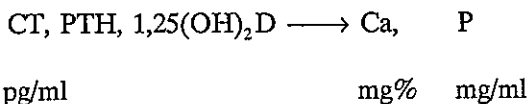


## ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΠΡΑΞΗ

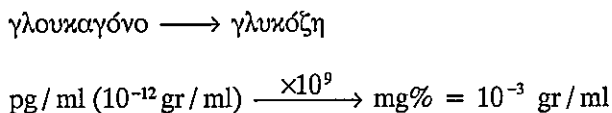
### Οι ορμόνες από ποσοτική άποψη<sup>1-4</sup>

Οι ορμόνες βρίσκονται σε παρά πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στο αίμα, της τάξεως του  $\text{ng/ml} = 10^{-9} \text{ gr/ml}$  ή  $\text{pg/ml} = 10^{-12} \text{ gr/ml}$ , αλλά επηρεάζουν την αύξηση ή την ελάττωση της συγκεντρώσεως βιομορίων στο αίμα που βρίσκονται φυσιολογικά σε παρά πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που φθάνουν 1.000.000-1.000.000.000 φορές παραπάνω. Π.χ. οι ορμόνες CT, PTH και  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  που μετρώνται σε  $\text{pg/ml}$  δηλαδή σε  $10^{-12} \text{ gr/ml}$  ρυθμίζουν την ομοιόσταση του Ca και P στο αίμα. Τα βιομόρια αυτά βρίσκονται σε συγκεντρώσεις της τάξεως του  $\text{mg}\% = 10^{-3} \text{ gr}\%$  και  $\text{mg/ml} = 10^{-3} \text{ gr/ml}$  αντίστοιχα, δηλαδή σε τιμές κατά  $10^9$  μεγαλύτερες από τις συγκεντρώσεις των ορμονών που τις ρυθμίζουν. Επομένως μια μεταβολή της συγκέντρωσης της CT ή της PTH ή της  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  προκαλεί τεράστια ( $10^9$  περισσότερα) μεταβολή στις συγκεντρώσεις στο αίμα του Ca και P τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν σαφή βιολογικά φαινόμενα, τα οποία ακολουθούνται από έντονα κλινικά συμπτώματα.

Δηλαδή



Το ίδιο συμβαίνει και με το γλουκαγόνο που ρυθμίζει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Δηλαδή:



Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι για τον προσδιορισμό των ορμονών στα βιολογικά υγρά του ανθρώπου πρέπει να χρησιμοποιούνται ευαίσθητες μέθοδοι, οι οποίες να μπορούν να μετρήσουν σταθερές συγκεντρώσεις των ορμονών στα παραπάνω υγρά αλλά και να μπορούν να κάνουν εμφανείς και μικρές μεταβολές αυτών, δηλαδή να έχουν καλή ευαισθησία.

Οι μέθοδοι που εφαρμόζουμε σήμερα για τον ποσοτικό προσδιορισμό ορμονών είναι κυρίως ανοσοβιολογικές. Δηλαδή στηρίζονται στην αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος και είναι<sup>1-4</sup>:

1. Ραδιοανοσοχημικές	RIA
2. Ραδιοανοσομετρικές	IRMA
3. Ενζυμοανοσολογικές	EIA
4. Χημειοφωταύγειας ή Ηλεκτροφωταύγειας	LIA ή ECL

RIA	= Radioimmunoassay
IRMA	= Immunoradiometric Assay
EIA	= Enzyme Immunoassay
LIA	= Luminescence Immunoassay
ECL	= Electrochemiluminescence

#### ΓΕΝΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ

Οι εξετάσεις RIA, IRMA, EIA, LIA και ECL βασίζονται στην αντιστρεπτή δέσμευση ενός βιομορίου S σε μια ειδική πρωτεΐνη R κατά την αντίδραση:



όπου  $k_1$  είναι η σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου S-R και  $k_2$  η σταθερά της ταχύτητας διάσπασης του συμπλόκου S-R. Η αντίδραση αυτή φτάνει κατά τη διάρκεια της επώασης των S και R σε κατάσταση ισορροπίας, οπότε σύμφωνα με το νόμο δράσης των μαζών ισχύει η σχέση<sup>4</sup>:

$$\frac{[S-R]}{[S][R]} = \frac{k_1}{k_2} = K_a$$

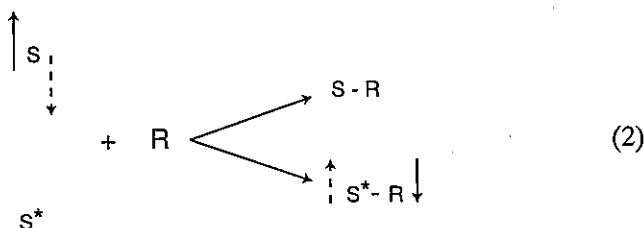
Η σταθερά ισορροπίας  $K_a$  εκφράζεται σε (mol/l)<sup>-1</sup> ή l/m.

