

- ΠΡΩΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ -

α. αιματολογία II



*Η εργαστηριακή ανάλυση,
για να προάγει την υγεία,
πρέπει να ερευνήσει την ασθένεια,
όπως η μουσική,
για να δημιουργήσει την αρμονία,
πρέπει να εξετάσει τη δυσαρμονία.*

ΠΛΟΥΤΑΡΧΟΣ

εργαστηριακός έλεγχος των αναιμιών



- 8.1 Εξετάσεις που αφορούν την ανίχνευση μιας αιμολυτικής αναιμίας
 - 8.1.1 Ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων
 - 8.1.2 Μέτρηση της ωσμωτικής αντίστασης των ερυθροκυττάρων
- 8.2 Εξετάσεις για διαταραχές της αιμοσφαιρίνης
 - 8.2.1 Βοηθητική τεχνική για το πλύσιμο των ερυθροκυττάρων
 - 8.2.2 Βοηθητική τεχνική παρασκευής αιμολύματος ερυθρών αιμοσφαιρίων με τολουόλη
 - 8.2.3 Βοηθητική τεχνική παρασκευής αιμολύματος για την ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης σε cellogel
 - 8.2.4 Ηλεκτροφόρηση
 - 8.2.5 Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε ταινία οξικής κυτταρίνης
 - 8.2.6 Δοκιμασία δρεπανώσεως των ερυθροκυττάρων
 - 8.2.7 Δοκιμασία διαλυτότητας της αιμοσφαιρίνης S

Όταν ολοκληρωθεί αυτή η ενότητα, θα έχεις τη δυνατότητα:

- ✓ να χρησιμοποιείς τις προηγούμενες γνώσεις για να κατανοήσεις τις νέες γνώσεις.
- ✓ να κατανοείς την αλληλουχία των βιολογικών αντιδράσεων που συμβαίνουν κατά την εξέλιξη της εργαστηριακής άσκησης.
- ✓ να παρασκευάζεις με ακρίβεια και ασφάλεια τα διαγνωστικά αντιδραστήρια.
- ✓ να επιλέγεις τα απαραίτητα σκεύη και υλικά για την ολοκλήρωση της ανάλυσης.
- ✓ να εκτελείς με ασφάλεια και αξιοπιστία τις διαγνωστικές εξετάσεις.
- ✓ να χειρίζεσαι με δεξιότητα τα όργανα και τα σκεύη των εργαστηριακών εξετάσεων.
- ✓ να συγκρίνεις τις τιμές των μετρήσεων με τις φυσιολογικές τιμές λαμβάνοντας υπόψη την ηλικία και το φύλο του ασθενή.
- ✓ να διατηρείς τον εργαστηριακό χώρο καθαρό.



Αν συναντήσεις λέξεις που δε γνωρίζεις τη σημασία τους, ψάξε πρώτα στο λεξιλόγιο και μετά ρώτησε τον καθηγητή σου.

8.1. Εξετάσεις που αφορούν την ανίχνευση μιας αιμολυτικής αναιμίας



Ας θυμηθούμε:

ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

"Αναιμία λέγεται η ελάττωση του ποσού της **αιμοσφαιρίνης**, της τιμής του **αιματοκρίτη** και, ενδεχομένως, και του αριθμού των **ερυθροκυττάρων** σε επίπεδα χαμηλότερα από τα κατώτερα φυσιολογικά όρια που αντιστοιχούν στην ηλικία και το φύλο του ατόμου."

Η διάγνωση μιας αναιμίας απαιτεί σχεδιασμό διαδοχικών εξετάσεων. Τα στοιχεία από μία μόνο εξέταση είναι αναξιόπιστα για τη διάγνωση. Η στρατηγική της διάγνωσης των αναιμιών περιλαμβάνει τους εξής στόχους:

A : Εξετάσεις που αφορούν τα ερυθροκύτταρα



Πρέπει να σημειωθεί ότι το φρεσκάρισμα των γνώσεων που έχουν ήδη αποκτηθεί, από το μάθημα "Αιματολογία Ι", είναι αναγκαία προϋπόθεση για το "κτίσιμο" των νέων γνώσεων.

B : Εξετάσεις για σίδηρο



Ο στόχος αυτός αναλύεται στο μάθημα "Βιολογικές και βιοχημικές εξετάσεις". Είναι απαραίτητος ο συνδυασμός των γνώσεων.

Γ : Εξετάσεις που αφορούν την ανίχνευση και την επιβεβαίωση μιας αιμολυτικής αναιμίας

Ο στόχος αυτός θα αναλυθεί στις ενότητες του βιβλίου αυτού.

Δ : Εξετάσεις για διαταραχές της αιμοσφαιρίνης

Και ο στόχος αυτός θα αναλυθεί στις ενότητες του βιβλίου αυτού.

Ε: Άλλες εξετάσεις που αφορούν τον έλεγχο της ποσότητας της βιταμίνη B12 και του φυλλικού οξέος

Κάθε στόχος του σχεδιασμού των εξετάσεων περιλαμβάνει πολλές διαγνωστικές τεχνικές.

Οι εργαστηριακές μέθοδοι συνεχώς τροποποιούνται εξαιτίας της ραγδαίας εξέλιξης της ιατρικής τεχνολογίας. Αυτοματοποιημένες ηλεκτρονικές συσκευές ολοκληρώνουν τους προσδιορισμούς με ταχύτητα και μεγάλη αξιοπιστία. Σε περιπτώσεις που εντοπίζονται παθολογικά ευρήματα κάνουμε επανέλεγχο των αποτελεσμάτων με κλασικές εργαστηριακές τεχνικές, οι οποίες ονομάζονται τεχνικές αναφοράς.

8.1.1 Ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων



Ας ανακαλέσουμε προηγούμενες γνώσεις:

Ώσμωση ονομάζεται η μετακίνηση ενός διαλύτη από ένα διάλυμα μικρότερης συγκέντρωσης προς ένα διάλυμα μεγαλύτερης συγκέντρωσης διαλυμένης ουσίας, όταν τα δύο διαλύματα διαχωρίζονται από μεμβράνη ημιδιαπερατή. Η μεμβράνη αυτή, εκλεκτικά, αποτρέπει το πέρασμα των μορίων της διαλυμένης ουσίας, αλλά επιτρέπει το πέρασμα του διαλύτη.

Αυτό γίνεται όταν η **ωσμωτική πίεση**, δηλαδή η πίεση που εξασκούν στη μεμβράνη τα μόρια της διαλυμένης ουσίας, είναι άνιση στις δύο πλευρές της μεμβράνης. Με την ώσμωση γίνεται προσπάθεια να εξισωθούν οι ωσμωτικές πιέσεις.

- **Συμβαίνει το φαινόμενο της ώσμωσης στον ανθρώπινο οργανισμό;**

Το φαινόμενο της ώσμωσης παίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε ορισμένα βιολογικά φαινόμενα όπως, στη φυσιολογία του κυττάρου.

Το ερυθρό αιμοσφαίριο παραμένει ακέραιο μέσα στο πλάσμα, επειδή το πλάσμα έχει την ίδια ωσμωτική πίεση με αυτό ($\pi=7,7\text{atm}$), είναι δηλαδή ισοτονικό. Ο φυσιολογικός ορός (διάλυμα NaCl 0,9%) ή το διάλυμα γλυκόζης 5,5% έχει την ίδια ωσμωτική πίεση με το αίμα, γι' αυτό χορηγείται με ασφάλεια ενδοφλέβια σε περιπτώσεις που χρειάζεται αναπλήρωση των υγρών του οργανισμού.

- **Τι θα συμβεί σε περίπτωση διαφορετικής ωσμωτικής πίεσης από τη φυσιολογική;**

α. Αν το ερυθροκύτταρο βρεθεί μέσα σε διάλυμα που έχει **μικρότερη ωσμωτική πίεση**, τότε περνάει υγρός διαλύτης

στο κύτταρο για να αραιώσει το εσωτερικό του. Έτσι, ο όγκος του μεγαλώνει και καταστρέφεται η κυτταρική του μεμβράνη.

Η αντοχή της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθροκυττάρων εξαρτάται από το σχήμα του κυττάρου και την ποιότητα της μεμβράνης. Όσο αυξάνει το πάχος του κυττάρου τόσο η ωσμωτική του αντίσταση ελαττώνεται. Όσο μικραίνει το πάχος του κυττάρου τόσο η ωσμωτική του αντίσταση αυξάνεται. Σε παθολογικές καταστάσεις η κυτταρική μεμβράνη παρουσιάζει μειωμένη αντοχή σε περιβάλλον που ασκεί μεγάλη εξωκυττάρια πίεση.

Στα σφαιροκύτταρα αρκεί το πέρασμα μικρής ποσότητας διαλύματος για να προκαλέσει διόγκωση του κυττάρου και καταστροφή της κυτταρικής του μεμβράνης.

β. Αν το ερυθροκύτταρο βρεθεί σε διάλυμα με **μεγαλύτερη ωσμωτική πίεση**, υγρό του κυττάρου θα μετακινηθεί προς τα έξω και έτσι το κύτταρο θα συρρικνωθεί.

8.1.2 Μέτρησης της ωσμωτικής αντίστασης των ερυθροκυττάρων

Σε ποιες περιπτώσεις χρειάζεται να γίνει η μέτρηση;

Το όριο αντοχής της κυτταρικής μεμβράνης είναι διαφορετικό σε κάθε παθολογική κατάσταση και αποτελεί διαγνωστικό στοιχείο για:

- ▶ Επίκτητη αιμολυτική αναιμία
- ▶ Κληρονομική σφαιροκυττάρωση
- ▶ Σιδηροπενική αναιμία
- ▶ Αιμολυτική νόσο του νεογνού
- ▶ Αιμοσφαιρινοπάθεια S
- ▶ Θαλασσαιμία
- ▶ Ηπατοπάθειες
- ▶ Σπληνεκτομή
- ▶ Μακροκυττάρωση

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ελέγχεται η ανθεκτικότητα της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, όταν αυτά βρεθούν σε περιβάλλον υποτονικό.

Στην ίδια αρχή στηρίζεται και η μέθοδος της ωσμωτικής αντίστασης των ερυθροκυττάρων μετά από 24ωρη επώαση σε θερμοκρασία 37° C.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε φλεβικό αίμα σε οξαλικό κάλιο.



Η εξέταση πρέπει να γίνει σε 2 ώρες από την αιμοληψία.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Μητρικό διάλυμα ισοδύναμο προς διάλυμα 10% χλωριούχου νατρίου: Το διάλυμα παρασκευάζεται διαλύοντας 18g χλωριούχο νάτριο, 3.423g ένυδρο μονόξινο φωσφορικό νάτριο ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) και 0.376g ένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) σε απιονισμένο νερό και αραιώνοντας μέχρι τελικό όγκο 200ml. Το διάλυμα συντηρείται στους $\pm 4^\circ\text{C}$ μέσα σε πωματισμένη ογκομετρική φιάλη.

2. Απιονισμένο νερό

- | | |
|-------------|----------------------------------------|
| ζυγός | γάντια |
| φυγόκεντρος | ποτήρι ζέσεως |
| επιτραπέζιο | ογκομετρική φιάλη |
| χρονόμετρο | έδρανο στήριξης των σωληναρίων |
| φωτόμετρο | (στατώ) |
| | δοκιμαστικά σωληνάρια αιμολύσεως |
| | αυτόματες πιπέτες |
| | υαλογράφος |
| | χαρτί με υποδιαίρεσεις χιλιοστόμετρου |
| | ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10 |

**ΟΡΓΑΝΑ,
ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ**

Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα ρύγχαι σε διάλυμα χλωρίνης. Το υποχλωριώδες νάτριο, αδρανοποιεί τα ενζυμικά συστήματα των ιών και των βακτηρίων. Τα αφήνουμε 30 λεπτά της ώρας και κατόπιν τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Αραιώνουμε μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml, 88 ml απιονισμένο νερό και 12 ml από το μητρικό διάλυμα. Συνεχίζουμε και τις υπόλοιπες αραιώσεις με αναλογίες όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.



