها)؛ با این وجود برخی مواد نیز برای بدن مضر بوده و باید دفع گردند و لذا، از طریق ادرار دفع می‌شوند (مانند اوره و کراتینین)؛ لذا، وجود مقادیر بسیار زیاد از برخی مواد در ادرار امری طبیعی و وجود یا افزایش مقدار برخی مواد دیگر نشانه بیماری است. تستهای سریع بیوشیمیایی ادرار برای تشخیص کیفی یا سنجش نیمه کمی موادی است که در حالت طبیعی در ادرار به مقدار بسیار ناچیز موجوداند کمک می‌کنند. این تستها همانطور که پیش ازاین نیز اشاره شد بصورت نوارهای آغشته به معرفهایی در دسترس می‌باشند.

یک نمونه از نوارهای ادراری در شکل مقابل نشان داده شده است.



طریقه استفاده از نوارهای ادراری

طرز کار با این نوارها به این شکل است که یک عدد از این نوارها را در نمونه ادرار، تا حدی که تمام معرفهای رنگی به ادرار آغشته شوند، فرو برده و سریع خارج می‌کنیم؛ نگه داشتن بیش از ۱ الی ۲ ثانیه نوار ادرار در نمونه ادرار، معمولاً باعث خطا در نتیجه برخی از تستها می‌شود. سپس، به مدت ۳۰ ثانیه صبر می‌کنیم تا واکنشهای بیوشیمیایی بین معرفهای مختلف و مواد موجود در ادرار انجام شوند. پس از گذشت ۳۰ ثانیه از فروبردن نوار در ادرار، تا ۳۰ ثانیه بعد فرصت قرائت نتیجه را خواهیم داشت، لذا، با قرار دادن نوار ادرار در نزدیکی ظرف آن و مقایسه رنگها، نتیجه تست را قرائت می‌نماییم. در هر ردیف از رنگهای نشان داده شده روی ظرف، یک نوع تست تعریف شده و در هر ستون رنگهای مختلف تعریف شده‌اند که نشان‌دهنده شدت واکنشها است.

شرکتهای تولیدی نوارهای ادراری برای تستهای مختلفی نوارهای ادراری را تهیه می‌کنند، لیکن عمده این شرکتهای حداقل تستهای زیر را در نوارهای ادراری تولیدی خود لحاظ می‌نمایند:

نیتريت: برای تشخیص وجود برخی انواع باکتریهای بیماریزا می‌باشد؛ اساس: برخی باکتریها می‌توانند نیترات را تخمیر نمایند. لذا، نیترات را به نیتريت تبدیل می‌کنند. وجود نیتريت در ادرار نشان‌دهنده وجود باکتریهای تخمیرکننده نیترات است و عمده باکتریهای تخمیرکننده نیترات از نوع

بیماریزا هستند. از اینرو، چنانچه این تست مثبت شود (با درجات شدت و ضعف مختلف)، نشانه عفونت باکتریایی (عفونت ادراری) است، بویژه چنانچه گلبول سفید نیز در ادرار مشاهده شود.

گلبول سفید: گلبولهای سفید دارای آنزیمهای خاصی هستند که می‌توانند با معرفهای مختلف واکنش دهند؛ لذا، برای شناسایی وجود آنها در ادرار از این ره‌یافت بهره برده‌اند و معرفهایی را در نوار ادرار استفاده می‌کنند که با تحت اثر آنزیمهای موجود در گلبولهای سفید می‌توانند در معرفهای رنگی تغییر رنگ ایجاد نمایند. وجود گلبولهای سفید در ادرار نشان‌دهنده عفونت یا التهاب است.

وزن مخصوص (چگالی) Specific Gravity: وزن مخصوص ادرار نشان‌دهنده میزان مواد محلول در ادرار است، که هر قدر این مواد بیشتر باشند، وزن مخصوص ادرار نیز بیشتر خواهد بود. وزن مخصوص ادرار به پزشک کمک می‌کند که بطور تقریبی بداند چه میزان مواد محلول در ادرار دفع می‌شود. این شاخص تحت تاثیر رژیم غذایی فرد نیز قرار دارد لیکن در موارد بیماریهای کلیوی که دفع مواد محلول در آنها بیش از حد است وزن مخصوص نیز تغییر می‌یابد و از حد نرمال بیشتر می‌شود. وزن مخصوص ادرار را با مقیاس آب می‌سنجند. بطور قراردادی، برای آب مقطر وزن مخصوص را معادل ۱ در نظر می‌گیرند، لذا، اگر وزن مخصوص ۱ یا نزدیک به ۱ باشد نشان‌دهنده کم بودن مواد محلول در ادرار است.

pH ادرار: pH ادرار معمولاً اسیدی تا خنثی و بین ۵ الی ۷ می‌باشد. این شاخص تحت تاثیر رژیم مصرفی مایعات است لیکن در مواردی مانند برخی عفونتهای باکتریایی، یا تغییرات pH خون، pH ادرار نیز تغییر می‌یابد.

