

Ορμονικοί προσδιορισμοί

Μπότουλα Ευθυμία

Χημικός, Ορμονολογικό Εργαστήριο Ενδοκρινολογικού Τμήματος

Γ.Ν.Α. «Ευαγγελισμός»

A' Μέθοδοι προσδιορισμού των ορμονών

Από το 1960 που οι Yallow και Berson δημοσίευσαν το κλασικό άρθρο τους για το ραδιοανοσολογικό προσδιορισμό της ινσουλίνης, μέχρι σήμερα, τεράστια πρόοδος έχει σημειωθεί στην εναισθησία και ειδικότητα των μεθόδων μέτρησης των ορμονών, αλλά και στην απλοποίηση της διαδικασίας τους, σαν επακόλουθο της ανάπτυξης της βιοτεχνολογίας^{1,2,3}. Με χρονολογική σειρά, οι κυριότερες μέθοδοι περιληπτικά είναι:

1. Βιολογικές μέθοδοι (Bioassays)

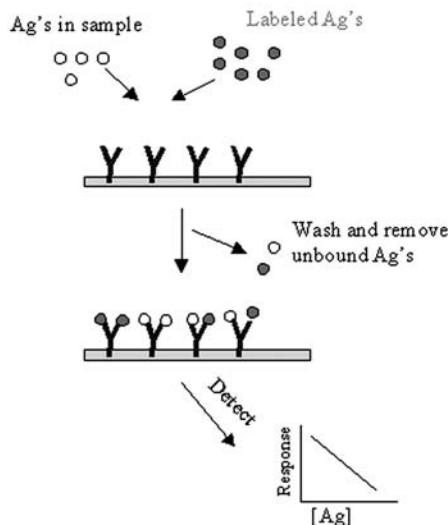
Σήμερα έχουν εγκαταλειφθεί ως μέθοδοι ρουτίνας. Βασίζονται στην προσπάθεια να αναπαράγουν ένα ή περισσότερα από τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά ή τις βιοχημικές δράσεις των ορμονών, συγκρίνοντας το αποτέλεσμα που προκύπτει από τη δράση των άγνωστων δειγμάτων με το αποτέλεσμα της δράσης μίας σειράς από αυξανόμενες δόσεις καθαρής ορμόνης, που χρησιμοποιείται σαν πρότυπο (standard).

2. Ραδιοανοσολογικές Μέθοδοι

Κυριαρχούν από τη δεκαετία του '60 μέχρι σήμερα. Στηρίχθηκαν σε δύο βασικά σημεία:

- A) Εκμεταλλεύτηκαν τις αντιγονικές ιδιότητες των πρωτεΐνικών ορμονών
- B) Χρησιμοποιώντας τη σήμανση των ορμονών με ραδιοϊσότοπο, έκαναν δυνατή τη μέτρηση πολύ μικρών ποσοτήτων ορμονών, πράγμα αδύνατο με τις μέχρι τότε κλασικές χημικές μεθόδους.

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ της σημασμένης με ραδιοϊσότοπο (θερμής) ορμόνης και της μη σημασμένης (ψυχρής) για τη σύνδεση με το ειδικό αντίσωμα και τη δημιουργία συμπλοκών αντιγόνου-αντισώματος (Ag. Ab) Σχ.1.



Σχήμα 1.

Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της μη σημασμένης ορμόνης (δηλαδή της ουσίας που θέλουμε να μετρήσουμε) τόσο λιγότερη σημασμένη ορμόνη Ag^* θα συνδεθεί με το αντίσωμα. Αν στη συνέχεια διαχωρίσουμε τη σημασμένη από την ελεύθερη ορμόνη και μετρήσουμε την πρώτη σε μετρητή ακτινοβολίας μπορούμε να υπολογίσουμε την αρχική ποσότητα ορμόνης στο διάλυμα.

Ο υπολογισμός γίνεται με την κατασκευή καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα (standards) γνωστής περιεκτικότητας σε καθαρή ορμόνη.

Άρα για μία RIA (Radio Immuno assay) μέθοδο πρέπει να έχουμε:

1. Καθαρή ορμόνη (αντιγόνο) για τα πρότυπα διαλύματα αλλά και για την παραγωγή αντισώματος.
2. Αντίσωμα: Λαμβάνεται από το αίμα ζώου, στο οποίο έχει ενεθεί η καθαρή ορμόνη. Πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο ειδικό για την αποφυγή σταυρωτών αντιδράσεων (cross reactions)
3. Σημασμένη ορμόνη: Η σήμανση γίνεται κυρίως με I^{125} , που ενσωματώνεται στην τυροσίνη των πρωτεΐνικών ορμονών. Για τη σήμανση των στεροειδικών ορμονών χρησιμοποιούνταν παλαιότερα κυρίως, το H^3 .

Η διαδικασία των μεθόδων RIA περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- A. Ανάμειξη του ορού ή πλάσματος με τη θερμή ορμόνη και το αντίσωμα
- B. Επώαση

Γ. Διαχωρισμός της ελεύθερης από τη συνδεδεμένη ορμόνη. Γίνεται με πολλούς τρόπους, όπως:

- 1) Μέθοδος καταβύθισης με διπλό αντίσωμα
- 2) Προσρόφηση σε ενεργό άνθρακα
- 3) Καταβύθιση με θεικό αμμώνιο.
- 4) Ιονανταλλακτικές ρητίνες
- 5) Μέθοδοι με το αντίσωμα σε στερεή φάση (π.χ. Coated tubes)

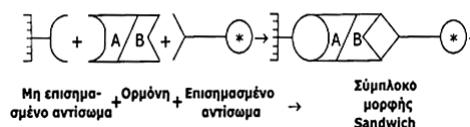
Δ. Μέτρηση σε μετρητή ακτινοβολίας

Ε. Κατασκευή καμπύλης αναφοράς και υπολογισμός αποτελεσμάτων. Με τη μέθοδο αυτή μετρώνται Κορτιζόλη, Αλδοστερόνη, 170H Προγεστερόνη, Δ4 Ανδροστενδιόνη, DHEA-S, DHEA, Επινεφρίνη, Νορεπινεφρίνη, Ντοπαμίνη.

Παραλλαγές των μεθόδων RIA

1. Μέθοδοι IRMA (Immuno Radiometric Assays): Σ' αυτές σημαίνομε το αντίσωμα αντί για το αντιγόνο.
2. Μέθοδος IRMA Sandwich: Δύο μονοκλωνικά συνήθως αντισώματα, ένα σε στερεή φάση και ένα (σημασμένο) σε διάλυμα, αντιδρούν με δύο διαφορετικά σημεία του μορίου της ορμόνης και το παγιδεύουν υπό τη μορφή Sandwich. Με τη μέθοδο αυτή μετρώνται: Ρενίνη, ACTH. Σχ.2.

Σήμανση του αντισώματος αντί για το αντιγόνο



Σχήμα 2

3. Radio-Receptors Assays: Αντί για αντίσωμα χρησιμοποιείται σημασμένη η πρωτεΐνη-υποδοχέας της ορμόνης.
4. Competitive Binding Protein Assays: Αντί για αντίσωμα χρησιμοποιείται η ειδική δεσμευτική πρωτεΐνη της ορμόνης.

3. Μη ισοτοπικές ανοσολογικές μέθοδοι

Προβλήματα που σχετίζονται με τη σταθερότητα αλλά και το μικρό χρόνο ζωής του I^{125} σε συνδυασμό με το μεγάλο κόστος των εγκαταστάσεων και των

μετρητικών συσκευών για τις μεθόδους RIA, μαζί με μία αυξανόμενη σε όλες τις χώρες τάση να ελαχιστοποιηθεί η χρήση των ραδιοϊσοτόπων οδήγησαν στην ανάπτυξη μη ισοτοπικών ανοσολογικών μεθόδων, που στηρίζονται στις ίδιες ακριβώς αρχές όπως η RIA με τη διαφορά ότι για τη σύμανση χρησιμοποιούν:

- α. Ένζυμο, κυρίως υπεροξειδάση ή αλκαλική φωσφατάση: Ενζυμο-ανοσολογικές μέθοδοι (ELISA= Enzyme Linked Immunosorbent Assays ή EIA= Enzyme Immunoassay).