Καλό είναι η παρασκευή να ξεκινάει από το διάλυμα με τη μικρότερη πυκνότητα σε χλωριούχο νάτριο και να προχωρεί προς το διάλυμα με τη μεγαλύτερη πυκνότητα σε χλω-



ριούχο νάτριο. Έτσι μπορούμε να χρησιμοποιούμε για την παρασκευή των αραιώσεων την ίδια ογκομετρική φιάλη. Οι διαδοχικές αραιώσεις του κλωριούχου νατρίου (NaCl) πρέπει να γίνονται με ακρίβεια για την επιτυχία της εξέτασης.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ	ΔΙΑΛΥΜΑ NaCl 10%	ΑΠΙΟΝΙΣΜΕΝΟ ΝΕΡΟ	ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ NaCl / 100 ml
1	12	88	1.2
2	10	90	1.0
3	9.0	91	0.9
...
11	6.0	94	0.6
12	5.75	94.25	0.575
13	5.5	94.5	0.55
14	5	95	0.5
15	4.75	95.25	0.475
16	4.5	95.5	0.45
17	4.25	95.75	0.425
18	4.0	96.0	0.4
...
22	1.0	99	0.10

Ο αριθμός των αραιώσεων είναι διαφορετικός σε κάθε διαγνωστικό εργαστήριο. Εξαρτάται από το είδος της πάθησης που κάθε φορά διερευνάται. Περισσότερο συνηθισμένος είναι ο αριθμός των 6, των 10 και των 12 αραιώσεων, μέσα όμως στο εύρος των τιμών που αναζητούνται οι περισσότερες παθολογικές καταστάσεις. Οι ενδιάμεσες αραιώσεις, όπως, π.χ, οι αραιώσεις 15, 16, 17, κ.λπ. χρησιμοποιούνται για τον ακριβή προσδιορισμό έναρξης της αιμόλυσης, στοιχείο απαραίτητο για τη διάγνωση.

Μπορούμε να αυξήσουμε την ευαισθησία της μεθόδου, επωάζοντας το δείγμα σε θερμοκρασία 37°C για 24 ώρες.



Χρήσιμο είναι να κρατάμε από κάθε αραιώση 50 ml σε θερμοκρασία 40°C, για τυχόν επανέλεγχο. Οι αραιώσεις διατηρούνται σταθερές για αρκετές εβδομάδες.

2. Αριθμούμε 6, 10, 12 ή 20 δοκιμαστικά σωληνάρια αιμολύσεως και σημειώνουμε κωδικοποιημένα τα στοιχεία του ασθενή.



Τα σωληνάρια των αραιώσεων ενός δείγματος (ασθενούς) να μην μπερδευτούν με τα σωληνάρια των αραιώσεων άλλου δείγματος (ασθενούς).

3. Βάζουμε 5 ml από κάθε αραιώση στο αντίστοιχο σωληνάριο.

4. Προσθέτουμε 0.5 ml ή 0.02 ml δείγματος και αναρροφούμε 3 φορές από το διάλυμα για να γίνει η ανάμειξη.



Πετάμε το ρύγχος στο διάλυμα κλωρίνης. Το υποκλωριώδες νάτριο που είναι το συστατικό της κλωρίνης αδρανοποιεί τα ενζυμικά συστήματα των ιών και των βακτηρίων. Στο τέλος της άσκησης τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο. Έτσι σταματάμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων.

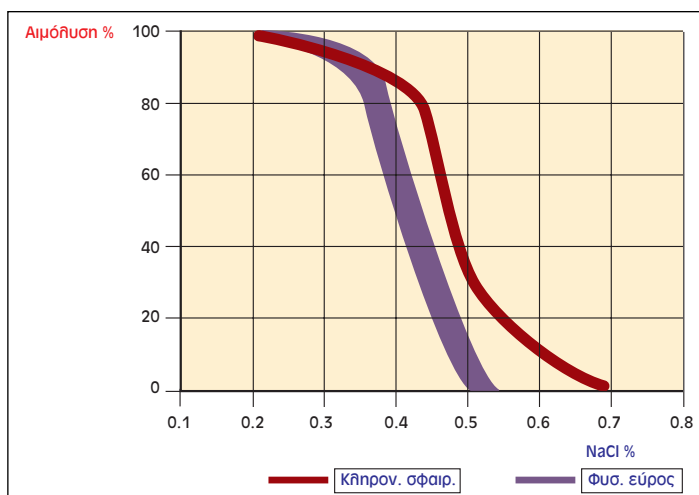
Τα σωληνάρια παραμένουν σε ηρεμία σε θερμοκρασία 20°C για 30 λεπτά της ώρας. Έγστερα:

5. Ανακινούμε ήπια.

6. Φυγοκεντρούμε στις 2000 στρ / λεπτό για 5 λεπτά της ώρας.

7. Εξετάζουμε την όψη του υπερκείμενου κάθε αραιώσης, και συγκρίνουμε την όψη της αιμόλυσής του σε σχέση με την όψη της πλήρους αιμόλυσης του υπερκείμενου (αραίωση 22).

8. Προσδιορίζουμε το βαθμό αιμόλυσης με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του υπερκείμενου υγρού σε μήκος κύματος 540nm. Για το μηδενισμό του φωτομέτρου χρησιμοποιούμε το υπερκείμενο υγρό της αραιώσης 3.



Εικόνα 8.1: Καμπύλη γραφικής παράστασης ευθραυστότητας ερυθροκυττάρων

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αιμόλυση

Η απάντηση δίνεται:

α. Με την καμπύλη γραφικής παράστασης. Στον κάθετο άξονα σημειώνουμε τις τιμές αιμόλυσης % και στον οριζόντιο τις αραιώσεις του χλωριούχου νατρίου σε g/l.

Το επί τοις % της αιμόλυσης κάθε δοκιμαστικού σωληναρίου υπολογίζεται με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ αιμόλυση} = \frac{\text{οπτική πυκνότητα υπερκειμένου}}{\text{οπτική πυκνότητα με 100\% αιμόλυση}} \times 100$$

β. Ορίζεται η πυκνότητα NaCl που δίνει την αρχή της αιμόλυσης και η πυκνότητα NaCl που δίνει ολική αιμόλυση (δεν υπάρχουν ερυθρά αιμοσφαίρια στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωληναρίου).

ΕΡΜΗΝΕΙΑ

• Τι σημαίνει ότι το ερυθροκύτταρο αιμολύθηκε;

Το ερυθρό αιμοσφαίριο βρέθηκε σε διάλυμα που έχει μικρότερη ωσμωτική πίεση από αυτό. Από την κυτταρική του μεμβράνη πέρασε μέσα στο κύτταρο νερό του διαλύματος με αποτέλεσμα το κύτταρο να διογκωθεί. Η διογκωση αυτή υπερβαίνει το όριο αντοχής της κυτταρικής του μεμβράνης με αποτέλεσμα η μεμβράνη να καταστραφεί (αιμόλυση).

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ

Καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθροκυττάρων 50 % συμβαίνει σε πυκνότητα χλωριούχου νατρίου από 0,40 % - 0,45 %.

Σε μεγαλύτερη πυκνότητα $\text{NaCl} > 5,8 \%$ - $6,4 \%$ γίνεται αιμόλυση παθολογικών κυττάρων και υποδηλώνονται σοβαρές ασθένειες, όπως επίκτητη αιμολυτική αναιμία, κληρονομική σφαιροκυττάρωση κ.ά.

Σε μικρότερη πυκνότητα $\text{NaCl} < 0,30 \%$ η αιμόλυση υποδηλώνει στοχοκυττάρωση σιδηροπενική αναιμία, αιμοσφαιρινοπάθεια Cuais κ.λπ.

8.2. Εξετάσεις για διαταραχές της αιμοσφαιρίνης

Για να γίνει η ανίχνευση των αιμοσφαιρινικών διαταραχών, το δείγμα πρέπει πρώτα να το επεξεργαστούμε ακολουθώντας τις παρακάτω βοηθητικές τεχνικές και στη συνέχεια να το ηλεκτροφορίσουμε.

8.2.1 Βοηθητική τεχνική για το πλύσιμο των ερυθροκυττάρων

Το πλύσιμο των ερυθροκυττάρων χρειάζεται να γίνει για πολλαπλές διαγνωστικές εξετάσεις, όπως **παρασκευή αιμολύματος, δοκιμασία διασταύρωσης**, κ.λπ.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια δεν καταστρέφονται όταν βρεθούν σε ισότονο διάλυμα 0.9 % χλωριούχου νατρίου (NaCl). Μπορούν όμως να διαχωριστούν από το πλάσμα και τα άλλα έμμορφα στοιχεία του αίματος με φυγοκέντρηση.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε 5 ml φλεβικό αίμα σε EDTA.



Η ανάμειξη του αίματος με το αντιπηκτικό και η ανακίνηση του σωληναρίου κατά τη διαδικασία πρέπει να γίνονται με ήπιες κινήσεις.



Η μεταφορά του αίματος από τη σύριγγα στο φιαλίδιο συλλογής του δείγματος γίνεται με αργή ροή, κατά μήκος του τοιχώματος του φιαλιδίου, αφού αφαιρεθεί η βελόνα.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ**Διάλυμα 0.9 % χλωριούχου νατρίου** (φυσιολογικός ορός).**ΟΡΓΑΝΑ,
ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ**

- | | |
|---------------|------------------------------------------|
| 🔧 φυγόκεντρος | 🧤 γάντια |
| 🔧 επιτραπέζιο | 🔧 υαλογράφος |
| 🕒 χρονόμετρο | 🔧 έδρανο στήριξης των σωληναρίων |
| | 🔧 δοκιμαστικό σωληνάριο αιμοηύσεως |
| | 🔧 σифώνια Pasteur |
| | 🔧 ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10 |



Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα σифώνια σε διάλυμα χλωρίνης. Τα αφήνουμε 30 λεπτά της ώρας και κατόπιν τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Σημειώνουμε τα στοιχεία του ασθενή επάνω σε ένα δοκιμαστικό σωληνάριο αιμοηύσεως και μεταφέρουμε το δείγμα.
2. Φυγοκεντρούμε το σωληνάριο στις 2000 στροφές / λεπτό για 20 λεπτά της ώρας.



Τα συστατικά του αίματος θα διαχωριστούν με ευκρίνεια ακολουθώντας πιστά τους κανόνες της φυγοκέντρησης.

3. Αφαιρούμε το πλάσμα με σифώνιο Pasteur.



Πετάμε το σифώνιο μέσα στο διάλυμα της χλωρίνης. Το πλάσμα είναι βιολογικό υγρό και γι' αυτό ο κίνδυνος για τη μετάδοση λοιμώξεων είναι μεγάλος.

4. Προσθέτουμε άφθονη ποσότητα ισότονου διαλύματος 0.9 % χλωριούχου νατρίου, με σифώνιο Pasteur.
5. Ανακινούμε με απαλές κινήσεις για να μη σπάσουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια (αιμόλυση).
6. Φυγοκεντρούμε στις 2000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά της ώρας.
7. Αφαιρούμε το υπερκείμενο με άηθο σифώνιο Pasteur.



Οι αναρροφήσεις κατά την επανάληψη γίνονται με καθαρό σифώνιο Pasteur. Όλα τα χρησιμοποιημένα σифώνια αφού παραμείνουν 30 λεπτά της ώρας στο διάλυμα της χλωρίνης, τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.

Επαναλαμβάνουμε τα στάδια Νο 4, 5, 6 και 7 μέχρι το υπερκείμενο να είναι διαυγές.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια που μένουν στο κάτω μέρος του σωληναρίου μετά την τελευταία φυγοκέντρηση είναι απομονωμένα από τα άλλα στοιχεία του αίματος και συμπυκνωμένα.