اوروبیلینوژن: گلبولهای قرمز دارای حلقه هم می‌باشند که این حلقه در کبد تغییراتی یافته و همراه با مدفوع یا ادرار بصورت بیلی‌روبین یا ترکیبات آن دفع می‌شود. چنانچه کبد دچار مشکل باشد، بیلی‌روبین یا ترکیباتی مانند اوروبیلینوژن (که ماحصل تغییرات بیلی‌روبین در روده است)، از طریق ادرار دفع می‌شوند. لذا، افزایش غلظت این ماده در ادرار در بیشتر موارد شاخصی از بیماری کبدی است.

بیلی‌روبین: متابولیسم این ماده نیز همانند اوروبیلینوژن بوده و اصلاً پیش‌ساز آن محسوب می‌شود. افزایش این ماده در ادرار نیز نشان‌دهنده اختلالات و بیماریهای کبدی یا همولیز بیش از حد می‌باشد.

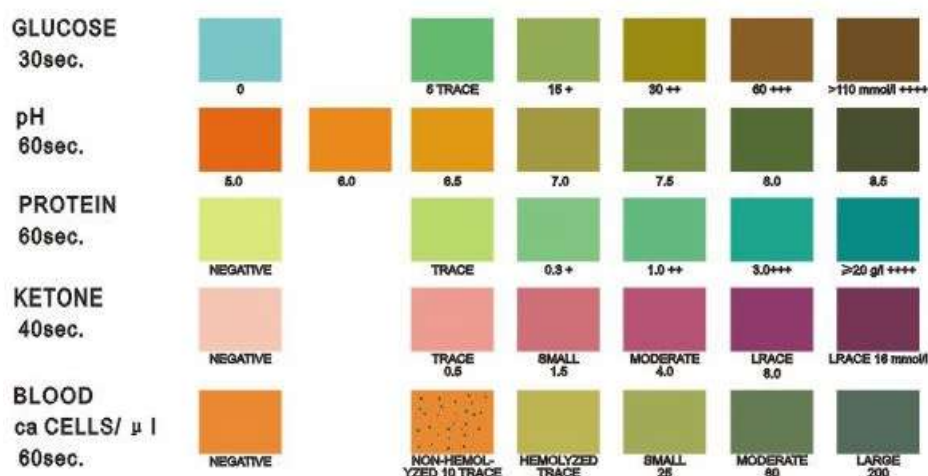
قند (گلوکز): گلوکز بطور طبیعی توسط ادرار به مقادیر بسیار بسیار ناچیز و عموماً غیرقابل تشخیص دفع می‌شود، لیکن در بیماران دیابتی دفع این ماده افزایش می‌یابد زیرا حالت سرریز در خون پیدا کرده و وارد ادرار می‌گردد. از اینرو، وجود قند در ادرار شاخصی از دیابت است.

پروتئین: پروتئین نیز ترکیبی است که بطور معمول به مقادیر بسیار ناچیز در ادرار وجود و با روشهای معمولی این مقدار ناچیز قابل سنجش نیست وجود پروتئین در ادرار نشان‌دهنده التهاب، تخریب بافت گلوMERولهای کلیوی، شروع آسیب کلیوی بویژه در بیماران دیابتی، گاهی اوقات وجود عفونت یا خونریزی در سیستم ادراری-تناسلی است. وجود پروتئین بیش از حد معمول در ادرار را به اصطلاح پروتئین‌وری گویند.

مواد کتون: کتونهای دفعی در ادرار شامل بتا-هیدروکسی بوتیریک اسید و استواستیک اسید هستند. تولید کتونها در بدن انسان ناشی از سوختن اسیدهای چرب است. در مواردی که اسیدهای چرب بیش از حد نرمال در بدن بسوزند، کتونها تولید شده و در ادرار دفع می‌شوند. در این موارد pH خون نیز اسیدی می‌شود. مواد کتونی دفع شده در ادرار شاخص مهم و گاهی اوقات بسیار حیاتی از بروز کتواسیدوز، یعنی حالتی که سلولهای فرد دیابتی دچار کمبود شدید قند شده و اسیدهای چرب را سوزانده‌اند، می‌باشد. وجود مواد کتونی در ادرار را کتونوری می‌گویند.

هموگلوبین و گلبول قرمز: وجود خون در ادرار نیز شاخصی از خونریزی در دستگاه ادراری-تناسلی است. همچنین، وجود هموگلوبین در ادرار نیز نشاندهنده خونریزی در ادرار است.

یک نمونه از تغییرات رنگی معرفها در شکل زیر نشان داده شده‌اند. برای مثال چنانچه گلوکز در ادرار نباشد، ۳۰ ثانیه پس از آغشته شدن نوار معرف به ادرار رنگ آن بصورت آبی است، لیکن هر مقدار گلوکز بیشتری در ادرار باشد رنگ آن به سمت سبز و سپس قهوه‌ای تمایل پیدا می‌کند (ردیف مربوط به گلوکز را ملاحظه بفرمائید). در مورد ردیف مربوط به pH تغییرات رنگ از نارنجی (نشان‌دهنده pH معادل ۵) تا سبز تیره (pH معادل ۸/۵) متغیر است.