Υστερούν των RIA σε ευαισθησία και παρουσιάζουν προβλήματα στην επαναληψιμότητα (εξάρτηση της αντίδρασης ενζύμου-υποστρώματος από χρόνο, pH, θερμοκρασία)

- β. Φθορίζουσα ουσία (Λανθανίδες): Είναι ουσίες που, όταν διεγερθούν από πηγή φωτονίων, αποδιεγερόμενες εκπέμπουν φωτόνια μεγαλύτερου μήκους κύματος: Φθοριοανοσολογικές μέθοδοι (FIA: Fluoro Immuno Assay και αντίστοιχα IFMA: Immuno Fluoro Metric Assay).

- γ. Χημειοφωταύγεια (CIA: Chemiluminescence Immuno Assay αν η μέθοδος είναι ανταγωνισμού και αντίστοιχα ICMA: Immuno Chemilumino Metric Assay αν η μέθοδος είναι τύπου sandwich).

Σήμερα αποτελεί την πιο διαδεδομένη από τις τρεις και χρησιμοποιείται σαν μέθοδος ρουτίνας παράλληλα με τις RIA. Για το λόγο αυτό αναφέρεται εκτενώς η αρχή της μεθόδου και τα πλεονεκτήματά της έναντι των RIA^{4,5,6,7}.

Χημειοφωταύγεια (Chemiluminescence) είναι το φυσικό φαινόμενο της παραγωγής φωτεινής ακτινοβολίας από μία εξώθερμη χημική αντίδραση. Η οξειδαναγωγική αυτή αντίδραση παρέχει την ενέργεια σε προϊόν της ώστε αυτό να διεγερθεί. Καθώς αμέσως αποδιεγέρεται για να επιστρέψει σε σταθερή ενεργειακή κατάσταση, εκπέμπει χαρακτηριστική φωτεινή ακτινοβολία. Η αντίδραση περιγράφεται απλοποιημένα από την εξίσωση

$$A + B \Rightarrow C^* \Rightarrow C + h\nu,$$

Όπου A και B τα αντιδρώντα και C το διεγειρόμενο προϊόν.

Η ακτινοβολία αυτή μπορεί να μετρηθεί από μία σχετικά απλή μετρητική συσκευή, το φωτόμετρο χημειοφωταυγειομετρίας ή λουμινόμετρο. Η χημειοφωταύγεια, ως ιχνηθέτης για την παραγωγή σήματος και την τελική ανίχνευση στις ανοσοαναλύσεις, άρχισε να δοκιμάζεται ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του '80. Ακόμα και σήμερα συνεχίζονται οι έρευνες για την ανάπτυξη νέων χημειοφωταυγών μορίων με χαρακτηριστικά που να εξασφαλίζουν καλύτερες επιδόσεις στις αναλύσεις. Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα σήμερα μόρια είναι:

- Κυκλικές υδραζίδες
- Εστέρες ακριδίνης, που έχουν και τη μεγαλύτερη εφαρμογή

- Διοξετάνια
- Άλατα του ρουθηνίου

Πλεονεκτήματα της ανίχνευσης με χημειοφωταύγεια στις ανοσοαναλύσεις:

- Ευαισθησία: είναι το σημαντικότερο πλεονέκτημα καθώς επιτρέπει να αναπτύσσονται μέθοδοι με πολύ χαμηλό όριο ανίχνευσης, δηλαδή να μετρώνται με ακρίβεια πολύ μικρές ποσότητες π.χ. πρωτεΐνης.
- Γραμμικότητα: Η καμπύλη παρουσιάζει γραμμικότητα σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων.
- Ταχύτητα μέτρησης: Μία φωτεινή αναλαμπή εκπέμπεται σε λιγότερο από ένα δευτερόλεπτο.
- Δεν υπάρχει σκέδαση ή απόσβεση της ακτινοβολίας όπως στο φθορισμό, γιατί δεν υπάρχει εξωτερική πηγή ακτινοβολίας.
- Αντιδραστήρια: Με μεγάλο χρόνο ζωής σε σχέση με τα ισότοπα, μη τοξικά για το περιβάλλον, δεν υπάρχουν σαν συστατικά στα βιολογικά υγρά όπως τα ένζυμα.
- Μετρητικές συσκευές: σχετικά απλές, προσφέρονται για αυτοματοποίηση.

Μειονεκτήματα των ιχνηθετών χημειοφωταύγειας:

- Η μικρή διαλυτότητά τους σε υδατικά διαλύματα, που δυσκολεύει τη διαδικασία επισήμανσης των πρωτεϊνών και η αστάθειά τους λόγω υδρόλυσης. Τα προβλήματα αυτά έχουν αντιμετωπιστεί με την ενσωμάτωση στα μόρια αυτά κατάλληλων υποκαταστατών.
- Η διαδικασία της μέτρησης είναι περισσότερο κρίσιμη απ' ότι στις ισοτοπικές τεχνικές, γιατί δεν έχουμε αυθόρυμη εκπομπή ακτινοβολίας, αλλά προηγείται αντίδραση, και άρα υπάρχει εξάρτηση από pH, θερμοκρασία, διαλύτες, που αποτελούν πιθανές πηγές σφαλμάτων.
- Το φωτεινό σήμα έχει κινητικό χαρακτήρα και δεν είναι συνεχές, όπως στα ισότοπα. Παρουσιάζει μία κορυφή (αναλαμπή) ή ένα plateau και μετά πέφτει. Τα δείγματα δεν είναι δυνατόν να ξαναμετρηθούν.

4. HPLC, Υγρή χρωματογραφία νψηλής πίεσης

Χρονολογικά η χρωματογραφία σαν μέθοδος προηγείται των ραδιοανοσολογικών. Όμως με την αλματώδη εξέλιξη που είχαμε στο χώρο της χρωματογραφίας στις στήλες διαχωρισμού και στους ανιχνευτές, πετύχαμε γρήγορη και ταυτόχρονη ποιοτική και ποσοτική ανάλυση ομογενούς μείγματος ρευστών.

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στις διαφορετικές φυσικές και χημικές ιδιότητες των στοιχείων ενός μείγματος όπως η λεκτρικό φορτίο, μοριακό βάρος, μέγεθος μορίου κ.λ.π.. Χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό των VMA, κατεχολαμινών, και μετανεφρινών. Χρησιμοποιείται επίσης και σε ερευνητικά εργαστήρια σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας (MS) για τη μέτρηση πολλών κορτικοστεροειδών και ενδιάμεσων προϊόντων της στεροειδογένεσης.

Β' Αξιολόγηση των μεθόδων

Η ικανότητα ενός εργαστηρίου να επιτυγχάνει αξιόπιστα αποτελέσματα εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων, σπουδαιότερος των οποίων είναι η εκλογή των αναλυτικών μεθόδων που θα χρησιμοποιηθούν^{8,9,10}. Η εκλογή βασίζεται στην αξιοπιστία της μεθόδου, τα κριτήρια αξιοπιστίας της οποίας είναι:

Α) *Επαναληψιμότητα*, δηλαδή το μέτρο της διακύμανσης των αποτελεσμάτων σε επαναληπτικούς προσδιορισμούς του ίδιου δείγματος, εκφράζεται δε από την τυπική απόκλιση SD ή το συντελεστή διακύμανσης CV.

Β) *Εξειδίκευση*: αναφέρεται στην ικανότητα της μεθόδου να αναγνωρίζει και να συνδέεται μόνο με την ουσία που μας ενδιαφέρει. Μέτρο της εξειδίκευσης είναι η διασταυρούμενη δραστικότητα.

Γ) *Εναισθησία*: αναφέρεται στη μεταβολή του αναλυτικού σήματος με τη μεταβολή της συγκέντρωσης της ορμόνης. Συνδέεται άμεσα με το όριο ανίχνευσης.