#### α) Αρχή των ραδιοανοσοχημικών εξετάσεων (RIA)

Οι ραδιοανοσολογικές εξετάσεις (RIA) στηρίζονται όπως ήδη έχει αναφερθεί στην αντίδραση αντιγόνου → αντισώματος, ήτοι



Αν στα αντιδρώντα μόρια S και R προστεθεί το ίδιο βιομόριο αλλά επισημασμένο με ένα ραδιονουκλίδιο ( $S^*$ ), τότε η παραπάνω αντίδραση γίνεται:

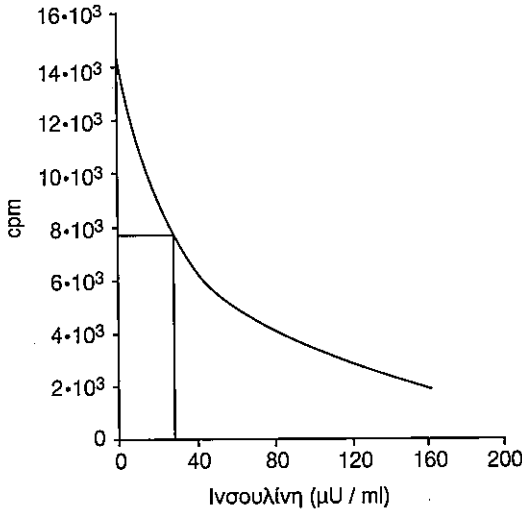


Όπου S είναι το βιομόριο εκείνο του οποίου ζητείται η συγκέντρωση ή γνωστό σταθερό ποσό αυτού,  $S^*$ : το ίδιο βιομόριο S αλλά επισημασμένο όπως αναφέρθηκε με  $^{125}\text{I}$  ή  $^3\text{H}$ . Όπου R είναι η ειδική πρωτεΐνη που έχει τη δυνατότητα να δεσμεύει σε κατάλληλες συνθήκες τα βιομόρια S και  $S^*$  και μπορεί να είναι: α) Αντισώματα που δεσμεύουν τα αντιγόνα S ή  $S^*$ . β) Υποδοχείς ορμονών (κυτταροϋποδοχείς) ή γ) Πρωτεΐνες ορού που δεσμεύουν εκλεκτικά τα βιομόρια S ή  $S^*$ . Διευκρινίζεται ότι: α) Η ποσότητα των ουσιών S και  $S^*$  που προστίθενται στην αντίδραση είναι πάντα σε μεγαλύτερη αναλογικά ποσότητα απ' αυτή που μπορεί να δεσμεύει το αντίσωμα R. β) Με τη σήμανση της S δε μεταβάλλεται η χημική συγγενεία της έναντι της R. Αυτό σημαίνει ότι η R δεσμεύει εξίσου το S και το  $S^*$ .

Όπως φαίνεται από την παραπάνω αντίδραση (2) τα μη επισημασμένα μόρια S ανταγωνίζονται τα επισημασμένα  $S^*$  για τον περιορισμένο αριθμό δεσμευτικών θέσεων που διαθέτει η R. Ως εκ τούτου όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μη επισημασμένων βιομορίων S (δηλαδή της ουσίας που ζητείται η συγκέντρωση), τόσο λιγότερα επισημασμένα βιομόρια  $S^*$  δεσμεύονται στην ειδική πρωτεΐνη R και επομένως το ποσό του επισημασμένου συμπλόκου  $S^*-R$  που σχηματίζεται θα είναι μικρότερο καθώς και το ποσό της ραδιενέργειας του  $S^*-R$ . Δηλαδή η συγκέντρωση της ουσίας S που ζητείται να μετρηθεί θα είναι αντιστρόφως ανάλογη της ραδιενέργειας του  $S^*-R$ . Κατ' αυτό τον τρόπο μετράται η ραδιενέργεια του  $S^*-R$  (αφού διαχωριστεί από τα ελεύθερα επισημασμένα βιομόρια  $S^*$  που δεν δεσμεύθηκαν) σε ένα μετρητή β ή γ ακτινοβολίας και εκφράζεται σαν αριθμός κρούσεων ανά λεπτό (cpm).

Με την προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων της πρότυπης ουσίας S (standard) παίρνουμε τις αντίστοιχες κρούσεις του  $S^*-R$  και σχηματίζουμε την καμπύλη αναφοράς, βάζοντας στον άξονα των τεταγμένων ( $x$ ) τις γνωστές συγκεντρώσεις και στον άξονα των τεταγμένων ( $y$ ) τις αντίστοιχες κρούσεις

(cpm). Με βάση την καμπύλη αυτή και ανάλογα με τον αριθμό κρούσεων των αγνώστων δειγμάτων προσδιορίζεται η συγκέντρωση αυτών<sup>5-6</sup> (Σχ. 1).



Ινσουλίνη (μU/ml)	Μέσοι όροι cpm
0	15300
10	11095
20	9150
40	6050
80	4050
160	1950
×	7800

*Σχήμα 1. Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς της ινσουλίνης. Από την καμπύλη αυτή προκύπτει ότι αν π.χ. για ένα άγνωστο δείγμα πήραμε μέσο όρο κρούσεων 7800/min, η συγκέντρωσή του θα είναι 29 μU/ml. Το ίδιο κάνουμε για όλα τα άγνωστα δείγματα<sup>4,5</sup>*

### β) Αρχή των ραδιοανοσομετρικών μεθόδων (immunoradiometric assays - IRMA)

Οι IRMA μέθοδοι στηρίζονται όπως και οι RIA στην ίδια αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος ( $S + R \longrightarrow S - R$ ), αλλά αντίθετα με τις RIA μεθόδους το ειδικό αντίσωμα R είναι σε περίσσεια έναντι του αντιγόνου. Επίσης, άλλη διαφορά είναι ότι χρησιμοποιείται και δεύτερο επισημασμένο (με ένα ραδιονουκλίδιο  $I^{125}$  ή  $^3H$ ) αντίσωμα  $R^*$  (σε περίσσεια), το οποίο δεσμεύει το ίδιο αντιγόνο S αλλά σε άλλη περιοχή ή όπως λέγεται σε άλλα επιτόπια, οπότε πλέον η μετρούμενη ραδιενέργεια του συμπλόκου  $R - S - R^*$  είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντιγόνου S (και όχι αντιστρόφως ανάλογη όπως στην περίπτωση των RIA).

Η σειρά των αντιδράσεων στις IRMA μεθόδους είναι η εξής:

