

Αιμοσφαιρίνη 5

(Hemoglobin - HGB ή Hb)

η αιμοσφαιρίνη (Hb) είναι χρωμοπρωτεΐνη. Αποτελεί, μετά το νερό, το σημαντικότερο κατά βάρος συστατικό των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ενώ συγχρόνως είναι και ο κύριος φορέας της λειτουργικότητάς τους. Το μόριό της αποτελείται από σφαιρίνη 95% και αίμη 5%. Η αίμη δίνει χρώμα στη αιμοσφαιρίνη (κόκκινο). Η ελάτπωση του ολικού αριθμού των ερυθροκυττάρων, η πτώση της τιμής Hb ή συνδιασμός των δύο, οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις που λέγονται αναιμίες.

5.1 Μέτρηση Αιμοσφαιρίνης

Στην καθημερινή πρακτική ο φωτομετρικός τρόπος προσδιορισμού της αιμοσφαιρίνης είναι ο πιο κατάλληλος και χρησι-

μποιείται ευρέως. Επειδή η αιμοσφαιρίνη είναι χρωμοπρωτεΐνη και μάλιστα βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στο αίμα, προστίθεται σε γνωστό όγκο πλήρους αίματος που έχει αναδευτεί επαρκώς, διαλύτης, που προκαλεί λύση των ερυθροκυττάρων και παράγει αιμόλυμα. Η λύση επιτυγχάνεται λόγω υποτονικότητας του διαλύτου. Κατόπιν, το ποσό της Hb προσδιορίζεται από την απορρόφηση του φωτός (οπτική πυκνότητα) του διαλύματος της Hb και των παραγώγων της σε ένα επιλεγμένο μήκος κύματος.

5.1.1 Μέθοδος κυανομεθαιμοσφαιρίνης (HiCN) ή Drapkin ή φωτομετρική

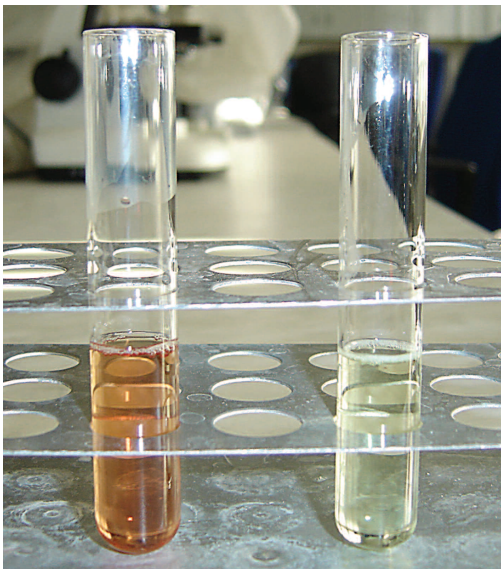
Η ICSH έχει προτείνει μία μέθοδο αναφοράς κατά την οποία η αιμοσφαιρίνη μετατρέπεται σε κυανομεθαιμοσφαιρίνη.

Η μέθοδος αναφοράς απαιτεί την προσθήκη ενός διαλύτη (**Drapkin** – αντιδραστήριο που παρέχεται έτοιμο στο εμπόριο και

ο τρόπος παρασκευής του αναγράφεται στις οδηγίες χρήσεώς του) και περιέχει:

1. Κυανιούχο κάλιο και σιδηροκυανιούχο κάλιο για τη μετατροπή της αιμοσφαιρίνης σε κυανομεθαιμοσφαιρίνη και αποτελεί την αρχή στην οποία στηρίζεται η μέθοδος αυτή.

2. Δισόξινο φωσφορικό κάλιο για να μειωθεί το pH, να επιταχυνθεί η αντίδραση



και η αναγνώριση της απορρόφησης του φωτός να γίνει στα 3 min αντί στα 10-15 min.

3. Ένα μη-ιονικό απορρυπαντικό για να επιταχυνθεί η κυτταρική λύση και να ελαττωθεί η θολερότητα από την καθίζηση των λιποπρωτεϊνών (και σε μικρότερο βαθμό από το στρώμα των ερυθροκυττάρων). Αν δεν χρησιμοποιηθεί απορρυπαντικό, η ελάττωση του pH με την προσθήκη του δισόξινου φωσφορικού καλίου προκαλεί μεγάλη θολερότητα.

Η διατήρησή του γίνεται σε γυάλινες σκοτεινόχρωμες φιάλες, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε σκοτεινό χώρο. Κάτω απ' αυτές τις συνθήκες το αντιδραστήριο είναι σταθερό για αρκετούς μήνες. Για τη συντήρησή του δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται πλαστικές φιάλες.

Η ανάγνωση της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος γίνεται στα 540nm με το φασματοφωτόμετρο. Σαν τυφλό διάλυμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε νερό, είτε κατά προτίμηση διαλύτης, όπου η απορρόφηση είναι μηδενική. Το φως που διέρχεται από το διάλυμα, ανιχνεύεται από ένα φωτοηλεκτρικό κύτταρο και η κλίμακα του οργάνου δείχνει είτε την απορρόφηση του φωτός είτε τη διαπερατότητα. Ο υπολογισμός της αιμοσφαιρίνης (Hb) γίνεται συγκρίνοντας την ένδειξη του οργάνου προς κάποιο διάλυμα αναφοράς και χρησιμοποιώντας μια καμπύλη προτύπων.

Τα φωτόμετρα είναι ευαίσθητα στην παρουσία θολερότητας, που μπορεί να οφείλεται σε υψηλό αριθμό λευκών, υψηλές συγκεντρώσεις λιπιδίων ή πρωτεϊνών του πλάσματος ή σε ερυθρά, που δεν έχουν υποστεί λύση. Η αυξημένη θολερότητα προκαλεί ψευδή αύξηση της τιμής της Hb. Όταν τα λευκά είναι υψηλά, η επίδραση της θολερότητας παρακάμπτεται με φυγοκέντρηση ή διήθηση του διαλύματος πριν από την ανάγνωση της

απορρόφησης. Η θολερότητα, που οφείλεται σε υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών του πλάσματος (π.χ. λόγω της παρουσίας παραπρωτεΐνης ή από σοβαρή χρόνια λοίμωξη ή φλεγμονή) μπορεί να διαλυθεί με την προσθήκη ανθρακικού καλίου ή με μία σταγόνα διαλύματος αμμωνίας 25%. Όταν η θολερότητα οφείλεται σε υπερλιπιδαιμία μπορεί να παρασκευαστεί τυφλό διάλυμα από το διαλύτη και το πλάσμα του ασθενούς. Επίσης το λίπος μπορεί να απομακρυνθεί με δισαυθαιθέρα και φυγοκέντρηση. Τα στοχοκύτταρα των ηπατοπαθειών και τα ερυθρά, που περιέχουν αιμοσφαιρίνη S ή O είναι πιθανόν να μην υποστούν λύση και τότε η αυξημένη θολερότητα προκαλεί ψευδή αύξηση της τιμής της αιμοσφαιρίνης (Hb). Καμιά φορά το φαινόμενο αυτό παρατηρείται χωρίς να υπάρχει καμία γνωστή ανωμαλία των ερυθρών. Η παρασκευή ενός διαλύματος 1:1 με απεσταγμένο νερό εξασφαλίζει την πλήρη λύση των ωσμωτικά ανθεκτικών ερυθρών.

Η μέθοδος της κυανομεθαιμοσφαιρίνης έχει υποστεί τροποποιήσεις για να εφαρμόζεται σε αυτόματους αναλυτές με τη χρήση ποικίλων λυτικών παραγόντων και για να διαβάζεται η απορρόφηση σε συντομότερο χρόνο ή σε διαφορετικό μήκος κύματος.

5.1.2 Τεχνική για τον προσδιορισμό της αιμοσφαιρίνης με την μέθοδο Drapkin

- ✓ Προτιμάται φλεβικό αίμα με αντιπηκτικό EDTA.
- ✓ Τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα:
 - ⊙ Αντιδραστήριο 5ml (Drapkin)
 - ⊙ Ολικό αίμα 0,02 ml ή 20μl

- ✓ Καλή ανάμειξη
- ✓ Το σωληνάριο αφήνεται αδιατάραχτο τουλάχιστον για 3 min
- ✓ Ανάγνωση της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος (λ): 540nm με φωτόμετρο



5.1.3 Τρόποι για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης

- ⊙ Προκύπτει από το γινόμενο της απορρόφησης του δείγματος με έναν σταθερό συντελεστή που δίνουν οι οδηγίες χρήσης του αντιδραστηρίου.

Παράδειγμα: Έστω **A** (απορρόφηση – absorbance – εξεταστέου) **x 36,77** (η συνηθέστερη σταθερά του αντιδραστηρίου - factor) = **C** (η συγκέντρωση – concentration - της Hb σε **g/dl**).

$$A \times 36,77 = C \text{ gr/dl}$$

- ⊙ Με **calibrator** ή **standard**.

Παράδειγμα: **A** (απορρόφηση εξεταστέου): **A** (απορρόφηση standard) **x 15** (γνωστή συγκέντρωση - standard) = **C** (η συγκέντρωση της Hb σε **g/dl**)

$$\frac{A_{\text{εξ}}}{A_{\text{st}}} \times 15 = C \text{ gr/dl}$$

- ⊙ Με πρότυπη καμπύλη αιμοσφαιρίνης

Νέα καμπύλη γίνεται κάθε φορά που αλλάζει η παρτίδα του αντιδραστηρίου.

1. Σε πλαστικό σωληνάριο κάνουμε συνήθως τρεις αραιώσεις του ρυθμιστικού διαλύματος (calibrator ή standard) με το Drapkin για να δημιουργήσουμε ένα εύρος συγκεντρώσεων αιμοσφαιρίνης.

Παράδειγμα:

- ✓ Σε ένα πλαστικό σωληνάριο κάνουμε αραιώση του standard που έχει συγκέντρωση π.χ. $C=15 \text{ gr/dl}$ (η τιμή δίνεται έτοιμη από το εμπόριο) με Drapkin, σε αναλογία 1:250 (20 μl ή 0,02 ml standard μέσα σε 5000 μl ή 5 ml Drapkin).
- ✓ Ετοιμάζουμε δύο σωληνάρια και βάζουμε και στα δύο 500 μl ή 0,5 ml Drapkin
- ✓ Προσθέτουμε στο πρώτο από τα δύο σωληνάρια 500 μl ή 0,5 ml από το αραιωμένο standard (αραιώση 1:500). Η συγκέντρωση γίνεται 7,5 gr/dl. Αναδεύουμε καλά και
- ✓ Προσθέτουμε 500 μl ή 0,5 ml από το πρώτο σωληνάριο στο δεύτερο (αραιώση 1:1000). Τώρα η συγκέντρωση γίνεται 3,75 gr/dl. Αναδεύουμε.

2. Φωτομετρούμε στα 540nm την απορρόφηση των τριών δειγμάτων.

3. Σε ένα χιλιομετρικό χαρτί ορίζουμε τον άξονα των x (τετμημένων) ως άξονα των απορροφήσεων (A) και τον άξονα των y (τεταγμένων) ως άξονα της συγκέντρωσης (C) σε gr/dl.