8.2.2 Βοηθητική τεχνική παρασκευής αιμολύματος ερυθρών αιμοσφαιρίων με τολουόλη

Η βοηθητική αυτή τεχνική είναι χρήσιμη όταν:

- ▶ δεν πραγματοποιείται άμεσα η ηλεκτροφόρηση
- ▶ απαιτείται επανέλεγχος ή περαιτέρω έλεγχος.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε πηυμένα ερυθρά αιμοσφαίρια.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Απιονισμένο νερό: Έχει αιμολυτική δράση.

2. Τολουόλη: Έχει αιμολυτική δράση.



ΠΡΟΣΟΧΗ !

Η τολουόλη είναι εύφλεκτη, καυστική και τοξική ουσία.

3. Κυανιούχο διάλυμα: Το διάλυμα παρασκευάζεται με τη διάλυση 0.2 g KCN μέσα σε 1000 ml απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αυτό χρησιμεύει για τη συντήρηση του αιμολύματος στην κατάψυξη για 30 ημέρες.



ΠΡΟΣΟΧΗ !

Το κυανιούχο κάλιο όταν έρθει σε όξινο περιβάλλον εκλύει δηλητηριώδες αέριο. Αποφεύγουμε την επαφή του αντιδραστήριου με το δέρμα και την εισπνοή των ατμών του.

**ΟΡΓΑΝΑ,
ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ**

- 🔧 αναδευτήρας (Vortex)
- 🔧 φυγόκεντρος
- 🔧 ζυγός
- 🔧 επιτραπέζιο χρονόμετρο
- 🔧 γάντια
- 🔧 υαλογράφος
- 🔧 έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων
- 🔧 δοκιμαστικά σωληνάρια αιμοιύσεως
- 🔧 σιφώνια Pasteur
- 🔧 χωνί
- 🔧 διηθητικό χαρτί (Whatman No 1)
- 🔧 ογκομετρικός κύλινδρος
- 🔧 ογκομετρική φιάλη
- 🔧 ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10



Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα σιφώνια σε διάλυμα χλωρίνης. Τα αφήνουμε 30 λεπτά της ώρας και κατόπιν τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.

1. Σημειώνουμε με υαλογράφο τα στοιχεία του ασθενή και την ένδειξη I, II σε δύο σωληνάρια αιμοιύσεως και βάζουμε στο "I" μια ποσότητα πλυμένων αιμοσφαιρίων.

**Υπενθύμιση:**

Πετάμε το σιφώνιο στο διάλυμα χλωρίνης.

2. Προσθέτουμε απιονισμένο νερό σε όγκο διπλάσιο του όγκου των ερυθροκυττάρων.

3. Ανακινούμε ισχυρά στον αναδευτήρα (Vortex).

4. Τοποθετούμε το σωληνάριο στο έδρανο, όπου παραμένει 30 λεπτά της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου.

5. Προσθέτουμε 1 όγκο τοιουόλης.

**ΠΡΟΣΟΧΗ !**

Η τολουόλη είναι εύφλεκτη, καυστική και τοξική ουσία.

6. Ανακινούμε το σωληνάριο στον αναδευτήρα (Vortex) για 2-3 λεπτά της ώρας. Τα ερυθροκύτταρα αιμοηύονται και ελευθερώνεται η αιμοσφαιρίνη τους.

7. Φυγοκεντρούμε στις 1200 στροφές / λεπτό για 30 λεπτά της ώρας. Τα συστατικά διαχωρίζονται σε τρεις στοιβάδες. Οι στοιβάδες από κάτω προς τα πάνω είναι:

1η στοιβάδα: Διάλυμα αιμοσφαιρίνης (αιμόλυμα).

2η στιβάδα: Κυτταρικές μεμβράνες κατεστραμμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων και

3η στοιβάδα: Τοθουόλη

8. Τοποθετούμε το σωληνάριο στο έδρανο.



ΠΡΟΣΟΧΗ !

Να μην ανακατευτούν οι στοιβάδες μεταξύ τους.

9. Εφαρμόζουμε διηθητικό χαρτί – φίλτρο σε ένα κωνί και το τοποθετούμε επάνω στο σωληνάριο.



Το κωνί πρέπει να είναι όσο γίνεται μικρότερο για να μη συγκρατήσει το διηθητικό χαρτί την παραμικρή ποσότητα αιμολύματος.

10. Διαβρέχουμε με ελάχιστο απιονισμένο νερό το φίλτρο αμέσως πριν από τη διήθηση.

11. Παίρνουμε ένα σιφώνιο Pasteur. Πιέζουμε το πουάρ για να φύγει όλος ο αέρας.

α. Βυθίζουμε το ρύγχος του μέχρι τον πυθμένα, διαπερνώντας διαδοχικά τη στοιβάδα της τοθουόλης και τη στοιβάδα των μεμβρανών.



ΠΡΟΣΟΧΗ !

Κρατάμε σταθερή την πίεση στο πουάρ.

β. Αναρροφούμε το αιμόλυμα, ελαττώνοντας σιγά – σιγά την πίεση στο πουάρ.



ΠΡΟΣΟΧΗ !

Κατά την έξοδο προσέχουμε να μην αναρροφήσουμε υλικό από τις άλλες δύο στοιβάδες.

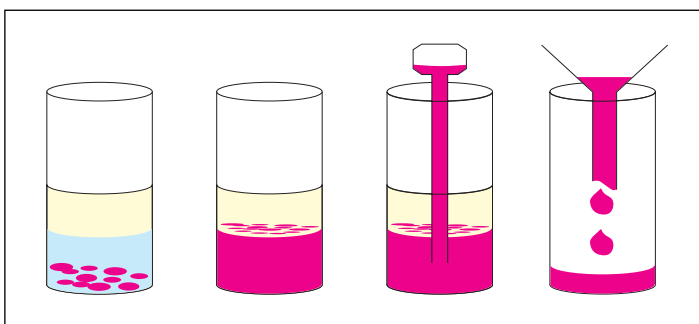


Πετάμε το σιφώνιο στο διάλυμα κλωρίνης. Μετά το τέλος της άσκησης πετάμε τα σιφώνια στο απορριμματοδοχείο.

12. Ρίχνουμε το αιμόλυμα στο φίλτρο. Το αιμόλυμα διηθείται. Μετά τη διήθηση, καθαρό πηέον, είναι έτοιμο για οποιαδήποτε διαγνωστική εξέταση ακολουθήσει.



Εάν πρόκειται να κρατηθεί το δείγμα του αιμολύματος στην κατάψυξη, τότε θα πρέπει η αιμοσφαιρίνη να μετατραπεί σε κυανομεθαιμοσφαιρίνη, με την προσθήκη δύο σταγόνων κυανιούχου διαλύματος ανά 3 ml αιμολύματος. Διατηρείται στους $\pm 4^{\circ}\text{C}$ για μερικές ημέρες και στους -20°C για αρκετές εβδομάδες.



Εικόνα 8.2: Παρασκευή αιμολύματος με τοθουόλη

8.2.3 Βοηθητική τεχνική παρασκευής αιμολύματος για την ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης σε cellogel

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Στην απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης, που περιέχεται σε κάθε ερυθροκύτταρο μετά την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης του. Η πυκνότητα της αιμοσφαιρίνης στο διάλυμα, το οποίο λέγεται αιμόλυμα, μπορεί να μετρηθεί.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε 2.5 ml φλεβικό αίμα σε EDTA.

Είναι αναγκαίο να γνωρίζουμε το ποσό της αιμοσφαιρίνης στο δείγμα, πριν γίνει η επεξεργασία του αιμολύματος.



Η ανάμειξη του αίματος με το αντιπηκτικό και η ανακίνηση του σωληναρίου κατά τη διαδικασία πρέπει να γίνουν με ήπιες κινήσεις.



Η μεταφορά του αίματος από τη σύριγγα στο φιαλίδιο συλλογής του δείγματος γίνεται με αργή ροή του, κατά μήκος του τοιχώματος του φιαλιδίου, αφού αφαιρεθεί η βελόνα.



Οι αναλογίες μεταξύ αίματος και αντιπηκτικού τηρούνται αυστηρά, όπως αυτές αναγράφονται στα φιαλίδια της συλλογής του αίματος.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Νιτρικό νάτριο (NaNO_3) 2 g σε 1 lt φυσιολογικό ορό.

2. Κυανιούχο κάλιο (KCN) 1 g σε 1t φυσιολογικό ορό.



ΠΡΟΣΟΧΗ !

Το κυανιούχο κάλιο όταν έρθει σε όξινο περιβάλλον εκλύει δηλητηριώδες αέριο. Αποφεύγουμε την επαφή του αντιδραστηρίου με το δέρμα και την εισπνοή των ατμών του.

3. Φυσιολογικός ορός 0.9 % (Sodium Chloride, NaCl).

4. Απιονισμένο νερό.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ

- 🔧 φυγόκεντρος
- 🔧 αναδευτήρας (Vortex)
- 🔧 επιτραπέζιο χρονόμετρο
- 🔧 ζυγός

- 🧤 γάντια
- 🔧 υαλογράφος
- 🔧 έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων
- 🔧 ογκομετρικό κωνικό σωληνάριο
- 🔧 αυτόματες πιπέτες
- 🔧 ογκομετρικός κύλινδρος
- 🔧 σιφώνια Pasteur
- 🔧 ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10



Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα σιφώνια και τα ρύγχοι σε διάλυμα χλωρίνης. Τα αφήνουμε 30 λεπτά της ώρας και κατόπιν τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Σημειώνουμε τα στοιχεία του ασθενή επάνω σε ένα ογκομετρικό κωνικό σωληνάριο και βάζουμε μέσα 15 ml διάλυμα NaNO_3 .

2. Προσθέτουμε 0.2 ml από το δείγμα.



Τηρούμε τις αναλογίες με ακρίβεια για τη βιοχημική μετατροπή της αιμοσφαιρίνης σε μεθαιμοσφαιρίνη.



Πετάμε το ρύγχος στο διάλυμα της χλωρίνης για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων.

3. Φυγοκεντρούμε στις 2000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά.

4. Πετάμε το υπερκείμενο με μια απότομη ανάστροφη κίνηση του σωληναρίου στο νιπτήρα.

5. Προσθέτουμε κυανιούχο κάλιο σε ποσότητα ίση με τον όγκο των ερυθροκυττάρων.



Εάν δεν τηρηθούν οι αναλογίες μεταξύ δείγματος και αντιδραστήριου δεν θα γίνει ολοκληρωμένη μετατροπή της μεθαιμοσφαιρίνης σε κυανομεθαιμοσφαιρίνη.

6. Φυγοκεντρούμε στις 2000 στροφές / λεπτό για 5 λεπτά της ώρας.

7. Πετάμε το υπερκείμενο με μια απότομη ανάστροφη κίνηση του σωληναρίου στο νιπτήρα.

8. Προσθέτουμε απιονισμένο νερό σε ποσότητα (V) ίση με το 1/10 της αιμοσφαιρίνης του αρχικού δείγματος. Δηλαδή, εάν η Hb είναι 12 g/dl ο όγκος του απιονισμένου νερού θα είναι 1.2 ml.

9. Πωματίζουμε και ανακινούμε το σωληνάριο στον αναδευτήρα (Vortex) για 20 λεπτά της ώρας.

Το αιμόλυμα είναι έτοιμο για την τεχνική της ηλεκτροφόρησης.



Διατηρείται στους $\pm 4^\circ\text{C}$ για 7 ημέρες.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Έντονο κόκκινο χρώμα.

**ΕΡΜΗΝΕΙΑ
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Η μεμβράνη των ερυθροκυττάρων σπάζει και ελευθερώνεται η περιεχόμενη αιμοσφαιρίνη. Μόλις έρθει σε επαφή με το NaNO_3 , μετατρέπεται σε μεθαιμοσφαιρίνη και μετά σε κυανομεθαιμοσφαιρίνη με την επίδραση του KCN . Η κυανομεθαιμοσφαιρίνη είναι ουσία βιοχημικά σταθερή, γι' αυτό χρησιμοποιείται περισσότερο στην αιμοσφαιρινομετρία.

8.2.4 Ηλεκτροφόρηση

Ας ανακαλέσουμε προηγούμενες γνώσεις:

ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

Η ηλεκτροφόρηση αναφέρεται στη μετακίνηση κάθε υλικού στοιχείου που φέρει ηλεκτρικό φορτίο, όταν βρίσκεται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.

Μόρια που φέρουν ηλεκτρικό φορτίο θα μετακινηθούν ανάλογα με αυτό, είτε προς την **κάθοδο (-)** είτε προς την **άνοδο (+)** του ηλεκτροφοριστικού συστήματος. Μέσα σε διάλυμα πιο όξινο από το ισοηλεκτρικό σημείο της ουσίας, η ουσία αποκτά θετικό φορτίο και μετακινείται προς την κάθοδο (-). Αντίθετα σε διάλυμα πιο βασικό από το ισοηλεκτρικό σημείο της ουσίας, η ουσία θα αποκτήσει αρνητικό φορτίο και θα μετακινηθεί προς την άνοδο (+).

Η ταχύτητα αυτής της μετακίνησης εξαρτάται από:

1. Την ισχύ του ηλεκτρικού ρεύματος
2. Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος
3. Τη θερμοκρασία του συστήματος
4. Το υλικό της ταινίας
5. Το ηλεκτρικό φορτίο του μορίου

• **Πώς αξιοποιείται η αρχή της ηλεκτροφόρησης στην εργαστηριακή ανάλυση;**



Ας συνδεθούμε με τη Βιοχημεία:

α. Οι πρωτεΐνες έχουν **αμφολυτική ιδιότητα**, δηλαδή παρουσιάζουν θετικό ή αρνητικό φορτίο ανάλογα με το pH του διαλύματος μέσα στο οποίο θα βρεθούν και

β. Η αιμοσφαιρίνη είναι μία **πρωτεΐνη του αίματος(αιμο-**

πρωτεΐνη). Το μόριο της αποτελείται από τη σφαιρίνη, με τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες σε δύο ζεύγη και την αίμη με τέσσερα μόρια σιδηροπορφυρίνης. Η μετακίνηση, λιοπόν, των πρωτεϊνικών μορίων της κατά την ηλεκτροφόρηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση και ανίχνευση φυσιολογικών και παθολογικών αιμοσφαιρινών.

Η αιμοσφαιρίνη **A**, **A₂** (τύποι ενήλικα) και η αιμοσφαιρίνη **F** (εμβρυϊκή) είναι οι συνηθισμένες φυσιολογικές αιμοσφαιρίνες.

Από τους διαφόρους τύπους παθολογικής αιμοσφαιρίνης, οι πιο γνωστοί είναι η αιμοσφαιρίνη **S** (υπεύθυνη για την δρεπανοκυτταρική αναιμία) και η αιμοσφαιρίνη **H** (α-Μεσογειακή αναιμία). Πάνω από 350 ποικιλίες αιμοσφαιρίνης έχουν ταυτοποιηθεί.

• **Τι χρειαζόμαστε για να γίνει η ηλεκτροφόρηση;**

Οι συσκευές της ηλεκτροφόρησης είναι πολλές. Βασικά όμως αποτελούνται από

- το ηλεκτροφορητικό θεκανίδιο – ρουτρό
- τη συσκευή παροχής ηλεκτρικού ρεύματος
- το διανομέα του δείγματος

Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι ηλεκτροφόρησης, ανάλογα με το pH του ρυθμιστικού διαλύματος και το υλικό υποστήριξης (υπόστρωμα) που χρησιμοποιείται.

Τα διάφορα υποστρώματα έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:


ΕΙΔΟΣ ΥΠ/ΤΟΣ	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ	ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
Χαρτί	<ul style="list-style-type: none"> – Εύχρηστο – Φθηνό 	<ul style="list-style-type: none"> – Μετουσιώνεται η αιμοσφαιρίνη – Ελλιπής διαχωρισμός των αιμοσφαιρινικών κλάσμάτων – Μεγάλη διάρκεια (14 –16 ώρες) – Απορροφά το δείγμα – Μεγάλη ποσότητα δείγματος

Αγαρ – ζελατίνη	– Διαθέσιμο σε πρώτη ζήτηση	– Μικρή απορρόφηση του δείγματος – Μεγάλη ποσότητα δείγματος – Μεγάλη διάρκεια
Οξική κυτταρίνη	– Μικρή ποσότητα δείγματος – Μικρή διάρκεια (≈1 ώρα)	– Ακριβή – Δε διαχωρίζει με ευκρίνεια την αιμο- σφαιρίνη Α από την αιμοσφαιρίνη F

Πίνακας 8.1: Είδη υποστρωμάτων ηλεκτροφόρησης

Εάν κατά την ηλεκτροφόρηση η ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός κλάσματος συμπίπτει με τη θέση άηλου κλάσματος, τότε γίνεται διερεύνηση σε όξινο pH.

Οι αιμοσφαιρίνες έχουν άηλη ηλεκτροφορητική συμπεριφορά σε όξινο και άηλη σε αλκαλικό pH του ρυθμιστικού διαλύματος, όπως φαίνεται στον πίνακα:

ΟΞΙΝΟ pH					ΒΑΣΙΚΟ pH				
κάθοδος (-)		άνοδος (+)			σταγόνα αίματος	άνοδος (+)		κάθοδος (-)	
F	A, A ₂ , D, E, G, H	O	S	C		H	A	F	S, G, D A ₂ , C, E, O
									

Πίνακας 8.2: Ηλεκτροφορητική συμπεριφορά αιμοσφαιρινών σε διαφορετικό pH

8.2.5 Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε ταινία οξικής κυτταρίνης

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Μικρή ποσότητα αιμοσφαιρίνης η οποία είναι μείγμα πρωτεϊνών, όταν βρεθεί σε ηλεκτρικό πεδίο και **αλκαλικό περι-**

βάλλον ιονίζεται και διαχωρίζεται στα κλάσματα από τα οποία αποτελείται. Ο διαχωρισμός φαίνεται με τη μετακίνηση των μορίων προς τα ηλεκτρόδια.

Η κατεύθυνση και η ταχύτητά της μετακίνησης εξαρτάται από το **φορτίο** των μορίων και το **μοριακό τους βάρος**.

Αν διακόψουμε την παροχή του ηλεκτρικού ρεύματος και χρωματίσουμε τα κλάσματα επάνω σε υπόστρωμα οξικής κυτταρίνης, θα παρατηρήσουμε **κάθετες γραμμώσεις**. Το πάχος, η ένταση του χρώματος και η θέση των γραμμώσεων εξαρτάται από τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης.

ΔΕΙΓΜΑ

Αιμόλυμα φλεβικού αίματος σε EDTA.

Το αιμόλυμα μπορεί να είναι πρόσφατο ή συντηρημένο στους $\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ή στους $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Για να ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση μέσα στο εργαστηριακό τρίωρο είναι προτιμότερο να χρησιμοποιηθεί συντηρημένο δείγμα το οποίο θα έχουμε ετοιμάσει μαζί με τα αντιδραστήρια σε ένα εργαστηριακό μάθημα, πριν από την εκτέλεση της ηλεκτροφόρησης.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Ρυθμιστικό διάλυμα – (buffer) με pH 8.9 (TRIS-EDTA-ΒΟΡΙΚΟ): Κάνουμε ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος με απιονισμένο νερό. Το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρείται στο ψυγείο, μέσα σε πωματισμένη ογκομετρική φιάλη πάνω στην οποία αναγράφεται η ημερομηνία παρασκευής του, για 10 περίπου ημέρες.

2. Χρωστικό διάλυμα: Διάλυμα χρωστικής Ponceans που παρασκευάζεται διαλύοντας 0.5 g χρωστικής ουσίας σε 100 ml διαλύματος 7.5% τριχλωροξικού οξέος (CCl_3COOH) ή διάλυμα χρωστικής Light Green που παρασκευάζεται βάζοντας σε ογκομετρικό κύλινδρο 50ml μεθανόλης (CH_3OH), 10ml οξικό οξύ (CH_3COOH) και 40 ml νερό (H_2O). Μέσα σε αυτό διαλύουμε 500mg Light Green.

3. Διάλυμα αποχρωματισμού: Υδατικό διάλυμα 5% οξικού οξέος (CH_3COOH).

4. Διάλυμα έκθlouσης: Ίσα μέρη ακετόνης (CH_3COCH_3) και παγόμορφου οξικού οξέος (CH_3COOH) 1:1. Με τα συστατικά αυτά θα γίνει διάλυση της οξικής κυτταρίνης.

5. Διάλυμα διαφανοποίησης: Περιέχει 87ml μεθανόλη (CH_3OH) και 12ml παγόμορφο οξικό οξύ και 1ml γλυκερόλης.

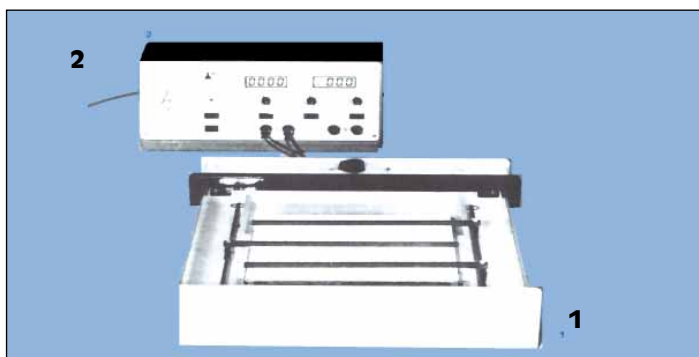
6. Απόλυτη μεθανόλη.



Επειδή η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης έχει μεγάλη διάρκεια μπορούμε να έχουμε παρασκευάσει τα αντιδραστήρια στο προηγούμενο εργαστηριακό μάθημα μαζί με το αιμόλυμα.

**ΟΡΓΑΝΑ,
ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ**

🔧 συσκευή ηλεκτροφόρησης: Λουτρό ηλεκτροφόρησης, Τροφοδοτικό ρεύματος, Μεταφορέας δειγμάτων (Applicator)



Εικόνα 8.3: Λουτρό (1) και τροφοδοτικό ρεύματος (2) ηλεκτροφόρησης

- | | |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 🔧 ζυγός | 🔧 γάντια |
| 🔧 επιτραπέζιο
χρονόμετρο | 🔧 ογκομετρικός κύλινδρος |
| 🔧 κλίβανος | 🔧 ογκομετρική φιάλη |
| 🔧 φωτόμετρο | 🔧 αυτόματες πιπέτες |
| | 🔧 ταινίες οξικής κυτταρίνης: Είναι πορώ-
δεις, ξηρές, αδιαφανείς και σπάζουν
εύκολα. Υπάρχουν σε πολλές διαστά-
σεις. Χρήσιμο είναι να γνωρίζουμε
πόσα cm πλάτος έχουν.
Χρησιμοποιούνται σαν "υποστρώματα"
επάνω στις οποίες θα "τρέξουν" τα
κλάσματα της αιμοσφαιρίνης και ως
αγωγοί του ηλεκτρικού ρεύματος. |
| | 🔧 σιφώνια Pasteur |
| | 🔧 υαλογράφος |

- 🔧 έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων
- 🔧 5 ή 7 ηεκανίδια με καπάκι σε σχήμα παραλληληλογράμμου
- 🔧 διηθητικό χαρτί
- 🔧 δοκιμαστικά σωληνήρια
- 🔧 ψαλίδι, μεταλλική λαβίδα
- 🔧 κυβέτες
- 🔧 αντικειμενοφόρος πλάκα
- 🔧 ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10



Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα ρύγχι σε διάλυμα χλωρίνης. Τα αφήνουμε 30 λεπτά της ώρας και κατόπιν τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Βάζουμε λίγη ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα σε ένα ηεκανίδιο.

2. Τοποθετούμε προσεκτικά την ταινία οξικής κυτταρίνης με την απορροφητική (γυαλιστερή) πλευρά προς τα κάτω, ώστε να επιπλεύσει για 1 ηεπτό. Όταν διαβραχεί καλά τη βυθίζουμε και την αφήνουμε να παραμείνει για 10 ηεπτά. Με αυτούς τους χειρισμούς γεμίζουν οι πόροι της, γίνεται ευθύγιστη, αλλιά παραμένει αδιαφανής.



Οι προτεινόμενοι χρόνοι κάθε σταδίου στην πορεία της τεχνικής δεν τροποποιούνται αυθαίρετα και περιστασιακά.

3. Στεγνώνουμε την ταινία ανάμεσα σε δύο φύλλα διηθητικό χαρτί λίγο πριν από τη χρήση τους.

4. Γεμίζουμε με ίση ποσότητα ρυθμιστικό διάλυμα και τα δύο διαμερίσματα του λουτρού της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

5. Ανασηκώνουμε τη “γέφυρα” από το λουτρό της συσκευής.

6. Σταθεροποιούμε την ταινία επάνω στη γέφυρα προσέχοντας να μην τσαλακωθεί.



Η καλή κατάσταση της ταινίας (να μην σπάσει ούτε να τσαλακωθεί) εξασφαλίζεται με λεπτούς χειρισμούς και δίνει αξιοπιστία στην κινητικότητα των κλασμάτων.



Οι φυσαλλίδες κάτω από τη "γέφυρα" δυσκολεύουν την ομαλή δίοδο του ηλεκτρικού ρεύματος.

7. Επανατοποθετούμε τη γέφυρα στο λουτρό. Προσέχουμε το (+) της γέφυρας να συμπίπτει με το (+) του λουτρού της συσκευής, χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλλίδες.



Η ταύτιση των ομοίων πόλων, δηλαδή το (+) με το (+) και το (-) με το (-), εξασφαλίζει την επιτυχία της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης.

8. Τοποθετούμε ≈ 10 ml αιμολήματος σε μία υποδοχή – πηγαδάκι της πλάκας του διανομέα με αυτόματη πιπέτα. Σε κάθε υποδοχή μπορούμε να τοποθετήσουμε διαφορετικό αιμόλυμα.



Εάν το δείγμα έχει συντηρηθεί πρέπει να γίνει επαναφορά της θερμοκρασίας του αφήνοντάς το για λίγο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



Η ποσότητα του δείγματος δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη γιατί θα υπερχειλίσει η υποδοχή και θα αναμειχθούν τα δείγματα.

9. Τοποθετούμε το διανομέα επάνω στις υποδοχές με το αιμόλυμα. Το δείγμα διαβρέχει (διαποτίζει) τα "δοντάκια" - "clips".

10. Ακουμπάμε απαλά το διανομέα επάνω στην άκρη της ταινίας που βρίσκεται στην κάθοδο (-). Το δείγμα μεταφέρεται στην ταινία. Απομακρύνουμε το διανομέα.



Τα στάδια Νο 9 & 10 πρέπει να εκτελεστούν μέσα σε 15 δευτερόλεπτα όταν υπάρχει ο μεταφορέας δειγμάτων, για να μην ξεραθεί το αιμόλυμα. Εάν δεν υπάρχει διανομέας, η μεταφορά του δείγματος γίνεται με σιφόνιο Pasteur. Στην περίπτωση αυτή τα στάδια Νο 8, 9 και 10 δεν πραγματοποιούνται.

11. Καθύπτουμε με το κάλυμμά της τη συσκευή και περιμένουμε 5 λεπτά.

12. Συνδέουμε τη συσκευή με το τροφοδοτικό. Προσέχουμε το (+) της συσκευής να συνδεθεί με το (+) του τροφοδοτικού.

13. Ρυθμίζουμε την τάση του ρεύματος (Volts). Η τάση αντιστοιχεί σε 1 mA/cm πλάτους της ταινίας. Συνήθως 210 - 250 Volts.

14. Ρευματοδοτούμε για 30 – 60 λεπτά περίπου. Στο στάδιο αυτό γίνεται ο διαχωρισμός των αιμοσφαιρινικών κλάσμάτων.



Η παρακολούθηση κατά διαστήματα της ηλεκτροφόρησης επιβάλλεται, μην τυχόν και καθούν προς την άνοδο (+) αιμοσφαιρινικά κλάσματα που κινούνται ταχύτερα.

15. Διακόπτουμε τη ρευματοδότηση και απομακρύνουμε την ταινία από τη γέφυρα της συσκευής συγκρατώντας την από τα δύο άκρα με μεταλλική λαβίδα.

Συνεχίζουμε με το χρωματισμό των κλασμάτων

16. Εμβαπτίζουμε την ταινία μέσα στο χρωστικό διάλυμα, σκεπάζουμε το θεκανίδιο για να μην εξατμίζεται το διάλυμα και την αφήνουμε 10 λεπτά της ώρας.

17. Γεμίζουμε τρία θεκανίδια με διάλυμα αποχρωματισμού.

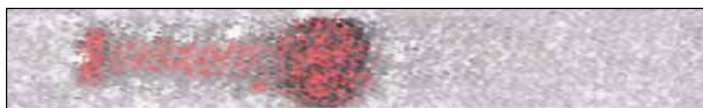
18. Εμβαπτίζουμε διαδοχικά την ταινία αφήνοντάς την 3 λεπτά στο κάθε ένα. Με τις εκπλήσεις αυτές τα κλάσματα της αιμοσφαιρίνης γίνονται εμφανή και η ταινία αποχρωματίζεται.



Τα διαλύματα αποχρωματισμού δεν επαναχρησιμοποιούνται μετά τη χρήση τους.

19. Στεγνώνουμε την ταινία ανάμεσα σε δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού.

20. Μελετάμε και καταγράφουμε τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης. Πάντα συγκρίνουμε τα αποτελέσματα με το ηλεκτροφορητικό αποτέλεσμα φυσιολογικού αιμολύματος (μάρτυρας). Η ταινία μπορεί να παραμείνει στο μόνιμο αρχείο.



Εικόνα 8.4: Ταινία οξικής κυτταρίνης με φυσιολογικό αιμόλυμα (μάρτυρας)

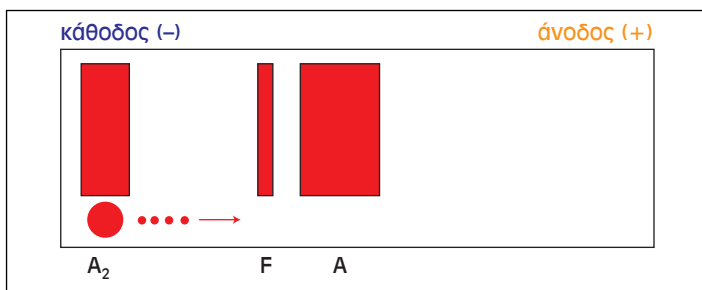


Εικόνα 8.5: Ταινία οξικής κυτταρίνης με φυσιολογικό αιμόλυμα νεογεννήτου

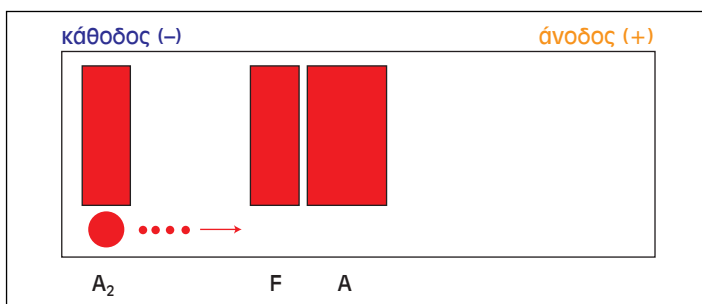
Ακολουθούν σχηματοποιημένες οι περιοχές στις οποίες τρέχουν τα αιμοσφαιρινικά κλάσματα τόσο φυσιολογικού αιμολύματος όσο και παθολογικών αιμολυμάτων.

κάθοδος (-)				άνοδος (+)	
C	S	A		O	H
E	D	F	M		I
A₂					

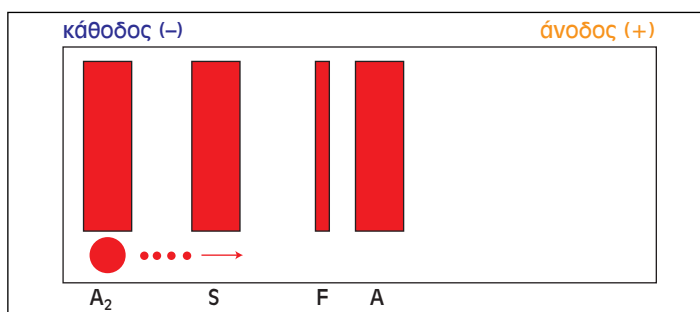
Εικόνα 8.6: Ηλεκτροφορητική περιοχή αιμοσφαιρινικών κλασμάτων



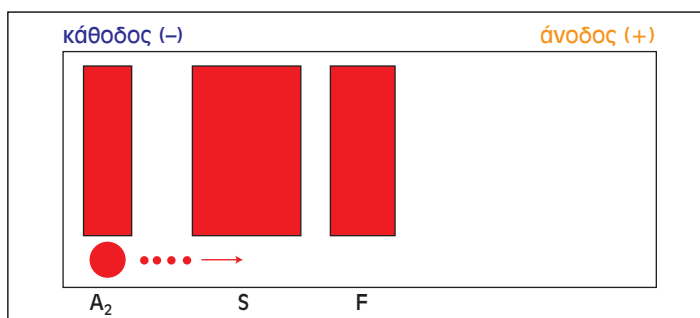
Εικόνα 8.7: Ηλεκτροφορητική κίνηση φυσιολογικών αιμοσφαιρινικών κλασμάτων (μάρτυρας)



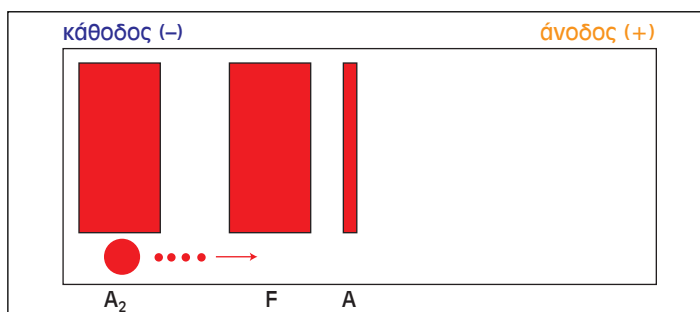
Εικόνα 8.8: Ηλεκτροφορητική κίνηση αιμοσφαιρινικών κλασμάτων αιμολύματος με στίγμα μεσογειακής αναιμίας



Εικόνα 8.9: Ηλεκτροφορητική κίνηση αιμοσφαιρινικών κλασμάτων αιμολύματος με στίγμα δρεπανοκυτταρικής αναιμίας



Εικόνα 8.10: Ηλεκτροφορητική κίνηση αιμοσφαιρινικών κλασμάτων αιμολύματος με ομόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία



Εικόνα 8.11: Ηλεκτροφορητική κίνηση αιμοσφαιρινικών κλασμάτων αιμολύματος με ομόζυγη β - θαλασσαιμία

Ακολουθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός:

1. Σημειώνουμε με υαλογράφο τόσα δοκιμαστικά σωληνάρια όσα είναι τα κλάσματα που διαχωρίστηκαν. Σ' ένα δοκιμαστικό σωληνάριο γράφουμε την ένδειξη "Τ'" (τυφλό). Θα το χρησιμοποιήσουμε για να μηδενίσουμε το φωτόμετρο.

2. Τοποθετούμε στο κάθε δοκιμαστικό σωληνάριο ίση ποσότητα (συνήθως 1 ml) διαλύματος έκθλιψης.