انجام آزمایش:

نمونه ادراری که برای انجام آزمایشات بکار برده می‌شود باید به این شکل تهیه گردد: ابتدا نواحی بیرونی و سطح پوست عضو تناسلی-ادراری را شستشو داده و سپس بخشی از ادرار را دور ریخته و از بخش میانی ادرار، نمونه تهیه می‌کنیم. نمونه بایستی در ظرف مناسب و مخصوصی که در آزمایشگاههای تشخیص طبی استفاده می‌شود جمع‌آوری گردد. ظرف بایستی استریل و یکبار مصرف باشد.

نمونه ادرار خود را جمع‌آوری نموده و کلیه آزمایشهای فوق‌الذکر را با رعایت تمام ملاحظات بهداشت و ایمنی آزمایشگاه زیر نظر استاد مربوطه انجام دهید و گزارش نمائید.

آزمایشات میکروب‌شناسی تخصصی: چنانچه فردی مشکوک به عفونت ادراری بوده باشد، پزشک از آزمایشگاه درخواست انجام کشت باکتریایی خواهد داشت. لذا، توجه نمائید که بویژه برای تست کشت باکتریایی بایستی درب ظرف نمونه حتماً بسته باشد. روش و ملاحظات کشت باکتریایی را در مباحث باکتری‌شناسی به تفصیل خواهید آموخت.

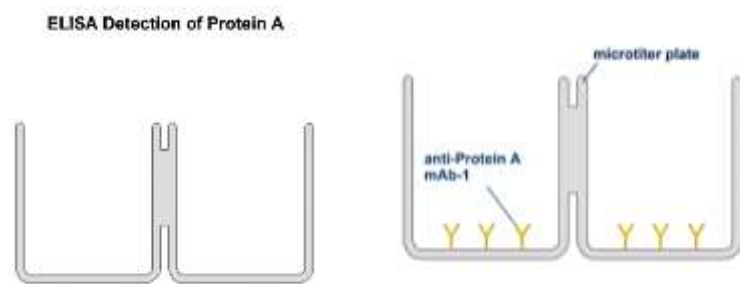
آزمایشهای سنجش ایمنی (Immunoassays)

آزمایشهای سنجش ایمنی دسته‌ای از آزمایشها هستند که مبتنی بر واکنش آنتی ژن و آنتی بادی می باشند. آنتی ژن (پادگن) ماده‌ای است که بتواند سیستم ایمنی و سلولهای آن را تحریک کنند؛ آنتی بادی (پادتن) ماده‌ای است که سیستم ایمنی بدن در پاسخ به آنتی ژن تولید می کند و می تواند به آنتی ژن متصل گردد. در آزمایشگاه تشخیص طبی و بسیاری از آزمایشات تحقیقاتی از این خاصیت آنتی ژن و آنتی بادی برای شناسایی و تعیین مقدار مولکولهای مختلف بهره می‌برند. اساس روش‌های سنجش به این شکل است که یک ماده مجهول به عنوان آنتی ژن در نظر گرفته می شود و مقدار آن از طریق واکنشی که با آنتی بادی اختصاصی خود ایجاد می نماید سنجیده می شود.

فرایند تولید آنتی بادی

بطور خلاصه؛ اگر بخواهیم علیه یک مولکول آنتی ژن (مولکولی که می تواند سیستم ایمنی را تحریک و وادار به تولید آنتی بادی نماید) آنتی بادی تولید کنیم، در ابتدا لازم است آنرا با روشهای خاصی (مثلاً استفاده از اولتراسانتریفوژ، رسوب پروتئینها، الکتروفورز، و بویژه کروماتوگرافی) تاحد امکان، خالص نمائیم؛ سپس، مولکول نسبتاً خالص شده را به یک حیوان آزمایشگاهی (مثلاً موش، رت، خرگوش، بز، اسب، گوسفند، شتر و ...) تزریق کنیم تا سیستم ایمنی بدن آن موجود علیه مولکول مورد نظر ما (آنتی ژن) تولید آنتی بادی نماید. معمولاً پس از چندبار تزریق آنتی ژن، بدن حیوان آزمایشگاهی حدود ۲ هفته الی تا چند ماه بعد به میزان کافی تولید آنتی بادی می نماید که این آنتی بادی را می توان با روشهای خاص، مثل روشهایی که برای آنتی ژن مثال زده شد، خالص نمود و برای کارهای بعدی (تشخیصی یا درمانی) بکار برد.

عموماً در شرکت‌های بیوتکنولوژی این آنتی بادی‌ها را درون ظرف‌های شیشه‌ای خاصی که از جنس پلیمر پلی استیرن هستند می ریزند؛ چون ماهیت



آنتی بادی‌ها گلیکوپروتئینی است لذا، می توانند به سطوح ظروف پلی استیرنی متصل شوند؛ در مراحل بعدی این اتصالات با پوشاندن مابقی سطوح آزاد و نگه داری در شرایط خشک پایدار نموده، برای استفاده در اختیار آزمایشگاه‌های بالینی و تحقیقاتی قرار می دهند.

شکل روبرو بصورت شماتیک یک ظرف حاوی آنتی بادهای متصل به آنرا نشان می دهد. در این شکل آنتی بادی که برای تشخیص پروتئین A، نوعی مولکول پروتئینی مورد استفاده در تحقیقات بیوتکنولوژی، به کف ظرفی از جنس پلی استیرن متصل گردیده است. در این شکل پروتئین A بعنوان آنتی ژن در نظر گرفته می شود که بعداً باید تشخیص داده شود؛ لذا، در این شکل آنتی بادی ضد پروتئین A را به کف ظروف پلی استیرنی متصل نموده اند. ظروف ویژه پلی استیرن را به اصلاح Microtiter plate می گویند. آنتی بادی تک کلونی (منوکلونال) ضد پروتئین A نیز در این شکل بصورت anti-Protein A mAb-1 نشان داده شده است.

در آزمایشگاه تشخیص طبی و تحقیقاتی این پلته‌ها بصورت کیت‌های تجاری آماده مصرف می باشند. طرحهای مختلفی برای واکنشهای ایمنوآسی را می توان برای تشخیص مقادیر مختلف یک مولکول موجود در مایعات بیولوژیک بکار برد. یکی از طرحهای پر کاربرد در مجموعه شکلهای زیر نشان داده شده است. در این مثال که یکی از طرحهای پر کاربرد و ساده روشهای ایمنوآسی می باشد به توضیح مختصر آن می پردازیم. در کیت‌های تجاری

و آماده مصرف هر آزمایشی و هر شرکتی دستورالعمل خاص خود را داشته که کارشناس آزمایشگاه یا فرد انجام دهنده آزمایش طبق دستورالعمل آن شرکت کار خواهد کرد.

در روش نشان داده شده زیر، ابتدا نمونه سرم یا مایع بیولوژیک را درون پلیت مخصوص حاوی آنتی بادی ضد پروتئین، هورمون یا مولکول مورد نظر ریخته و برای مدت زمان مشخصی انکوبه می‌نمائیم تا چنانچه آنتی ژن مورد نظر ما در نمونه وجود داشته باشد بتواند با آنتی بادی اختصاصی پوشانده شده در پلیت‌ها واکنش دهد. در تصاویر زیر پلیت سمت چپ و راست مربوط به دو فرد (یا بیمار، یا نمونه) متفاوت است. پس از افزودن نمونه‌ها و انکوبه کردن چنانچه مولکولی که علیه آن پلیت‌ها پوشانده از آنتی بادی ضد آن هستند وجود داشته باشد، چسبیده، سپس، محلول حاوی سایر مواد اضافی که متصل به آنتی بادی نشده‌اند را بر می‌داریم.

در مرحله بعد، آنتی بادی خاص دیگری اضافه می‌شود که بتواند ناحیه دیگری از مولکول متصل به کمپلکس آنتی ژن-آنتی بادی را شناسایی نماید و کمپلکس آنتی بادی اول-آنتی ژن اول-آنتی بادی دوم را تشکیل دهد؛ این آنتی بادی دوم در قسمتی از مولکولش متصل به بیوتین می‌باشد. سپس، مجدداً به مدت زمان معینی انکوباسیون صورت می‌گیرد تا مولکولها بتوانند واکنش دهند؛ پس از اتمام واکنش مرحله دوم، مواد اضافی دور ریخته می‌شوند؛ واضح است که آنتی بادی متصل به بیوتین فقط می‌تواند در صورتی در ظرف باقی بماند که آنتی ژن به آنتی بادی اول متصل به پلیت چسبیده باشد.

در مرحله بعد آنزیمی اضافه می‌کنند که به آویدین (یا استرپتاویدین) متصل می‌باشد. آویدین و ترکیباتی مانند استرپتاویدین می‌توانند با تمایل بسیار بالا به بیوتین متصل شوند؛ لذا، با اضافه کردن آنزیم متصل به آویدین (یا استرپتاویدین) بین کمپلکس آویدین (استرپتاویدین)-آنتی بادی دوم-آنتی ژن-آنتی بادی اول تشکیل می‌شود؛ واضح است این کمپلکس در صورتی تشکیل خواهد شد که کمپلکسهای قبلی تشکیل شده باشند وگرنه با دور ریختن سایر مواد و شستشوی ظروف توسط بافر، آویدین (استرپتاویدین) متصل به آنزیم نیز دور ریخته می‌شود.