Δ) *Ακρίβεια*: εκφράζει τη ικανότητα της μεθόδου να προσδιορίζει την πραγματική συγκέντρωση των αγνώστων δειγμάτων. Για να είναι μία ανάλυση ακριβής θα πρέπει να συνδυάζει καλή επαναληψιμότητα και εξειδίκευση.

Γ' Παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν κατά την αξιολόγηση των τιμών των ορμονικών προσδιορισμών

Προκειμένου να αξιολογήσουμε σωστά τα αποτελέσματα ενός ορμονικού προσδιορισμού, θα πρέπει να λάβουμε υπ' όψιν ορισμένους παράγοντες που επηρεάζουν τόσο την τιμή, όσο και την ερμηνεία της. Αυτοί διακρίνονται σε:

- Παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή και την προετοιμασία του.
- Παράγοντες που σχετίζονται με το δείγμα.
- Παράγοντες που σχετίζονται με την ίδια τη φύση των ορμονών αλλά και με ενδογενείς περιορισμούς των ανοσομετρήσεων.

Οι παράγοντες αυτοί καταγράφονται στη συνέχεια ανά ορμόνη προς διευκόλυνση του αναγνώστη.

1. Φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη (Κορτικοτροπίνη, ACTH)

A. Χημική δομή και σύνθεση

Η φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη (adrenocorticotrophic hormone ACTH) είναι τμήμα του μεγαλύτερου πρόδρομου μορίου, της προ-οπιομελανοκορτίνης (pro-opiomelanocortin, POMC). Αντίθετα με άλλες προ-ορμόνες, με τη διάσπαση της POMC απελευθερώνονται αρκετά πεπτίδια, ορμονικά ενεργά, όπως οι ενδορφίνες και οι μελανοτρόπες ορμόνες (που διεγείρουν τα μελανοκύτταρα). Η POMC συντίθεται φυσιολογικά, μόνο από την υπόφυση, ορισμένοι όμως κακοήθεις όγκοι παράγουν επίσης μεγάλες ποσότητες προ-ορμόνης, με αποτέλεσμα την εμφάνιση του συνδρόμου έκτοπης παραγωγής ACTH^{11,12}.

B. Ρύθμιση της σύνθεσης και έκκριση της ACTH

Η ACTH αποτελείται από 39 αμινοξέα, ενώ η βιολογική της δράση ασκείται από τα 24 υπολείμματα του αμινοτελικού της άκρου. Εκκρίνεται κατά ώσεις, μετά από επίδραση στρεσογόνων ερεθισμάτων, οι οποίες επιπροστίθενται στον χαρακτηριστικό ημερήσιο (κιρκάδιο) ρυθμό έκκρισής της, με αιχμή γύρω στις 05.00 το πρωί (50-200 pg/ml), και χαμηλές τιμές τα μεσάνυχτα (20-50 pg/ml). Κυκλοφορεί ως ελεύθερη μορφή, με χρόνο ημίσειας ζωής περίπου 10'. Η ACTH διεγείρει τη σύνθεση και την απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών ορμονών, αλληλεπιδρώντας με τους υποδοχείς της στην επιφάνεια των κυττάρων του φλοιού των επινεφριδίων και οδηγώντας σε αύξηση της ενδοκυττάριας παραγωγής cAMP. Σε οξείες καταστάσεις, η σύνθεση κορτιζόλης από τα επινεφρίδια αυξάνεται μέσα σε 3', κυρίως με τη διέγερση της εστεράσης της χοληστερόλης.

Η αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση της έκκρισης της ACTH από την κορτιζόλη γίνεται σε δύο χρόνους, που αφορούν τόσο τον υποθάλαμο, όσο και την υπόφυση: η ταχεία αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση μεταβάλλει την υποθαλαμική έκκριση της CRH και τη διαμεσολαβούμενη από την CRH έκκριση της ACTH, ενώ η παρατεταμένη αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση οφείλεται στη μείωση της σύνθεσης της CRH και της AVP, καθώς και στην καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου της POMC, με αποτέλεσμα τη μείωση της σύνθεσης της ACTH.

C. Προσδιορισμός της ACTH

i) Προαναλυτικές συνθήκες- Άλληλεπιδράσεις

- Το μόριο της ελεύθερης ACTH είναι ιδιαίτερα ασταθές στο ολικό αίμα, οξειδώνεται εύκολα και με τη μεταβολή της θερμοκρασίας κατά την ψύξη-απόψυξη διασπάται από τις πρωτεάσεις του πλάσματος σε ανοσοδραστικά κλάσματα. Παλαιότερα υπήρχαν εργασίες που ανέφεραν ότι απορροφάται

το μόριο της ACTH στις γυάλινες επιφάνειες των σωληναρίων και απαιτείτο επίστρωση με σιλικόνη. Νεότερες έρευνες δεν το επιβεβαιώνουν.

- Όπως αναφέρθηκε υπάρχει κιρκάδιος ρυθμός έκκρισης της ACTH. Ο ρυθμός αυτός απονομάζεται από το νεογέννητο και εμφανίζεται κοντά στην ηλικία των δύο ετών.
- α βασικά επίπεδα της ACTH εξαρτώνται από τον έμμηνο κύκλο και την εγκυμοσύνη
- Ορισμένα μεταβολικά, ψυχογενή ή αισθητικά ερεθίσματα οδηγούν σε αύξηση των επιπέδων της ACTH μέσω του υποθάλαμου που εκκρίνει τον εκλυτικό παράγοντα CRF. Έτσι έχουμε αύξηση των επιπέδων ACTH σε: υπογλυκαιμία, χορήγηση ινσουλίνης, L-Dopa, Μετυραπόνη, Βαζοπρεσίνη. Καταστάσεις stress, συγκίνησης, έντονης άσκησης, πυρετού και τραυματισμών αυξάνουν τα επίπεδα της ACTH.
- Μείωση παρατηρείται μετά από χορήγηση κορτικοστεροειδών.

Συνοπτικά ο ασθενής θα πρέπει:

- Να μην λαμβάνει ACTH, υδροκορτιζόνη ή άλλα στεροειδή που θα επηρεάσουν την ανάλυση ή θα καταστείλουν την έκκριση των επινεφριδίων.
- Να αποφεύγει τη φυσική ή πνευματική κόπωση
- Να προσέλθει στο εργαστήριο πρωί, 8.00- 8.30, και νηστικός.
- Να παραμείνει απόλυτα ήρεμος τουλάχιστον 30' πριν τη δειγματοληψία

Το εργαστήριο θα πρέπει:

- Να χρησιμοποιεί παγωμένα σωληνάρια (πολυυαρενίου) με αντιπηκτικό EDTA (π.χ. σωληνάρια γενικής αίματος)
- Να χρησιμοποιεί παγωμένες σύριγγες για την αιμοληψία
- Να φυγοκεντρείται το δείγμα αμέσως σε ψυχόμενη φυγόκεντρο
- Να αποχωρίζεται το πλάσμα αμέσως από το ολικό αίμα
- Να καταψύχεται άμεσα
- Να αποφεύγεται ψύξη- απόψυξη του ίδιου δείγματος

ii) Μέθοδος Προσδιορισμού

Η ACTH προσδιορίζεται με την τεχνική IRMA sandwich ή ICMA sandwich αναλόγως δηλαδή αν ο ιχνηθέτης είναι ραδιενεργό ή χημειοφωτανγές μόριο.

Οι τιμές αναφοράς είναι:

Πρωί, 9-52 pg/ml

Απόγευμα, 5-30 pg/ml

2. Κορτιζόλη

Είναι το κύριο γλυκοκορτικοειδές που συντίθεται κυρίως στην στηλιδωτή ζώνη του φλοιού των επινεφριδίων υπό τον άμεσο έλεγχο της ACTH. Πρόδρομος ουσία της κορτιζόλης είναι η χοληστερόλη.^{13,16,17,18,19}

A. Ρύθμιση της σύνθεσης και έκκρισης της κορτιζόλης

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η έκκριση της ACTH στην συστηματική κυκλοφορία δεν είναι συνεχής, αλλά κατά ώσεις που ακολουθούνται από αντίστοιχες ώσεις κορτιζόλης. Τα επεισόδια έκκρισης ACTH και κορτιζόλης χαρακτηρίζονται από απότομη αύξηση της συγκέντρωσής των και σταδιακή ελάττωση. Κάθε 24ωρο υπάρχουν 8 με 10 τέτοια επεισόδια. Επιπροσθέτως, η έκκριση της ACTH και κορτιζόλης χαρακτηρίζονται από κιρκαδικές (νυχθήμερες) μεταβολές, τόσο ως προς το εύρος, όσο και ως προς τη συχνότητα των επεισοδίων αυτών. Δηλαδή τα εκκριτικά επεισόδια είναι πιο συχνά και ευρέα κατά το δεύτερο ήμισυ του ύπνου και κατά την πρωινή έγερση.

B. Μορφές της κορτιζόλης στον ορό

Το 75% της κορτιζόλης στο αίμα είναι συνδεδεμένο με τη δεσμευτική σφαιρίνη της κορτιζόλης (cortisol binding globulin, CBG), το 15% είναι δεσμευμένο χαλαρά με αλβουμίνες, ενώ 10% είναι ελεύθερο. Η δέσμευση της κορτιζόλης με αυτές είναι αντιστρεπτή, αλλά εφ' όσον η κορτιζόλη είναι δεσμευμένη, είναι βιολογικά αδρανής. Δηλαδή, μόνο η ελεύθερη κορτιζόλη μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα και να συνδεθεί με τους υποδοχείς της. Καταστάσεις που προκαλούν αλλαγές της συγκέντρωσης της CBG στο αίμα, επηρεάζουν την ολική κορτιζόλη του ορού. Ο χρόνος της ημίσειας ζωής της στο πλάσμα είναι περίπου 100 λεπτά.

C. Καταβολισμός της κορτιζόλης τον ορού

Το ήπαρ και οι νεφροί είναι τα κυριότερα όργανα καταβολισμού της κορτιζόλης. Περίπου 30% της κορτιζόλης μεταβολίζεται σε τετρα-υδρο-κορτιζόλη και τετρα-υδρο-δεσοξυ-κορτιζόλη, και γλυκουρονίδια τους που απεκκρίνονται στα ούρα όπου και μετρείται ως 17-υδροξυκορτικοστεροειδή (17-hydroxycorticosteroids, 17-OHCS) με την αντίδραση χρωμογόνων των Porter- Silber. Ως εκ τούτου, η μέτρηση των 17-OHCS στα ούρα είναι δείκτης του ρυθμού παραγωγής της κορτιζόλης αν και με αυτή την αντίδραση μετράμε μόνο το 1/3 των μεταβολικών προϊόντων της. Η αντίδραση Porter- Silber μετρά επίσης την δεσοξυκορτιζόλη (άμεση πρόδρομη ουσία της κορτιζόλης). Ως εκ τούτου, κάθε αύξηση της συγκέ-

ντρωσης της δεσοξυκορτιζόλης (όπως στην περίπτωση συγγενούς ή μετά από χορήγηση μετοπυρόνης επικτήτου ανεπάρκειας της 11-υδροξυλάσης, του ενζύμου δηλαδή που μετατρέπει τη δεσοξυκορτιζόλη σε κορτιζόλη), έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των 17-OHCS στα ούρα.

Δ. Προσδιορισμός της κορτιζόλης

i) Προαναλυτικές συνθήκες- Άλληλεπιδράσεις^{21,22,23}

- Στους εσωτερικούς ασθενείς η αιμοληψία γίνεται στην κλίνη πριν τη λήψη πρωινού, ενώ στους εξωτερικούς ασθενείς συνίσταται 30λεπτη τουλάχιστον ηρεμία πριν την αιμοληψία.
- Η εγκυμοσύνη, τα αντισυλληπτικά, η θεραπεία με οιστρογόνα και οι ηπατοπάθειες αυξάνουν τη συγκέντρωση της ολικής κορτιζόλης στον ορό σαν αποτέλεσμα της αύξησης της CBG
- Αύξηση των επιπέδων της κορτιζόλης λόγω διασταυρούμενης αντίδρασης, δίνουν οι ουσίες: πρεδνιζολόνη, 6-α-μεθυλπρεδνιζολόνη, πρεδνιζόνη, κορτικοστερόνη, 6-β-υδροκορτιζόλη, 11-δεσοξυκορτιζόλη, 21-δεσοξυκορτιζόλη, κορτιζόνη, αλλοτετραϋδροκορτιζόλη, αμφεταμίνες, αιθανόλη, νικοτίνη, βαζοπρεσίνη.
- Καταστάσεις έντονου άγχους, επίσης αυξάνουν την τιμή της κορτιζόλης γι' αυτό και συνίσταται η 30λεπτη ηρεμία πριν την αιμοληψία.
- Μείωση των επιπέδων της κορτιζόλης έχουμε κατά τη θεραπεία με ανδρογόνα και τη χορήγηση μορφίνης, φαινυντοϊνης, μετυραπόνης, β-μεθαζόνης, δεξαμεθαζόνης και αμινογλουτεθιμίδης
- Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να ληφθεί υπόψη ο χρόνος της δειγματοληψίας, λόγω του κιρκάδιου ρυθμού έκκρισης της κορτιζόλης. Γι' αυτό η πρωινή λήψη γίνεται 8.00 με 9.00 π.μ., ενώ για τον έλεγχο του ρυθμού, η απογευματινή γίνεται 4.00-6.00 μ.μ.
- Τέλος, τα ετεροφιλικά αντισώματα μπορούν να παρέμβουν στην μέτρηση. Τα αντισώματα αυτά αναπτύσσονται στον ορό ορισμένων ανθρώπων προς τις ανοσοσφαιρίνες ζώων. Η προέλευσή τους μπορεί να είναι ιατρογενής, δηλαδή να αναπτύσσονται μετά από χορήγηση φαρμακευτικών ή διαγνωστικών ουσιών, ή μη ιατρογενής, π.χ. συγκατοίκηση και ενασχόληση με ζώα.

ii) Μέθοδος Προσδιορισμού

- Ορός ή πλάσμα: Μετράται η ολική κορτιζόλη (δεσμευμένη στη CBG και ελεύθερη) ραδιοανοσολογικά με τη μέθοδο του ανταγωνισμού και με χημειοφωτανγεία, με την ίδια μέθοδο. Χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα μεγάλης εξειδίκευσης και γι' αυτό δεν απαιτείται εκχύλιση για απομόνωση της κορτιζόλης.

Οι τιμές αναφοράς είναι:

Πρωί: 8-24 μg/dl

Απόγευμα: 2-17 μg/dl

- Ούρα 24ώρου: Η μέτρηση της κορτιζόλης στα ούρα 24ώρου αποτελεί άριστη μέθοδο ελέγχου της λειτουργίας του επινεφριδικού φλοιού, λόγω του ότι ταυτίζεται με το «ελεύθερο» (μη πρωτεϊνικά συνδεδεμένο) και συνεπώς βιολογικά δραστικό κλάσμα της, αλλά και γιατί αποτελεί αντιπροσωπευτικότερο μέτρο της 24ωρης παραγωγής της. Αν και η εξειδίκευση των χρησιμοποιούμενων αντισωμάτων στις τεχνικές αυτές είναι γενικά αποδεκτή για τους προσδιορισμούς στον ορό, τα ούρα περιέχουν πολλές ουσίες, τόσο μεταβολίτες της κορτιζόλης, όσο και άλλες μη ακριβώς προσδιορισμένες ουσίες οι οποίες παρεμβαίνουν στη μέτρηση της κορτιζόλης δίνοντας διασταυρούμενη αντίδραση. Γι' αυτό και προηγείται στάδιο εκχύλισης για απομόνωση της κορτιζόλης.