3. Διαχωρίζουμε προσεκτικά σε ίσα μεγέθη τα κλάσματα της αιμοσφαιρίνης με ένα ψαλίδι. Ύστερα κόβουμε ένα, ίσων διαστάσεων, κομμάτι διαυγούς ταινίας (χωρίς κλάσμα αιμοσφαιρίνης).



Το κόψιμο της ταινίας σε κομμάτια ίσου μεγέθους (διαχωρισμός των κλασμάτων) βοηθά στην ακρίβεια του ποσοτικού διαχωρισμού.

4. Βυθίζουμε μέσα στο διάλυμα των σωληναρίων με λαβίδα ένα ένα τα κομμάτια της ταινίας σε αντιστοιχία με τη σήμανση που έχουμε κάνει. Στο σωληνάριο με την ένδειξη "T" βυθίζουμε το διαυγές κομμάτι της ταινίας. Αυτό θα χρησιμοποιηθεί για το μηδενισμό του φωτομέτρου.

5. Ανακινούμε συνεχώς για 15 λεπτά της ώρας. Η ταινία της οξικής κυτταρίνης διαλύεται. Το διάλυμα παίρνει κόκκινο ή πράσινο χρώμα, αντίστοιχα της χρωστικής ουσίας που χρησιμοποιήθηκε. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη του ποσού της αιμοσφαιρίνης.

Στη συνέχεια θα γίνει η πυκνομέτρηση. Για τη χρήση του φωτομέτρου ακολουθούμε πιστά τις οδηγίες χρήσης της κατασκευάστριας εταιρείας.

6. Μηδενίζουμε το φωτόμετρο με το τυφλό "T".

7. Φωτομετρούμε το περιεχόμενο όρων των σωληναρίων σε μήκος κύματος 540 nm.

8. Σημειώνουμε τις τιμές της απορρόφησης και υπολογίζουμε επί τοις % κάθε κλάσμα εφαρμόζοντας τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ Αιμοσφαιρινικό κλάσμα} = \frac{\text{Απορρόφηση αιμοσφαιρινικού κλάσματος}}{\text{Άθροισμα τιμών απορρόφησης όλων των αιμοσφαιρινικών κλασμάτων}} \times 100$$

Εάν κριθεί αναγκαίο να γίνει ακριβέστερος προσδιορισμός των κλασμάτων με **πυκνομέτρηση** τότε μετά το βήμα Νο 20 η ταινία **διαφανοποιείται** και η πορεία διαμορφώνεται ως εξής:

1. Εμβαπτίζουμε την ταινία σε απόλυτη μεθανόλη για 1 λεπτό της ώρας.
2. Μεταφέρουμε την ταινία μέσα στο διαφανοποιητικό διάλυμα για 10 λεπτά.
3. Απλώνουμε, χωρίς να τσαλακωθεί, την ταινία επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.
4. Τοποθετούμε την αντικειμενοφόρο πλάκα με την ταινία σε κλίβανο 50 °C μέχρι να στεγνώσει. Σ' αυτή τη φάση η ταινία γίνεται διαφανής και χάνει την πορώδη σύστασή της.
5. Περνάμε τη διαφανοποιημένη ταινία στο ειδικό μηχάνημα το οποίο θα μετρήσει τα αιμοσφαιρινικά κλάσματα. Η απάντηση θα δοθεί σε γραμμικό διάγραμμα.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των κλάσμάτων της αιμοσφαιρίνης είναι διαφορετική. Από τις αιμοσφαιρίνες του ενήλικα, η A έχει την μεγαλύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Πίσω από αυτή κινείται η F ενώ η A₂ μένει πολύ πίσω, κοντά στο σημείο τοποθέτησης του αιμολύματος (εικόνα 8.7). Αλληλαγή στο ποσοστό των αιμοσφαιρινικών κλάσμάτων δηλώνει παθολογική κατάσταση (εικόνες 8.8, 8.9, 8.10 και 8.11).

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ

HbA	97.5%	
HbA ₂	1.5% - 3.5%	
HbF	0% - 2%	για τους ενήλικες
	60% - 90%	για τα νεογνά. Σταδιακά το ποσό αυτό μειώνεται και γύρω στον έκτο μήνα παίρνει την τιμή 2%.

Πρόταση για τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης

Για να ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση μέσα σε ένα εργαστηριακό τρίωρο, είναι αναγκαίο να γίνει καταμερισμός των εργασιών.

Μία ομάδα αναλαμβάνει την **προετοιμασία του δείγματος** (στάδια Νο 8,9,10,και 11) αφού πρώτα επαναφέρει τη θερμοκρασία του συντηρημένου αιμολύματος.

Μία άλλη ομάδα αναλαμβάνει την **προετοιμασία της ταινίας** της οξικής κυτταρίνης (στάδια Νο 1,2,και 3), την οποία στη

συνέχεια θα τοποθετήσει στην ηλεκτροφορητική συσκευή (στάδιο No 6).

Η τρίτη ομάδα **γεμίζει το λουτρό** της ηλεκτροφορητικής συσκευής (στάδια No 4,5,6,και 7) και **ρευματοδοτεί** τη συσκευή (στάδια No 12,13,14 και 15).

Όσο διαρκεί η ηλεκτροφόρηση μπορούμε να ετοιμάζουμε τα υλικά και τα σκεύη για το **χρωματισμό** και τον **αποχρωματισμό** των κλάσμάτων της ηλεκτροφόρησης (στάδια No 16,17,18 και 19).

Μετά ακολούθει η **μελέτη των αποτελεσμάτων**.

Στο επόμενο εργαστηριακό τρίωρο θα γίνει η ποσοτική εκτίμηση των κλάσμάτων της ηλεκτροφόρησης.

Άλλες μέθοδοι

Όταν πρέπει να διερευνηθούν με μεγάλη ακρίβεια τα αιμοσφαιρινικά κλάσματα **S** και **A₂** εφαρμόζουμε **τη μέθοδο της χρωματογραφίας**.

Η μέθοδος στηρίζεται στην ανταλλαγή φορτίων μεταξύ των ρητινών (θετικά φορτισμένες) και των αιμοσφαιρινών.

Το pH και η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος είναι τέτοια ώστε τα αιμοσφαιρινικά κλάσματα να έχουν διαφορετικά αρνητικά φορτία και να κατακρατούνται "παγιδεύονται" με τελείως διαφορετικό τρόπο από τις ρητίνες. Έτσι μένει ελεύθερο κάθε φορά και ένα διαφορετικό αιμοσφαιρινικό κλάσμα, το οποίο μετά τη διήθησή του φωτομετρείται σε μήκος κύματος 415 nm.

Όλα τα απαραίτητα υλικά για την εκτέλεση της χρωματομετρικής μεθόδου (αντιδραστήρια, ρητίνες ή στήλες ρητινών μιας χρήσης) διατίθενται συσκευασμένα από τις διάφορες εταιρείες.

Ακολουθούμε πιστά τις οδηγίες χρήσης των εταιρειών. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δώσουμε:

1. Στην καταλληλότητα των ρητινών. Κάθε αλλαγή στο αρχικό τους χρώμα δηλώνει αλλοίωση.
2. Στην ημερομηνία λήξης των ρητινών.
3. Στο είδος του αντιπηκτικού. Το κατάλληλο αντιπηκτικό είναι το EDTA.

Ο προσδιορισμός του ποσοστού στα εκατό (%) του διηθημένου αιμοσφαιρινικού κλάσματος γίνεται εφαρμόζοντας τον τύπο:

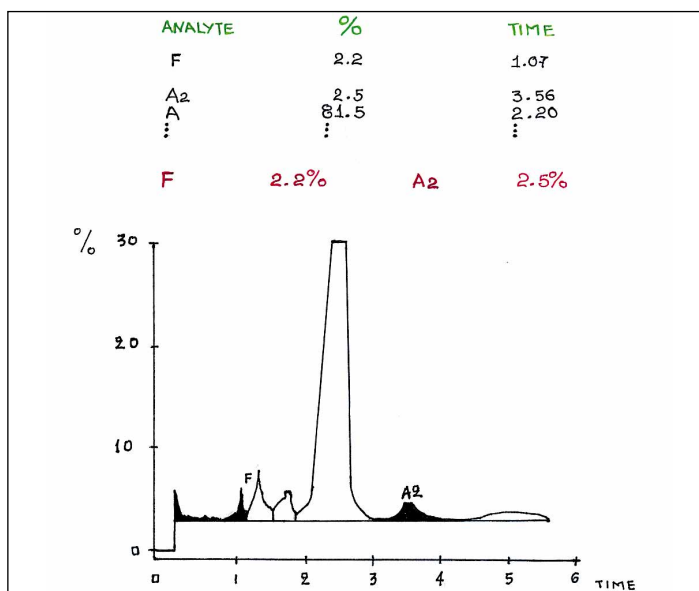
$$\text{HbS \%} = \frac{\text{Απορρόφηση αιμοσφαιρίνης S}}{\text{Αθροισματιμών της αιμοσφαιρίνης του ολικού αίματος}} \times 100$$

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας έχει προσφέρει στην καθημερινή εργαστηριακή πράξη **αυτόματους αναλυτές** για τον προσδιορισμό των αιμοσφαιρινικών κλάσμάτων.

Οι αναλυτές αυτοί έχουν τη δυνατότητα να πλένουν τα ερυθρά, να φτιάχνουν αιμόληυμα, να ηλεκτροφορούν και να εκτυπώνουν τα αποτελέσματα.

Στηρίζονται στην ιοντοανταθληαγή των φορτίων των αιμοσφαιρινικών κλάσμάτων με τα φορτία ειδικών διαλυμάτων αναφοράς.

Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή ιστογράμματος. Στον κατακόρυφο άξονα είναι σημειωμένο το ποσοστό του αιμοσφαιρινικού κλάσματος και στον οριζόντιο ο χρόνος ηλεκτροφορητικής κίνησης.



Εικόνα 8.12: Ιστόγραμμα αυτόματης ηλεκτροφορητικής ανάλυσης

8.2.6 Δοκιμασία δρεπανώσεως των ερυθροκυττάρων

ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ



Ας συνδεθούμε με την Αιματολογία I:

Τα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα έχουν όλη την ίδια διάμετρο (7-8 mm). Το σχήμα τους είναι αμφίκιρφο κυρτοειδές, φαίνονται όμως σφαιρικά. Το χρώμα τους είναι σκούρο κίτρινο προς το πορτοκαλί, λιγότερο έντονο στο κέντρο και περισσότερο έντονο στην περιφέρεια.

Κάθε αλληλαγή στο μέγεθος, το σχήμα και το χρώμα των ερυθροκυττάρων συνοδεύει και χαρακτηρίζει διάφορες αιματολογικές παθήσεις.

• Πότε κάνουμε τη δοκιμασία;

Εάν κατά την ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης σε ταινία οξικής κυτταρίνης βρεθεί κλάσμα που η ηλεκτροφορητική του θέση μας βάζει σε υποψία για την ύπαρξη αιμοσφαιρίνης S, πρέπει να κάνουμε διερεύνηση με τη δοκιμασία δρεπανώσεως.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το φυσιολογικό σχήμα των ερυθρών αιμοσφαιρίων μεταβάλλεται σε **δρεπανοειδές**, όταν τα ερυθροκύτταρα βρεθούν σε περιβάλλον με ελάχιστο οξυγόνο (υποξία). Η μεταβολή αυτή συμβαίνει *μόνο αν η αιμοσφαιρίνη που περιέχουν είναι η δρεπανοκυτταρική S*, πρόκειται δηλαδή για δρεπανοκυτταρική αναιμία.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε 2.5 ml φλεβικό αίμα σε EDTA ή τριχοειδικό.



Το δείγμα μπορεί να συντηρηθεί στους 4 °C.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Μεταδιθειώδες νάτριο ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$): Διαλύουμε 0,1 g μέσα σε 5 ml απιονισμένο νερό.