در مرحله بعد سوبسترای آنزیم اضافه می‌شود و زمان داده می‌شود تا سوبسترا توسط آنزیم‌های متصل به کمپلکس فوق‌الذکر به فراورده تبدیل گردد؛ معمولاً، تست از نظر بیوشیمیایی طوری طراحی می‌شود که فراورده فعالیت آنزیم می‌تواند نوعی رنگ ایجاد کند. هر اندازه مقدار کمپلکس تشکیل شده از آنزیم-آویدین (استرپتاویدین)-آنتی بادی دوم-آنتی ژن-آنتی بادی اول بیشتر باشد، مقدار (ماده رنگی نیز بیشتر خواهد بود. چنانچه از نمونه‌های استاندارد نیز که غلظت مشخصی از ماده مورد اندازه‌گیری را دارند استفاده نمائیم، می‌توانیم مقدار دقیق ماده مورد سنجش را با رسم منحنی استاندارد تعیین نمائیم. برای سنجش شدت رنگ و ترسیم منحنی استاندارد از روشهای فتومتری استفاده می‌نمائیم. همانطور که ملاحظه می‌کنید مراحل انتهایی روش شبیه سنجشهای فتومتری است که پیش از این برای سنجش مولکولهای مانند گلوکز، اوره، اسیداوریک و غیره توضیح دادیم.

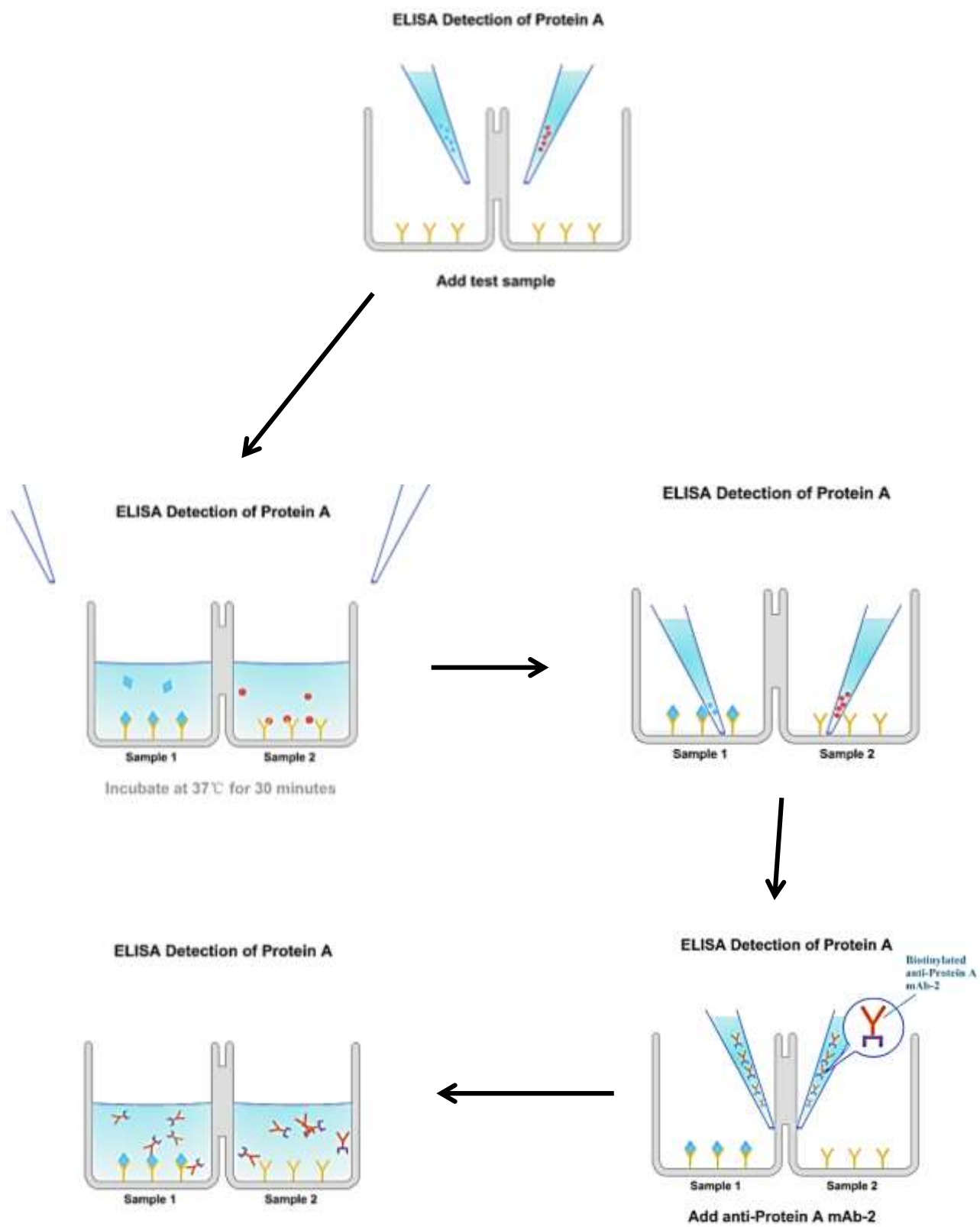
در روش توضیح داده شد که بصورت شماتیک در صفحات بعد مراحل آن نشان داده شده‌اند، چون از آنزیم در مرحله نهایی استفاده می‌شود، لذا، به آن آزمایش جذب ایمنی متصل به آنزیم (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay) می‌گویند و به اختصار تحت عنوان ELISA نامیده می‌شود؛ در این روش نشانگر وجود و تعیین مقدار ماده، آنزیم و واکنش آنزیمی است. امروزه روشهای متنوعی برای سنجشهای مبتنی بر واکنش آنتی ژن-آنتی بادی وجود دارد و طراحی شده‌اند که اساس همه آنها مشابه ولی برخی تکنولوژی‌های برتر و حساس‌تری دارند که از این بین می‌توان به روش FIA (Florescent-Immuno-Assay) اشاره نمود که در آن از ماده فلورسنت استفاده می‌شود؛ یا روش (Radio-RIA) (Immuno Assay) که در آن از ماده رادیواکتیو به عنوان نشانگر استفاده می‌شود. روشهای دیگری نیز مبتنی بر تولید فوتون‌های نور هستند که آنها