Οι τιμές αναφοράς είναι <100 μg/24ωρο.

- Σίελος: Και στον σίελο, όπως και στα ούρα, τα επίπεδα της κορτιζόλης αντανακλούν το ελεύθερο κλάσμα του ορού και έχουν χρησιμοποιηθεί ως μία αξιόπιστη εναλλακτική λύση για τη μελέτη του άξονα Υποθάλαμος-Υπόφυση-Επινεφρίδια. Το σπουδαιότερο πλεονέκτημα του σιέλου είναι η μη επεμβατική και χωρίς stress συλλογή του, η οποία μπορεί να γίνει και εκτός εργαστηρίου. Ωστόσο η αξιολόγηση των επιπέδων της κορτιζόλης στο σίελο πρέπει να παίρνει υπόψη της εκτός από τους γνωστούς παράγοντες που επηρεάζουν και τα επίπεδα στον ορό (ηλικία, κιρκάδιος ρυθμός κ.λ.π.) και παράγοντες όπως γεύματα, κάπνισμα, θέση του σώματος που επηρεάζουν τη σύνθεση και την έκκριση του σιέλου.

Οι χρωματογραφικές μέθοδοι, δηλαδή η HPLC χρησιμοποιείται σε ερευνητικά εργαστήρια για την απομόνωση και μέτρηση της κορτιζόλης.

3. Επινεφριδικά Ανδρογόνα

Η ACTH ρυθμίζει την παραγωγή των ανδρογόνων, δεδομένου ότι η DHEA και η ανδροστενδίονη εκκρίνονται ταυτόχρονα με την κορτιζόλη. Η παραγωγή των ανδρογόνων αρχίζει γύρω από την ηλικία των 9 ή 10 χρονών, αυξάνεται με μέγιστο στα 20 και μειώνεται μετά τα 30 φτάνοντας σε χαμηλά επίπεδα μετά τα 70 χρόνια.

A) Δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) και θεική DHEA (DHEAS)

Η DHEA και ο θεικός της εστέρας DHEAS αποτελούν τα κυριότερα ανδρογόνα των επινεφριδίων στους ενήλικες. Το 90% της DHEA και το 100% της

DHEAS προέρχονται από τη δικτυωτή ζώνη του φλοιού των επινεφριδίων. Ο μεταβολισμός τους είναι κοινός, αλλά στην περίπτωση της DHEAS η μεταβολική διεργασία είναι 100 φορές βραδύτερη από της DHEA, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της DHEAS στον ορό να είναι εξαιρετικά υψηλή (800-3500 ng/ml) σε σχέση με τη DHEA (3,5-7 ng/ml). Ένεκα της μεγάλης ημερήσιας παραγωγής, αλλά και του μεγάλου χρόνου ημίσειας ζωής, η συγκέντρωση της DHEAS δεν μεταβάλλεται ούτε κατά τη διάρκεια του 24ώρου, ούτε κατά τη διάρκεια του κύκλου, εξαρτάται όμως από το φύλο και την ηλικία. Στις γυναίκες παρατηρείται μεγάλη πτώση μετά τα 30 χρόνια, ιδιαιτέρως όμως στην εμμηνόπαυση. Γι' αυτό και χαρακτηρίζεται ορμόνη του γήρατος. Στο ήπαρ η DHEAS μετατρέπεται σε DHEA, η οποία σε μικρό σχετικά ποσοστό (5-7%) μεταβολίζεται σε Δ4- Ανδροστενδιόνη (Δ4A) και Τεστοστερόνη (T). Με τον ηπατικό αυτό μεταβολισμό των ανδρογόνων αυξάνεται αφενός η ανδρογονική δράση (μετατροπή ασθενέστερων, προς ισχυρότερα ανδρογόνα), αφετέρου διαπιστώνεται εξωγοναδική πηγή παραγωγής T, που μπορεί να είναι σημαντική για τις γυναίκες.

i) Προσδιορισμός της DHEAS, DHEA

Δεν απαιτείται καμία ειδική προετοιμασία του ασθενούς, ούτε κάποια ειδική κατεργασία του δείγματος. Η μέτρηση γίνεται ραδιοανοσολογικά με την τεχνική του ανταγωνισμού και για τις δύο ορμόνες ή με χημειοφωταύγεια σε ορό. Η παρουσία κλομιφαίνης και κορτικοτροπίνης αυξάνει τα επίπεδα της DHEA ενώ της DHEAS μόνο η κλομιφαίνη. Μείωση των επιπέδων της DHEA προκαλούν οι: Καρβαμαζεπίνη, Τεστοστερόνη, Γλυκοκορτικοειδή, όπως επίσης και καταστάσεις ψύχωσης και ψωρίασης, ενώ της DHEAS οι Δεξαμεθαζόνη, Πρεδνιζόνη, Γλυκοκορτικοειδή.

Τιμές αναφοράς:

DHEA: Άνδρες: 1,5-12,5 ng/ml

Γυναίκες: 1,0-10,5 ng/ml

DHEAS: Άνδρες: 18-30 ετών 1500-6000 ng/ml

31-50 ετών 1000-4500 ng/ml

51-60 ετών 500-4100 ng/ml

>60 ετών 100-2900 ng/ml

Γυναίκες: 18-30 ετών 700-3900 ng/ml

31-50 ετών 400-3800 ng/ml

B) Δ4-Ανδροστερόνη(Δ4A)

Παράγεται εξίσου από τον φλοιό των επινεφριδίων και από την ωοθήκη. Περίπου το ίμιου της παραγόμενης Δ4A μεταβολίζεται στους περιφερικούς ιστούς (λίπος, δέρμα) σε Τ. Η μετατροπή αυτή συμβάλλει σημαντικά στην τελική διαμόρφωση της στάθμης της Τ στον ορό, με αποτέλεσμα τη δημιουργία αρρενοποιητικών φαινομένων σε περιπτώσεις υπερέκκρισης της ορμόνης. Επίσης, δεν απαιτείται καμία προετοιμασία του ασθενούς ή ιδιαίτερη κατεργασία του δείγματος, η μέτρηση του οποίου γίνεται ραδιοανοσολογικά με την τεχνική του ανταγωνισμού.

Παρεμβόλες έχουμε από: κορτικοτροπίνη, κλομιφαίνη, μετυραπόνη, οι οποίες αυξάνουν τα επίπεδα της Δ4A ενώ τα κορτικοστεροειδή επιφέρουν μείωση Τιμές αναφοράς: Άνδρες: 0,6-2,7 ng/ml

Γυναίκες: 0,5-2,5 ng/ml

Γ) 17 α-νδροξυπρογεστερόνη (17-OHP)

Η ορμόνη αυτή είναι σημαντικό ενδιάμεσο προϊόν στη σύνθεση της κορτιζόλης και των ανδρογόνων, τόσο από τα επινεφρίδια, όσο και από τις ωοθήκες. Κλινικά η μέτρησή της έχει σημασία στην αξιολόγηση κληρονομικών ή επίκτητων διαταραχών στα ένζυμα σύνθεσης των επινεφριδιακών στεροειδών ορμονών. Για τον προσδιορισμό της δεν απαιτείται καμία ιδιαίτερη κατεργασία του δείγματος ούτε προετοιμασία του ασθενούς. Η μέτρηση γίνεται ραδιοανοσολογικά, με την τεχνική του ανταγωνισμού και δεν απαιτείται εκχύλιση λόγω της μεγάλης ειδικότητας των αντισωμάτων. Οι τιμές της 17-OHP αυξάνονται υπερβολικά μετά από ενδοφλέβια χορήγηση ACTH επί μερικής ανεπάρκειας 21-υδροξυλάσης.