Το υδατικό αυτό διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν χρησιμοποιηθεί γιατί αλλοιώνεται εύκολα.



Είναι ισχυρό αναγωγικό.


















ΠΡΟΣΟΧΗ !

Το αντιδραστήριο είναι ερεθιστικό. Προστατεύουμε το δέρμα μας. Δεν το βάζουμε στο στόμα μας.

2. Φωσφορικό δινάτριο (Na_2HPO_4): Διαλύουμε 16,2 g σε 11 ml απιονισμένο νερό.

Πριν την έναρξη της δοκιμασίας αναμειγνύονται δύο όγκοι του πρώτου αντιδραστηρίου και τρεις όγκοι του δεύτερου αντιδραστηρίου.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ

- | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  επωαστικός κλίβανος |  γάντια |
|  μικροσκόπιο |  υαλογράφος |
|  επιτραπέζιο
χρονόμετρο |  έδρανο στήριξης δοκιμα-
στικών σωληναρίων |
| |  δοκιμαστικό σωληνήριο
αιμοηύσεως |
| |  σιφώνια Pasteur |
| |  αντικειμενοφόρος πλάκα |
| |  καλυπτρίδα |
| |  βαζελίνη |
| |  τρυβλίο |
| |  βαμβάκι |
| |  κεδρέθαιο |
| |  ποτήρι ζέσεως με διάλυμα
χλωρίνης 1:10 |



Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα σιφώνια, τις καλυπτρίδες και τις αντικειμενοφόρες πλάκες, σε διάλυμα χλωρίνης. Τα αφήνουμε 30 λεπτά της ώρας και κατόπιν τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Τοποθετούμε στο έδρανο στήριξης ένα δοκιμαστικό σωληνήριο αιμοηύσεως με σημειωμένα επάνω τα στοιχεία του ασθενή.
2. Ανακινούμε με ήπιες κινήσεις το φιαλίδιο με το δείγμα για να γίνει ομοιογενές.
3. Μεταφέρουμε με σιφώνιο Pasteur 1 – 2 σταγόνες από το δείγμα στο σωληνήριο.



ΠΡΟΣΟΧΗ !

Πετάμε το σιφώνιο μέσα σε διάλυμα χλωρίνης.

4. Προσθέτουμε 1 - 2 σταγόνες από το μείγμα των αντιδραστηρίων.



Οι ίσες ποσότητες δείγματος και αντιδραστηρίου βοηθούν στην ομαλή αναγωγική αντίδραση.

5. Βάζουμε με σιφώνιο μια μικρή σταγόνα από το μείγμα επάνω σε αντικειμενοφόρο πηλικά.



Υπενθύμιση:

Πετάμε το χρησιμοποιημένο σιφώνιο στο διάλυμα της χλωρίνης.

6. Καλύπτουμε προσεκτικά τη σταγόνα με την καλυπτρίδα.



Η τοποθέτηση της καλυπτρίδας γίνεται προσεκτικά, χωρίς να εγκλωβιστεί αέρας στο παρασκεύασμα.

7. Κλείνουμε με βαζεήλη ή κεδρέλαιο περιμετρικά την καλυπτρίδα, χρησιμοποιώντας σιφώνιο Pasteur.



Το σφράγισμα της περιμέτρου της καλυπτρίδας πρέπει να γίνεται χωρίς διάκενα για να μην προσλαμβάνει η αιμοσφαιρίνη ατμοσφαιρικό οξυγόνο.



Το χρησιμοποιημένο σιφώνιο πετάγεται στο διάλυμα χλωρίνης.

8. Βάζουμε βαμβάκι εμποτισμένο με νερό μέσα σε ένα τρυβλίο.

9. Τοποθετούμε το παρασκεύασμα μέσα στο τρυβλίο και το αφήνουμε για 20 λεπτά σε επωαστικό κλίβανο 37°C.



Το υγρό περιβάλλον βοηθά να μην ξεραθεί το παρασκεύασμα.

Σε ετερόζυγη μορφή αιμοσφαιρινοπάθειας S μπορεί να κρατήσει η επώαση 1 ώρα.

10. Μικροσκοπούμε αναζητώντας δρεπανοκύτταρα. Η μικροσκόπηση επαναλαμβάνεται στα 30, 60 και 120 λεπτά.

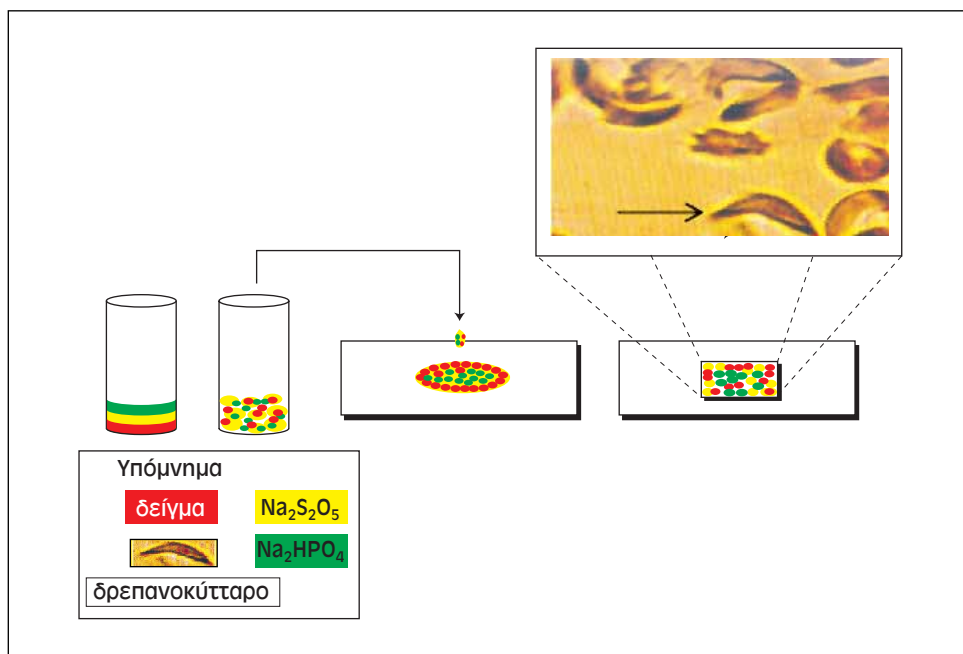


Η επαναλαμβανόμενη μικροσκόπηση δίνει αξιόπιστα διαφορικά στοιχεία για τις αιμοσφαιρινοπάθειες.

Εάν η τεχνική γίνει με τριχοειδικό αίμα, τα στάδια Νο 1, 2 και 3 τροποποιούνται ως εξής:

1. Τοποθετούμε επάνω σε αντικειμενοφόρο πηλικά 1 σταγόνα τριχοειδικό αίμα.
2. Προσθέτουμε με σιφώνιο 1 σταγόνα από το μείγμα των αντιδραστηρίων.
3. Αναμειγνύουμε με το σιφώνιο τις δύο σταγόνες με κυκλικές κινήσεις.

Συνεχίζουμε με τους χειρισμούς των σταδίων Νο 6, 7, 8, 9, και 10.



Εικόνα 8.13: Δοκιμασία δεπανώσεως των ερυθροκυττάρων

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- α. ΘΕΤΙΚΟ:** Υπάρχουν πυκνοχρωματικά ημισελήνοειδή ερυθροκύτταρα (δρεπανοκύτταρα).

β. ΑΡΝΗΤΙΚΟ: Δεν υπάρχουν πυκνοχρωματικά ημισελήνοειδή ερυθροκύτταρα (δρεπανοκύτταρα).

Τα ερυθροκύτταρα είναι φυσιολογικά.



ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η δρεπάνωση γίνεται σταδιακά. Τα ερυθροκύτταρα αρχικά διατάσσονται σε στήλες, αργότερα παίρνουν επιμήκες σχήμα και στη συνέχεια αποκτούν μυτερές άκρες (οξύαιχμα), γίνονται, δηλαδή, **δρεπανοκύτταρα**.

Η δρεπάνωση γίνεται **γρήγορα στην ομόζυγη** δρεπανοκυτταρική αναιμία και **αργά στην ετερόζυγη** δρεπανοκυτταρική αναιμία. Ο ποιοτικός αυτός έλεγχος αποτελεί στοιχείο για να διαγνωστεί η δρεπανοκυτταρική πάθηση από άλητες αιμοσφαιρινοπάθειες, όταν οι αιμοσφαιρίνες τους έχουν την ίδια ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε αλκαλικό περιβάλλον που έχει και η αιμοσφαιρίνη S.

8.2.7 Δοκιμασία διαλυτότητας της αιμοσφαιρίνης S

- Η αιμοσφαιρίνη S
- έχει μικρή διαλυτότητα
 - καθιζάνει και
 - πολυμερίζεται.

Λόγω των φυσικοχημικών αυτών ιδιοτήτων της **αλλοιώνεται το σχήμα** των ερυθρών αιμοσφαιρίων και **δημιουργούνται θρομβώσεις** και έμφρακτα στα διάφορα όργανα.

Η δοκιμασία διαλυτότητας της δοκιμασίας S είναι μία σύντομη και αξιόπιστη μέθοδος που ανιχνεύει την παρουσία ή απουσία της παθολογικής αιμοσφαιρίνης S. Γίνεται για τη διάγνωση της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αιμοσφαιρίνη S ανάγεται από την επίδραση του όξινου θειώδους νατρίου. Το προϊόν που προκύπτει, επειδή έχει μικρή διαλυτότητα, θοιώνει το μείγμα.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε ολικό αίμα σε αντιπηκτικό.



Κατάλληλα αντιπηκτικά για τη συλλογή του δείγματος είναι το EDTA, το ACD και η ηπαρίνη. Το δείγμα δεν πρέπει να έχει ίκνος αιμόλυσης.



Εάν το δείγμα συντηρηθεί στους $\pm 4^{\circ}\text{C}$ είναι κατάλληλο μέχρι και 8 εβδομάδες από τη λήψη του.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών: Το διάλυμα κρατάει σταθερό το pH της βιοχημικής αντίδρασης. Βρίσκεται μέσα σε φιαλίδιο με ή χωρίς ειδικό δοσομετρικό πώμα. Διατηρείται στους 15°C - 30°C .

2. Όξινο θειώδες νάτριο (NaHSO_3): Είναι ένα ισχυρότατο αντιδραστήριο σε λιυόφιλη μορφή μέσα σε δοκιμαστικά σωληνάρια της κατασκευάστριας εταιρείας.



Εάν το αντιδραστήριο είναι σε υγρή μορφή, είναι ακατάλληλο για χρήση.

ΟΡΓΑΝΑ ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ



επιτραπέζιο χρονόμετρο



γάντια



υαλογράφος



ειδικά δοκιμαστικά

σωληνάρια της
κατασκευάστριας εταιρείας
που περιέχουν το
αντιδραστήριο Νο 2 σε
λιυόφιλη μορφή



ειδικό έδρανο στήριξης των
δοκιμαστικών σωληναρίων



αυτόματη πιπέτα
αντιδραστηρίων



ποτήρι ζέσεως με διάλυμα
χλωρίνης 1:10



Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα ρύγχαι σε διάλυμα χλωρίνης. Τα αφήνουμε 30 λεπτά της ώρας και κατόπιν τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.



Τα δοκιμαστικά σωληνάρια πρέπει να χρησιμοποιηθούν μέσα σε διάστημα 30 ημερών από το άνοιγμα της συσκευασίας.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Σημειώνουμε με υαλογράφο τα στοιχεία του εξεταζόμενου πάνω στα ειδικά δοκιμαστικά σωληνάρια της συσκευασίας τα οποία περιέχουν το όξινο θειώδες νάτριο.

2. Αφαιρούμε το πώμα του σωληναρίου και βάζουμε 4 ml από το ρυθμιστικό διάλυμα.

3. Προσθέτουμε 50 ml από το δείγμα και πωματίζουμε το δοκιμαστικό σωληνάριο.

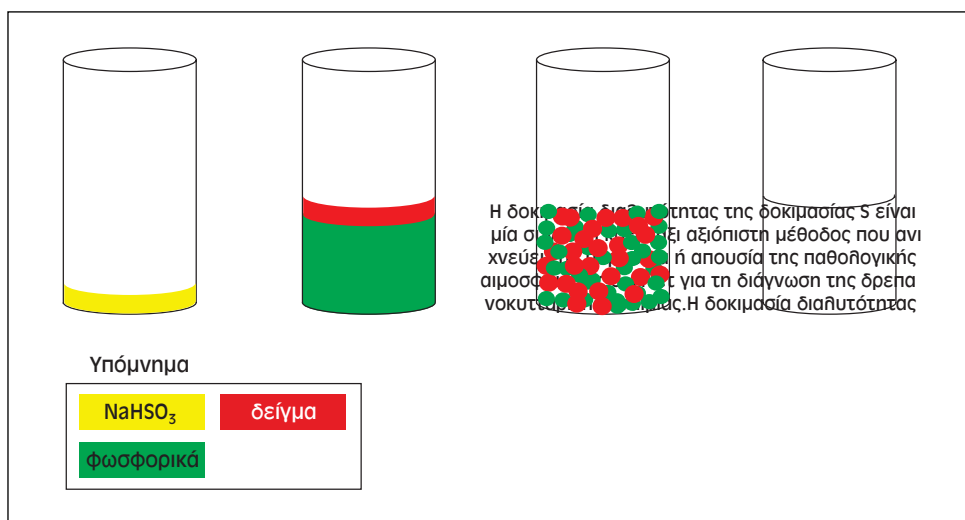
**Υπενθύμιση:**

Πετάμε το ρύγχος στο διάλυμα χλωρίνης.

4. Ανακινούμε δυνατά με αναστροφή το δοκιμαστικό σωληνάριο για να αναμειχθούν τα υλικά.

5. Αφήνουμε το μείγμα στη θερμοκρασία δωματίου για 10-20 λεπτά της ώρας.

6. Ελέγχουμε μπροστά από επιφάνεια με γραμμώσεις (υπάρχει στη συσκευασία) ή γράμματα, τη δημιουργία ή μη θόλωσης του μείγματος. Το κριτήριο για τη θόλωση είναι η ευκρινής ή μη ευκρινής εικόνα των γραμμώσεων ή των γραμμάτων πίσω από το δοκιμαστικό σωληνάριο.



Εικόνα 8.14: Έλεγχος της διαλυτότητας της αιμοσφαιρίνης S

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

α. Θετικό: Η όψη του μείγματος είναι **θολερή** και δε φαίνονται οι γραμμώσεις της επιφάνειας ή οι ριζείς ενός κειμένου πίσω από το δοκιμαστικό σωληνάριο.

β. Αρνητικό: Η όψη του μείγματος είναι **διαυγής** και φαίνονται ξεκάθαρα οι γραμμώσεις της επιφάνειας ή οι ριζείς ενός κειμένου.

Για την αξιοπιστία του αποτελέσματος καλό είναι να χρησιμοποιήσουμε θετικό και αρνητικό μάρτυρα οι οποίοι δίνονται από την κατασκευάστρια εταιρεία.

**ΕΡΜΗΝΕΙΑ
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Έγινε αιμόλυση των ερυθροκυττάρων και ελευθερώθηκε η αιμοσφαιρίνη.

Εάν είναι **παθολογικής δομής (S)**, μένει **αδιάλυτη** και αυτό το συμπεραίνουμε από τη **θόλωση** μείγματος.

Εάν είναι **φυσιολογικής δομής**, **διαλύεται** και αυτό το συμπεραίνουμε από τη **διαύγεια** του μείγματος.

Α Ν Α Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ω Σ Η

Στις ενότητες αυτού του κεφαλαίου παρουσιάστηκαν αντιπροσωπευτικές εξετάσεις που αφορούν την ανίχνευση μιας αιμολυτικής αναιμίας και την ανίχνευση και επιβεβαίωση διαταραχών της αιμοσφαιρίνης.

Αναλύθηκαν οι πλέον απαραίτητες βοηθητικές τεχνικές επεξεργασίας των δειγμάτων, προκειμένου να εκτελεστούν αυτές οι δοκιμασίες.

Έγινε σαφής:

- η χρησιμότητα της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης για τη διάγνωση των αναιμιών και
- η αναγκαιότητα να επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα μιας εξέτασης εκτελώντας ειδικές, για την κάθε διαταραχή, τεχνικές.



Ας ελέγξουμε τις γνώσεις μας:

1. Μετατρέπουμε τους πηλαγιότιτλους σε ερωτηματικές προτάσεις και δίνουμε τις αντίστοιχες απαντήσεις. Π.χ.: Ποια είναι η αρχή της μεθόδου; Τι δείγμα χρησιμοποιούμε; κ.ο.κ.
2. Απαντάμε σε όλες τις ερωτήσεις που ακολουθούν τους πηλαγιότιτλους και ορίζουν το θέμα που αναπτύσσεται στις παραγράφους.

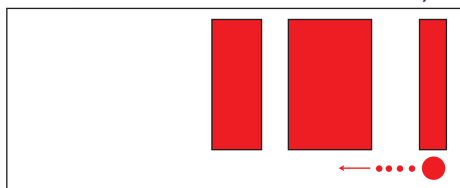
Ας δούμε τι καταλάβαμε:

1. Συμπληρώνουμε τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούμε στις παρακάτω τεχνικές:
 - α. Αιμολύματος
 - β. Δρεπάνωσης και
 - γ. Ωσμωτικής αντίστασης
 - δ. Διαλυτότητας και
2. Το πλύσιμο των ερυθροκυττάρων γίνεται με:
 - α. 10% NaCl
 - β. 0,9% NaCl
 - γ. 5% NaCl
 - δ. 0,5% NaCl
3. Ποια μακροσκοπικά στοιχεία χαρακτηρίζουν τη δοκιμασία διαλυτότητας ως θετική; Πως θα εξηγήσουμε το αποτέλεσμα;
4. Ποια η σημασία των σημείων προσοχής ⚠ στα στάδια Νο 6,7 και 10 για την επιτυχία της ηλεκτροφόρησης;
5. Έχουμε τις τιμές των απορροφήσεων των αιμοσφαιρινικών κλάσμάτων:

$$\text{HbA} = 0,40 \quad \text{HbA}_2 = 0,95 \quad \text{HbF} = 3,42$$
 - α. Πώς θα υπολογίσουμε το ποσοστό % του κάθε κλάσματος;
 - β. Ποια πάθηση υποψιαζόμαστε;
6. Μελετούμε την σχηματική παράσταση μιας ηλεκτροφόρησης.
 - α. Ποια κλάσματα έχουν "τρέξει";
 - β. Σε τι υποψίες μας βάζει αυτή η εικόνα;
 - γ. Ποια άλλη εξέταση πρέπει να κάνουμε για να βεβαιωθούμε;

άνοδος (+)

κάθοδος (-)



7. Βάζουμε σε κύκλο μία ή περισσότερες απαντήσεις, εφόσον θεωρούμε ότι ισχύουν:

- 7.1 Κατά τη μέτρηση της ωσμωτικής αντίστασης, σε πυκνό διάλυμα, βρίσκουμε >50% αιμόλυση ερυθροκυττάρων σε:
- | | |
|-----------------------------|--------------------------------|
| α. Μικροκυτταρική αναιμία | β. Κληρονομική σφαιροκυττάρωση |
| γ. Υπόχρωμη αναιμία | δ. Σιδηροπενική αναιμία |
| ε. Δρεπανοκυτταρική αναιμία | |
- 7.2 Στην παρασκευή του διαλύματος, για τον έλεγχο της ωσμωτικής αντίστασης των ερυθροκυττάρων χρησιμοποιείται:
- | | |
|---------------------|---------------------|
| α. Απεσταγμένο νερό | β. Ανθρακικό νάτριο |
| γ. Κιτρικό νάτριο | δ. Οξαλικό κάλιο |
| ε. Χλωριούχο νάτριο | |
- 7.3 Για την ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε ταινία οξικής κυτταρίνης, το δείγμα είναι:
- | | |
|------------------------------|-----------------------------------|
| α. Ολικό αίμα | β. Τριχοειδικό αίμα |
| γ. Φλεβικό αίμα | δ. Πλυμένα ερυθρά |
| ε. Αιμόλυμα φλεβικού αίματος | στ. Αιμόλυμα τριχοειδικού αίματος |
- 7.4 Σε χαρτί ηλεκτροφόρησης, σε pH 8,6, η αιμοσφαιρίνη που κινείται τελευταία είναι:
- | | |
|-----------------------|----------|
| α. H HbC | β. H HbA |
| γ. H HbA ₂ | δ. H HbF |
| ε. H HbS | |
- 7.5 Η αιμοσφαιρίνη που παραμένει αδιάλυτη όταν ανάγεται είναι:
- | | |
|-----------------------|----------|
| α. H HbC | β. H HbA |
| γ. H HbA ₂ | δ. H HbF |
| ε. H HbS | |
- 7.6 Για ένα πηασματικά αρνητικό αποτέλεσμα δοκιμασίας δρεπάνωσης μπορεί να ευθύνεται:
- | |
|--------------------------------------------------------------------|
| α. Το μεταδιθειώδες νάτριο που παρασκευάστηκε την προηγούμενη μέρα |
| β. Η υγρασία στην ατμόσφαιρα |
| γ. Το ατελές σφράγισμα της καλυπτρίδας |
| δ. Οι ίσες ποσότητες δείγματος και αντιδραστηρίου |
| ε. Το ότι το δείγμα ήταν από τριχοειδικό αίμα |

- 7.7 Σε ένα εργαστήριο στο οποίο πρέπει να γίνει ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης, ποιο υπόστρωμα είναι το καταλληλότερο, αν ισχύει κάθε φορά μια από τις παρακάτω συνθήκες :
- α. Υπάρχει οικονομικό πρόβλημα
 - β. Πρέπει να δοθεί πολύ γρήγορα απάντηση
 - γ. Έχουμε μικρή ποσότητα δείγματος
 - δ. Ισχύει το β και γ συγχρόνως
 - ε. Θέλουμε οπωσδήποτε να προσδιορίσουμε την αιμοσφαιρίνη F

Ας εφαρμόσουμε αυτά που μάθαμε:

1. Εάν υποψιαζόμαστε σιδηροπενική αναιμία, ποιες αραιώσεις θα κάνουμε και γιατί, προκειμένου να μετρήσουμε την ωσμωτική αντίσταση των ερυθρών αιμοσφαιρίων;
2. Συγκεντρώνοντας τα υλικά για την εκτέλεση της δοκιμασίας δρεπανώσεως διαπιστώσαμε ότι δεν έχουμε τα υλικά για το περιμετρικό "σφράγισμα" της καλυπτρίδας. Τι θα κάνουμε;
 - α. Θα παρακάμψουμε το στάδιο αυτό.
 - β. Θα ζητήσουμε νέα αιμοηψία αύριο το πρωί που θα έχουμε τα υλικά.
 - γ. Θα συντηρήσουμε το δείγμα και θα επαναλάβουμε αύριο την τεχνική.Αιτιολογούμε την επιλογή και μη επιλογή μας.

Προτάσεις για περαιτέρω διερεύνηση:

1. Νεότερες αυτοματοποιημένες τεχνικές ηλεκτροφόρησης. Σε ποια αρχή στηρίζονται; Ποια τα πλεονεκτήματα και ποια τα μειονεκτήματά τους;
2. Ποια μικρόβια και ποια παράσιτα μπορούν να προκαλέσουν αιμολυτική αναιμία;
3. Τι συμβαίνει όταν η αιμοσφαιρίνη συνδεθεί με μονοξείδιο του άνθρακα; Συσχετίζουμε το μηχανισμό με το κάπνισμα και τους ρύπους της ατμόσφαιρας.