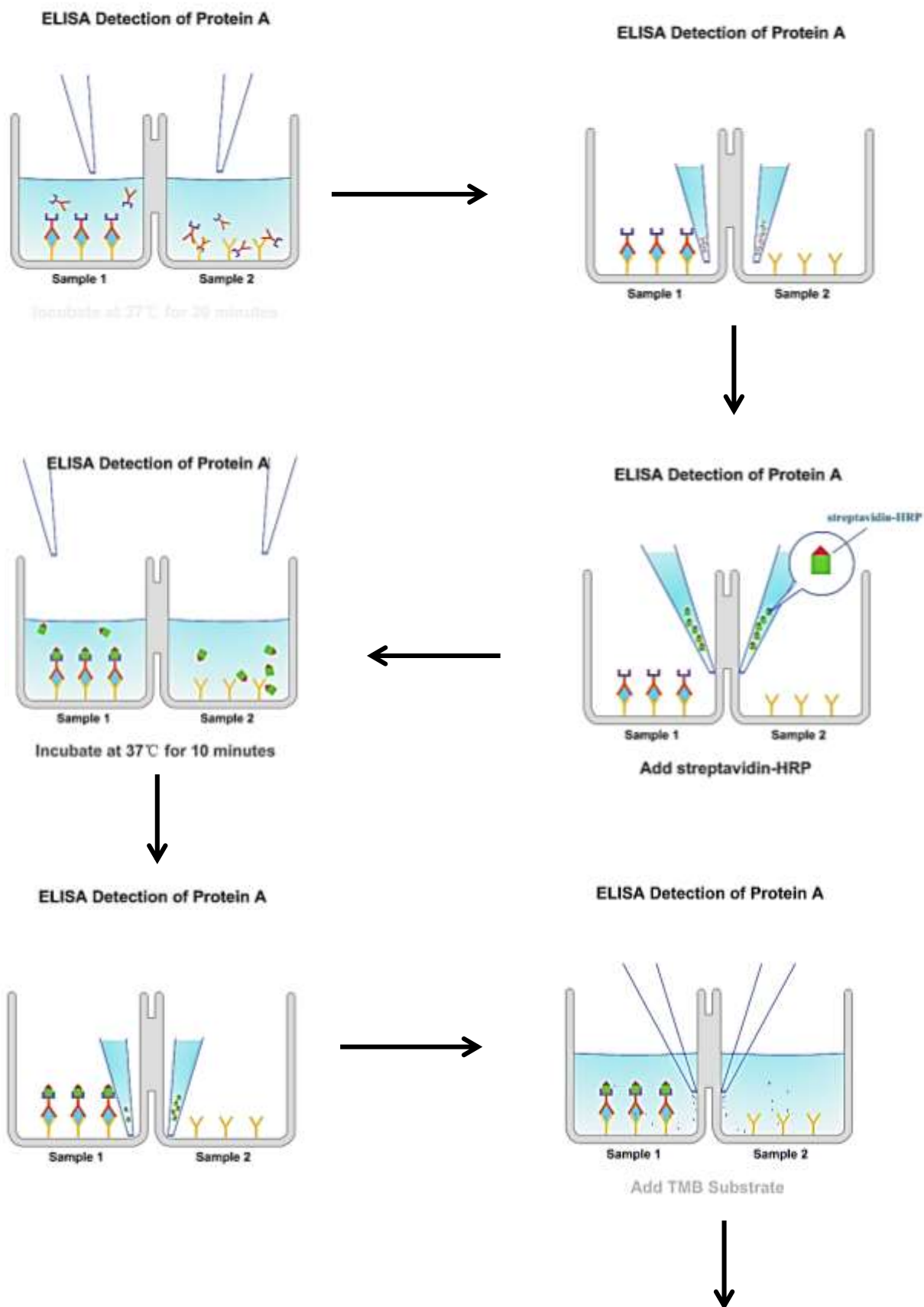
را به اصطلاح (Chemiluminescent Immuno Assay) و Electro-Chemiluminescent می گویند. در حال، در همه این روشها، اساس کار مشابه بوده و صرفاً برخی روشها، تکنولوژی های بهتر و حساس تری دارند.

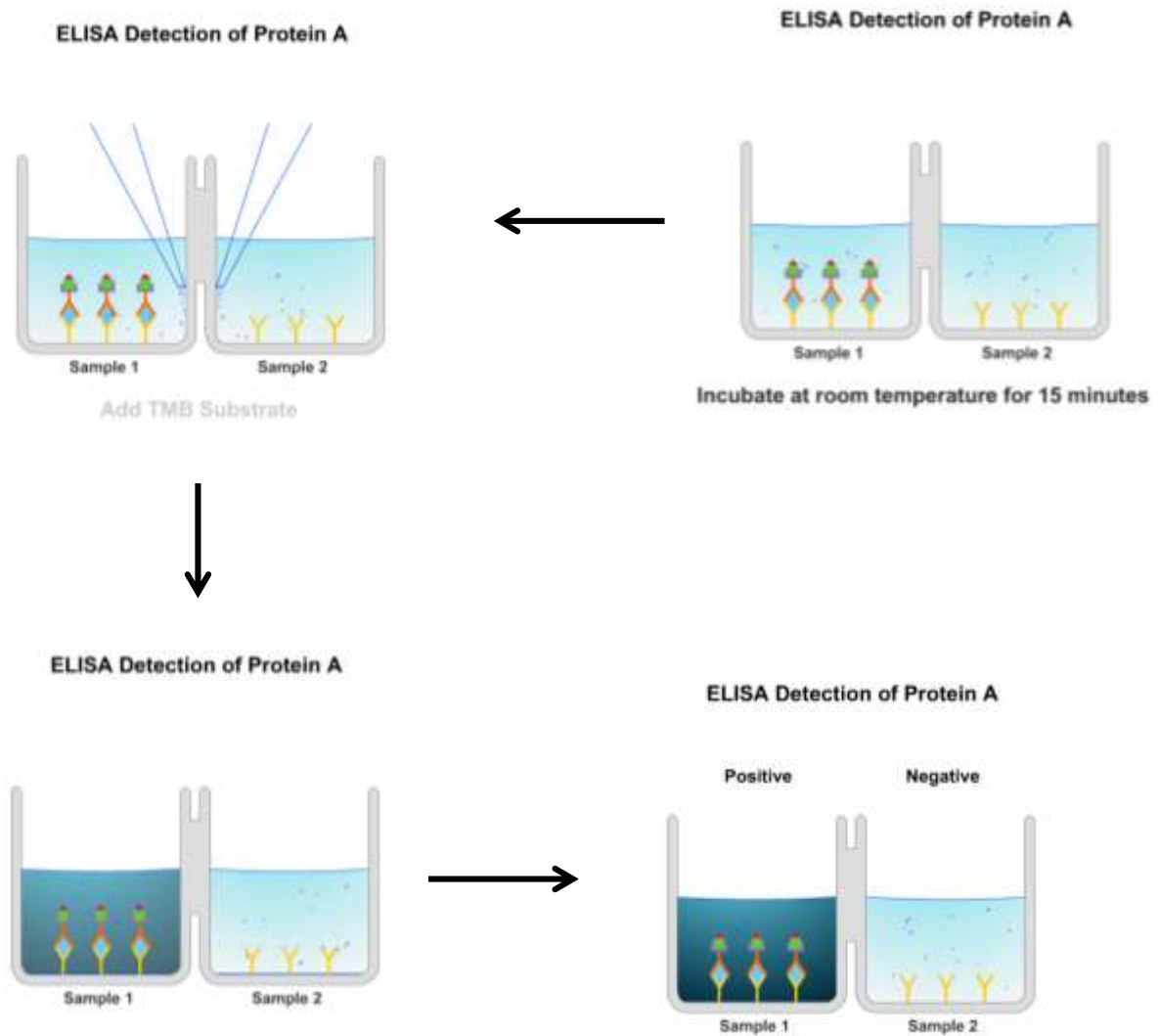
کاربرد روشهای ایمنوآسی

روشهای سنجش ایمنی، برای سنجش مقادیر هورمونهای مختلف مانند hCG (human Chorionic Gonadotropin)، هورمونهای جنسی زنانه مثل استروژن ها (استرادیول، استریول)، پروژسترون، و هورمون جنسی مردانه تستوسترون، هورمونهای تیروئیدی T3 و T4، هورمون محرک تیروئید TSH، هورمون های کورتیزول، انسولین، هورمون رشد GH، هورمونهای رشد شبه انسولین IGF1 و IGF2، هورمون های دخیل در متابولیسم کلسیم مانند هورمون پاراتورمون، کلسی تونین و ویتامین D و غیره، استفاده می شود. همچنین، برای سنجش مقدار یا وجود آنتی ژنها یا آنتی بادیهای عوامل بیماریزایی مانند ویروسهای نقص ایمنی اکتسابی (HIV)، انواع هپاتیت (بویژه هپاتیت های B و C) و غیره استفاده می شود. بعلاوه، آنتی بادیهای ضد اجزاء سلولی (مانند برخی آنتی بادیهای ضد آنتی ژنهای میتوکندریایی، آنتی بادیهای ضد هسته سلول یا DNA) و غیره نیز که موجب بیماریهای خودایمن می شوند نیز توسط این روش سنجیده می شوند؛ لذا، با توجه به تنوع بسیار زیاد تستهای مبتنی بر واکنش آنتی ژن-آنتی بادی همانطور که به نظر می رسد این قبیل تستها در تشخیص گستره بسیار زیادی از بیماریها از بیماریهای خودایمن گرفته تا اختلالات متابولیسمی و هورمونی یا بیماریهای عفونی کاربرد دارد.