Τιμές αναφοράς: Άνδρες: 0,5-2,5 ng/ml

Γυναίκες: Παραγωγική φάση: 0,2-1,0 ng/ml

Ωχρινική φάση: 1,0-5,0 ng/ml

4. Αλδοστερόνη

Η αλδοστερόνη, το κύριο αλατοκορτικοειδές συντίθεται και εκκρίνεται στην κυκλοφορία από κύτταρα της σπειροειδούς ζώνης των επινεφριδίων. Η σύνθεση της επιτελείται όπως και για άλλα στεροειδή με διαδοχικά ενζυμικά βήματα που ξεκινούν από τη χοληστερόλη που σε ποσότητα αθροιζεται στον επινεφρικό φλοιο.

A). Χημεία

Η χημική της ονομασία είναι Δ4-πρεγνεν, 11β-21 α-διόλ,18αλ,3-20 διόνη και το M.B. είναι 360D.

B). Έκκριση - Μεταβολισμός

Η αλδοστερόνη κατά την είσοδό της στην κυκλοφορία κατακρατείται εκλεκτικά από τους νεφρούς και το έντερο και συγχρόνως ακολουθεί τη μεταβολική τύχη των στεροειδικών ορμονών. Στο αίμα είναι συνδεδεμένη με χαλαρούς δεσμούς με λευκωματίνες. Στο ήπαρ υφίσταται αλλεπάλληλες αναγωγές μετατρεπόμενη κυρίως σε τετραϋδοπαράγωγα. Οι μεταβολίτες της συνδέονται με γλυκούρονικό οξύ και αποβάλλονται στα ούρα. Η έκκριση της αλδοστερόνης ρυθμίζεται:

- 1) από το σύστημα ρενίνης - αγγειοτενοίνης
- 2) από τους ηλεκτρολύτες
- 3) από το κεντρικό νευρικό σύστημα
- 4) από την ACTH

Η αλδοστερόνη δρα προάγοντας την επαναπορρόφηση του νατρίου από τα κύτταρα του επιθηλίου του άπω εσπειραμένου σωληναρίου. Παράλληλα έχουμε σύγχρονη αποβολή ιόντων K+, H+, NH4+, Mg++. Ανάλογη δράση εμφανίζει και στα επιθήλια αδένων, όπως στους σιελογόνους ιδρωτοποιούς, καθώς επίσης και στο εντερικό επιθήλιο.

C). Προσδιορισμός της Αλδοστερόνης

i). Προαναλντικές συνθήκες— Αλληλεπιδράσεις^{24,25}

Απαιτείται διακοπή όλων των φαρμάκων για δύο εβδομάδες. Για τον προσδιορισμό της αλδοστερόνης σε ύπτια θέση θα πρέπει η λήψη να γίνει αμέσως μόλις ξυπνήσει ο ασθενής και πριν ανασηκωθεί από το κρεβάτι. Η λήψη σε όρθια θέση γίνεται μετά από παραμονή τουλάχιστον για μία ώρα σε όρθια θέση. Σε περιπατητικούς ασθενείς, η λήψη σε όρθια θέση γίνεται αμέσως αφού προσέλθουν στο εργαστήριο και σε ύπτια θέση αφού παραμείνουν ξαπλωμένοι τουλάχιστον για μία ώρα.

Ο ορός ή το πλάσμα μπορεί να παραμείνει το πολύ μια ημέρα στους 2Γ-8°C και στη συνέχεια πρέπει να καταψυχθεί (-20°C). Καλό είναι να αποφεύγεται ο προσδιορισμός σε λιπαμικούς ή αιμολυμένους ορούς. Επίσης ν'αποφεύγονται επανειλημμένοι κύκλοι απόψυξης-κατάψυξης του δείγματος.

Τα επίπεδα της αλδοστερόνης στο αίμα εμφανίζουν μεγάλες διακυμάνσεις

που εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες:

1. Τη θέση του ασθενούς: αν βρίσκεται σε κατάκλιση, είναι όρθιος ή μετά από άσκηση.
2. Την περιεκτικότητα της τροφής σε αλάτι: το νάτριο μέσω του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης επιδρά στην έκκριση της αλδοστερόνης.
3. Τη λήψη φαρμάκων.
4. Stress: κάθε στρεσογόνος παράγοντας επιφέρει, μέσω της ACTH, αύξηση των επιπέδων της αλδοστερόνης.

Παρουσία Αγγειοτενσίνης, Οιστρογόνων, Αμιλορίδης, Φουροσεμίδης, χλωροθαλιδόνης, καθαρτικών (κατάχρηση), μετοκλοπραμίδης, αυξάνουν τη συγκέντρωση της αλδοστερόνης, ενώ a-MEA, Δεοξυκορτικοστερόνη, Αμινογλουτεθιμίδη την ελαττώνουν.

ii). Μέθοδοι προσδιορισμού

Οι κυριότερες λοιπόν μέθοδοι προσδιορισμού της αλδοστερόνης είναι οι ραδιοανοσολογικές (RIA), οι οποίες βασίζονται στον ανταγωνισμό μεταξύ σεσημασμένης με ραδιοϊσότοπο και μη σεσημασμένης αλδοστερόνης για την κατάληψη περιορισμένου αριθμού συνδετικών θέσεων πάνω στο αντίσωμα κατά την επώση τους με αυτό.

Παλαιότερα οι τεχνικές αυτές έδιναν διασταυρούμενη αντίδραση (cross reaction) κυρίως με την κορτιζόλη, γι' αυτό και απαιτείτο χρωματογραφία χάρτου ή άλλες τεχνικές διαχωρισμού για την απομόνωση της αλδοστερόνης. Σήμερα αυτό έχει ξεπερασθεί με τη χρήση αντισωμάτων υψηλής ειδικότητας και έχουν καταστήσει δυνατή και εύκολη τη μέτρηση της αλδοστερόνης.

Σήμερα υπάρχουν επίσης και πολλές ενζυμικές μέθοδοι μέτρησης της αλδοστερόνης, όπως επίσης και μέθοδοι χημειοφωταύγειας, οι οποίες βασίζονται επίσης στην τεχνική του ανταγωνισμού.

Ενδεικτικά μόνο αναφέρονται οι παρακάτω τιμές αναφοράς σε ύπτια θέση 10-150 pg/ml, σε όρθια θέση 35-250 pg/ml. Συνιστάται κάθε εργαστήριο να καθορίζει τις δικές του τιμές αναφοράς, λαμβάνοντας υπ'όψιν τη μέθοδο που χρησιμοποιεί και τους παραπάνω παράγοντες.

Επειδή τα επίπεδα της αλδοστερόνης εμφανίζουν διακυμάνσεις και η τιμή της στο αίμα ανταποκρίνεται στη στάθμη της εκείνη τη δεδομένη στιγμή, γι' αυτό δεν αρκεί μία μέτρηση για να τεκμηριώσει αξιόπιστες τιμές. Γι' αυτό μετρώνται και τα επίπεδα της αλδοστερόνης στα ούρα 24ώρου, τα οποία αντανακλούν την ημερήσια έκκριση αλδοστερόνης.

Στα ούρα, η αλδοστερόνη αποβάλλεται αναλλοίωτη σε ποσοστό 10% περί-

που. Απ' αυτό τα 90% βρίσκονται με τη μορφή ενώσεως της αλδοστερόνης με γλυκούρονικό οξύ και τα υπόλοιπα σαν ελεύθερη ορμόνη. Η μισή ποσότητα της αλδοστερόνης που εκκρίνεται καθημερινά περνά στα ούρα με τη μορφή των τετραϋδροπαραγώγων της ορμόνης.

Η συλλογή ούρων 24ώρου χρειάζεται την παρουσία βορικού οξέος ως συντηρητικού ή οξικού για τη ρύθμιση του pH μεταξύ 2.0 και 4.0.

Συνήθως μετρούμε ραδιοανοσολογικά τη γλυκούρονική αλδοστερόνη (Φ.Τ. 10 μg/ 24h) και την τετραϋδροαλδοστερόνη (Φ.Τ. 50 μg/ 24h). Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν τη μέτρηση της αλδοστερόνης με ραδιοανοσολογική μέθοδο και στο σίελο με ενδιαφέροντα αποτελέσματα για ορισμένες παθήσεις, όπως η κυστική ίνωση.