با توجه به اینکه هر شرکت تولید کننده کیت های تجاری آزمایشات ایمنوآسی روش و مراحل انجام تست آن با شرکت دیگر متفاوت است، لذا، با توجه به کیت موجود در آزمایشگاه و دستورالعمل موجود در کیت مراحل انجام تست را زیر نظر استاد مربوطه انجام دهید. در نهایت مقدار سنجیده شده را به استاد خود گزارش نمایید.







منابع:

Affinity Chromatography: Amersham Biosciences.

http://www.genscript.com/gsfiles/flash/protein_a_elisa_protocol.swf

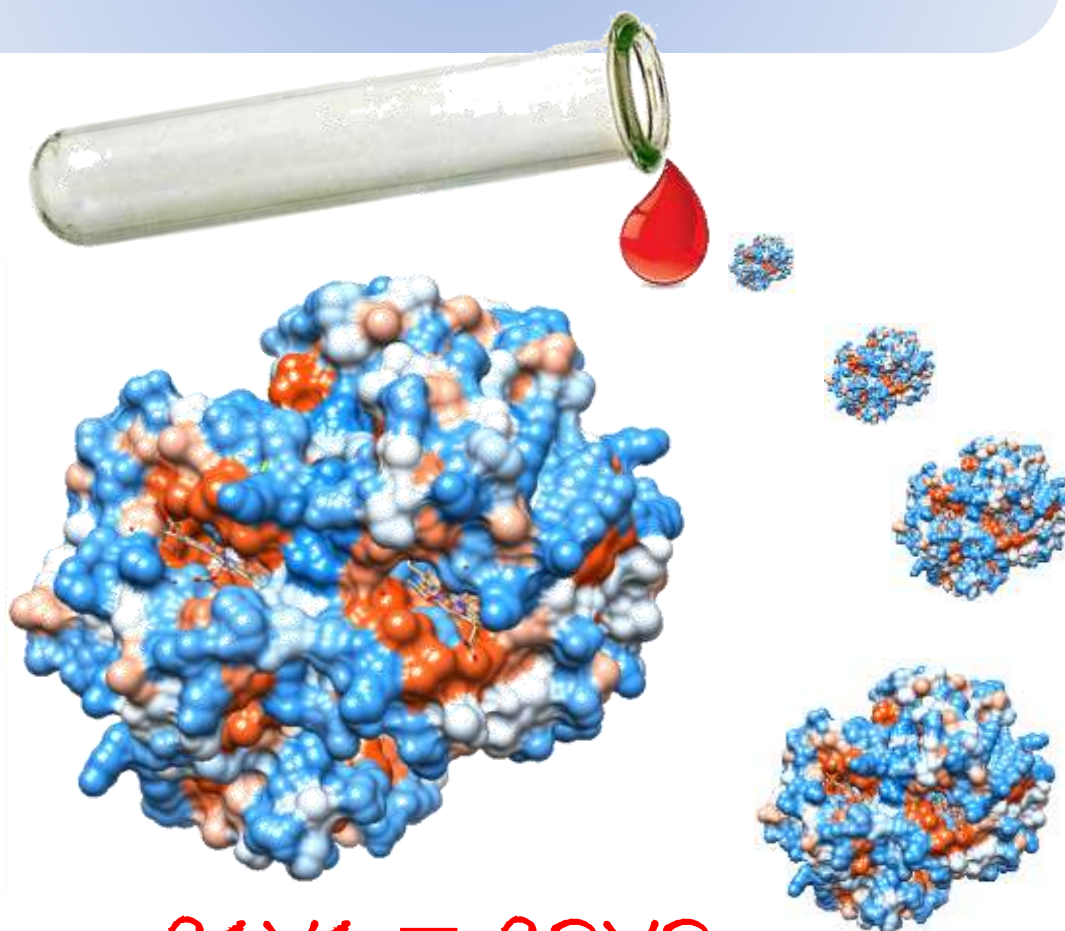
<http://ahdc.vet.cornell.edu/clinpath/modules/ua-sed/cells.htm>

Rieder H. Atlas of urinary sediments: Charles Griffin and Co.; 1899.

Murray K, Rodwell V, Bender D, Botham KM, Weil PA, Kennelly PJ. Harper's Illustrated Biochemistry. 28: New York: McGraw-Hill; 2009.

Serum Protein Electrophoresis Procedure – Helena. Available from:
www.helena.com/Procedures/Pro001Rev5.pdf

Medical and Clinical Biochemistry
Laboratory
For Medical Sciences Students
First Edition



$$C1V1 = C2V2$$

**Abdorrahim Absalan: PhD candidate of Clinical Biochemistry;
Faculty of Medical Sciences; Tarbiat Modares University**

Fereshteh Parto: MSc, Clinical Biochemistry