5. Ρενίνη

Η ρενίνη είναι υψηλής ειδικότητας πεπτιδάση, η οποία ανήκει στην κατηγορία των ασπαρτυλικών πρωτεΐνασών με δύο υπολείμματα ασπαρτικού οξέος στη δραστική πλευρά του μορίου της.

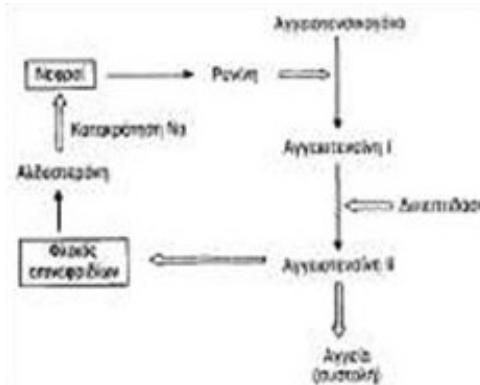
Παράγεται σε πολλά μέρη του σώματος: εγκέφαλο, νεφρούς, καρδιά. Η γρήγορη όμως μείωση της συγκέντρωσης του πλάσματος, που ακολουθεί τη νεφρεκτομή ενισχύει την άποψη ότι η ρενίνη παράγεται πρωτίστως στους νεφρούς. Το MB της νεφρικής ρενίνης είναι 40KD και ο χρόνος ημιζωής της κυμαίνεται μεταξύ 10 και 65 λεπτών, ενώ το optimum pH για να δράσει στο αγγειοτενσινογόνο είναι 5,5-6,0.14,15

A). Δράση

Η ρενίνη δρα στο αγγειοτενσινογόνο, ένα δεκατετραπεπτίδιο το οποίο παράγεται στο ήπαρ, προκαλώντας την απόσπαση τεσσάρων αμινοξέων του. Σχηματίζεται έτσι ένα αδρανές δεκαπεπτίδιο, η αγγειοτενίνη I, η οποία μετατρέπεται από το ειδικό μετατρεπτικό ένζυμο (Angiotensin Converting Enzyme, ACE) στην αγγειοτενίνη II με την απώλεια δύο αμινοξέων. Η αγγειοτενίνη II δρα στα κύτταρα της σπειροειδούς ζώνης προκαλώντας την ταχεία και άφθονη έκκριση της αλδοστερόνης (Σχήμα 3).

Αν και δεν είναι πλήρως εξακριβωμένο, υποστηρίζεται ότι πρόδρομος της ρενίνης είναι ένα μεγαλύτερο, μη δραστικό μόριο η προρενίνη. Η προρενίνη μπορεί να στερείται καταλυτικής δραστικότητας, όμως πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν τη μετατροπή της στα εκκριτικά κοκκία της παρασπειραματικής συσκευής σε δρα-στική ρενίνη με την επίδραση μίας πρωτεάσης, παρόμοιας με την καθεψίνη B.

Στο πλάσμα υπάρχουν επίσης και οι «big» και «big-big rennin like proteins» με MB που μπορούν να φθάσουν τα 140 KD. Μερικές από τις μορφές αυτές έχουν καταλυτική δραστικότητα και αποτελούν το άθροισμα μικρότερων πρωτεΐνων. Το άθροισμα της δραστικής ρενίνης ή ρενίνης και της προρενίνης αποτελεί την ολική ρενίνη.



Σχήμα 3.

B). Έκκριση

Η έκκριση της δραστικής ρενίνης ρυθμίζεται με τέσσερεις κυρίως μηχανισμούς:

1. μέσω των πιεσοϋποδοχών (baroreceptors) του νεφρικού προσαγωγού αρτηριδίου
2. μέσω της πυκνής θηλής
3. μέσω του συμπαθητικού νευρικού συστήματος
4. μέσω της αρνητικής παλίνδρομης δράσης της αγγειοτενσίνης II που ασκεί ται μέσω του ασβεστίου.

Μείωση της αρτηριακής πιέσεως και της ροής αίματος στους νεφρούς προκαλεί την απελευθέρωση δραστικής ρενίνης. Το ίδιο αποτέλεσμα προκαλεί και η ελάττωση της συγκέντρωσης του νατρίου.

Το κλειδί της λειτουργίας του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης είναι η αγγειοτενσίνη II, που είναι και το δραστικό μόριο. Η μέτρησή της όμως ήταν πολύ δύσκολη λόγω του ελαχίστου χρόνου ημιζωής της. Αναζητήθηκαν λοιπόν μέθοδοι μετρήσεως άλλων ουσιών του συστήματος αυτού, όπως της δραστικής ρενίνης.

Ο συνήθης προσδιορισμός είναι της δραστικότητας της ρενίνης πλάσματος (Plasma Renin Activity, PRA) που αποτελεί έμμεσο προσδιορισμό της ρενίνης

αφού στηρίζεται στην ταχύτητα παραγωγής της αγγειοτενσίνης I.

Η δραστικότητα της ρενίνης, η καταλυτική της δράση δηλαδή στη μετατροπή του αγγειοτενσινογόνου σε αγγειοτενσίνη I υπολογίζεται με τη ραδιοανοσολογική μέτρηση της αγγειοτενσίνης I.

Γ). Δειγματοληψία

Τα πρωτόκολλα της μεθόδου αυτής συνιστούν τη χρησιμοποίηση παγωμένων συριγών, τη συλλογή του αίματος σε παγωμένα σωληνάρια, την τοποθέτησή τους σε λουτρό νερού και πάγου και τη φυγοκέντρηση του δείγματος σε ψυχόμενη φυγόκεντρο, έτοι ώστε να μην εκτίθεται το δείγμα σε θερμοκρασία υψηλότερη των 4°C. Νεότερες απόψεις, αντίθετα, υποστηρίζουν ότι η παραμονή δείγματος στους 4°C ενεργοποιεί μέσω της ψύξης, ποσότητα προρενίνης και την μετατρέπει σε δραστική ρενίνη (cryoactivation), με τη μετακίνηση του αμινοτελικού τμήματος των 43 αμινοξέων και την αποκάλυψη των δραστικών ομάδων.

Επειδή τα επίπεδα της προρενίνης στο πλάσμα είναι περίπου 10 φορές υψηλότερα από αυτά της δραστικής ρενίνης, ακόμα και ένα μικρό ποσό προρενίνης να υποστεί ενεργοποίηση μέσω της ψύξης μπορεί να δώσει εσφαλμένα επίπεδα δραστικής ρενίνης.

Ο προσδιορισμός γίνεται πάντοτε σε πλάσμα (αντιπηκτικό EDTA) γιατί η ενεργοποίηση μέσω της ψύξης της προρενίνης σε δραστική ρενίνη ευνοείται περισσότερο στον ορό. Για την προετοιμασία του ασθενούς ισχύουν αυτά που προαναφέραμε για την αλδοστερόνη.

Δ). Μειονεκτήματα - Προβλήματα της Μεθόδου

Η μέθοδος μέτρησης της δραστικότητας της ρενίνης (PRA) έχει το πλεονέκτημα ότι παρέχει τη δυνατότητα αύξησης της ευαισθησίας της με παράταση του χρόνου επώασης, παρουσιάζει όμως μειονεκτήματα όπως:

1. Η μέθοδος είναι χρονοβόρα και πολύπλοκη.
2. Η παραγωγή της αγγειοτενσίνης I εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αγγειοτενσινογόνου στο πλάσμα, μεταβολές του οποίου (ηπατικές παθήσεις) μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένη εκτίμηση των τιμών του PRA.
3. Απαιτείται προσεκτική ρύθμιση του pH, της θερμοκρασίας και του χρόνου.
4. Δεν υπάρχει βαθμονόμηση ως προς διεθνές πρότυπο του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας.

Για ν' αντιμετωπισθούν τα προβλήματα αυτά πρόσφατα παρουσιάσθηκε μια υψηλής ευαισθησίας ανοσοραδιομετρική μέθοδος δύο θέσεων (two site IRMA)

η οποία μετρά τη δραστική ρενίνη.

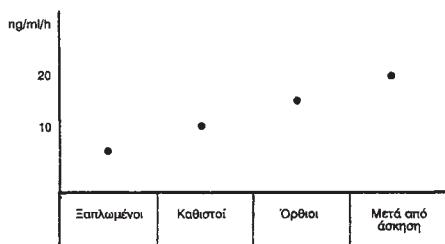
Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου μετρήσεως της δραστικής ρενίνης έναντι της μετρήσεως της δραστικότητας της ρενίνης πλάσματος (PRA) είναι:

1. Ταχύτητα και απλότητα.
2. Αποτέλεσμα ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του αγγειοτενογόνου.
3. Πιθανή μη ενεργοποίηση μέσω της ψύξης της προρενίνης (cryoactivation).
4. Τα πρότυπα διαλύματα της μεθόδου είναι βαθμονομημένα ως προς το πρώτο διεθνές πρότυπο του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας 68/ 356.

Τιμές αναφοράς

Τα επίπεδα της ρενίνης στο πλάσμα εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες:

1. Περιεκτικότητα της τροφής οε αλάτι: συνιστάται ο ασθενής να τεθεί σε δίαιτα κανονικής περιεκτικότητας σε αλάτι τρεις ημέρες πριν την αιμοληψία και μια ημέρα πριν να συλλέγονται ούρα 24ώρου για τη μέτρηση του νατρίου.
2. Θέση του ασθενούς: οι τιμές της ρενίνης κυμαίνονται ανάλογα με το αν ο ασθενής είναι: (i) όρθιος, (ii) μετά ολονύκτια κατάκλιση, (iii) μετά ημίωρη κατάκλιση (Σχήμα 4).
3. Άσκηση: Προκαλεί αύξηση των επιπέδων της ρενίνης. Γι' αυτό άλλωστε εκτός από τις βασικές τιμές γίνεται και δοκιμασία ρενίνης κατά την οποία μετρώνται δύο βασικές τιμές σε κατάκλιση, καθώς και δύο τιμές ανά μία ώρα μετά άσκηση ή/και χορήγηση Lasix.
4. Εγκυμοσύνη: Παρατηρούνται αυξημένες τιμές από τις πρώτες εβδομάδες, που επανέρχονται στα φυσιολογικά επίπεδα μετά τον τοκετό.
5. Λήψη φαρμάκων: διουρητικά, αναστολείς μετατρεπτικού ενζύμου, ανταγωνιστές ασβεστίου αυξάνουν τις συγκεντρώσεις της δραστικής ρενίνης του πλάσματος, ενώ τα αλατοκορτικοειδή, κ.λ.π. τις μειώνουν.



Σχ. 4. Επίπεδα της δραστικότητας της ρενίνης πλάσματος σε ασθενείς με ιδιοπαθή υπέρταση σε διάφορες θέσεις.

Ενδεικτικά αναφέρονται οι παρακάτω τιμές αναφοράς:

α) Μέθοδος μετρήσεως της δραστικότητας της ρενίνης:

Σε κατάκλιση 0,2-3,6 ng/ml/h

Μετά έγερση 0,6-7,7 ng/ml/h

β) Μέτρηση της δραστικής ρενίνης με IRMA:

Σε κατάκλιση 5-47 μU/ml

Μετά έγερση 7-76 μU/ml

Επίσης, θα μπορούσαμε να πούμε εδώ πως από συγκρίσεις τιμών που έγιναν, η σχέση μεταξύ PRA και δραστικής ρενίνης είναι περίπου:

Δραστική Ρενίνη = 10 χ PRA

6. Κατεχολαμίνες

A). Χημεία Κατεχολαμινών

Ως κατεχόλες αναφέρονται ενώσεις που περιέχουν ένα αρωματικό βενζολικό δακτύλιο με δύο υδροξυλικές ομάδες. Στην ομάδα αυτή των ενώσεων ανήκουν: η διυδροξυ-φαινυλ αλανίνη (DOPA), η ντοπαμίνη, η νορ-επινεφρίνη ή νορ-αδρεναλίνη και η επινεφρίνη ή αδρεναλίνη(οι οποίες ανάλογα με τον τόπο παραγωγής τους, δρουν άλλοτε ως νευροδιαβιβαστές, και άλλοτε ως ορμόνες) και δύο μεταβολικά προϊόντα το δι-υδροξυ-φαινυλ-οξεικό οξύ (DOPAC) και η 3, 4 διυδροξυ-φαινυλ-γλυκο-αλδεΰδη (DHPG).

B). Βιοσύνθεση Κατεχολαμινών

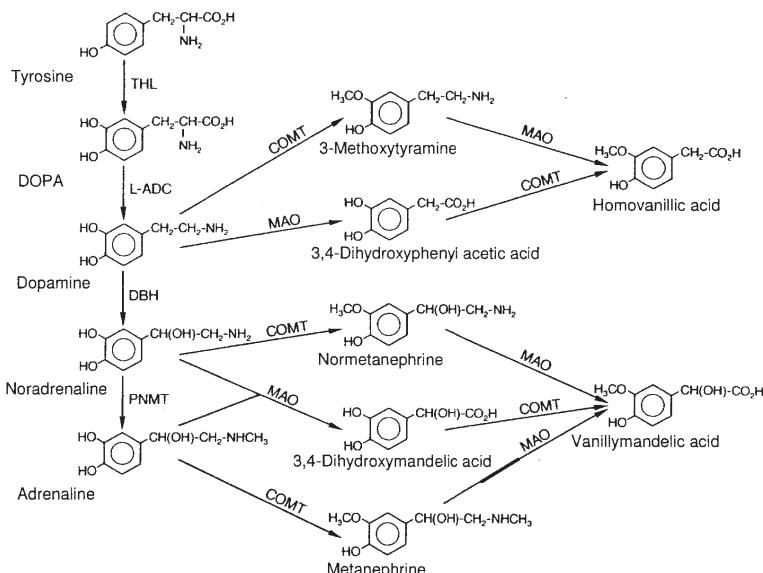
Οι κατεχολαμίνες συντίθενται από το αμινοξύ τυροσίνη σύμφωνα με την επόμενη αλληλουχία αντιδράσεων (Σχήμα 5). Το αρχικό βήμα στη μετατροπή της τυροσίνης σε DOPA σημαντικό και καταλυτικό ρόλο παίζει το ένζυμο υδροξυλάση της τυροσίνης, το οποίο είναι και το ρυθμιστικό ένζυμο στη βιοσύνθεση των κατεχολαμινών. Στη συνέχεια, με την παρουσία του μη ειδικού ενζύμου αρωματική L-άμινο αποκαρβοξυλάση, η DOPA μετατρέπεται σε ντοπαμίνη, η οποία στη συνέχεια υδροξυλώνεται παρουσία β-υδροξυλάσης για να μετατραπεί σε νορ-επινεφρίνη. Η νορ-επινεφρίνη με τη βοήθεια της PNMT (φαινυλ-αιθανολάμινο-N-μεθυλ-τρανσφεράσης) μεθυλιώνεται και τελικά παράγεται η επινεφρίνη. Ορισμένα συστήματα όπως ο μυελός των επινεφριδίων περιέχουν όλα τα απαραίτητα βιοσυνθετικά ένζυμα και παράγουν επινεφρίνη ως το κύριο προϊόν. Άλλα, όπως οι συμπαθητικοί μεταγαγγλιακοί νευρώνες δε διαθέτουν το τελευταίο ένζυμο, δηλαδή την PNMT και για αυτό το λόγο παράγουν κυρίως νορ-επινεφρίνη.

Τυροσίνη – [υδροξυλάση τυροσίνης] → DOPA – [αποκαρβοξυλάση] → ντοπαμίνη
 – [υδροξυλάση ντοπαμίνης] → νορ-επινεφρίνη – [PNMT] → επινεφρίνη

Σχήμα 5

Γ). Καταβολισμός Κατεχολαμινών

Οι κατεχολαμίνες που απελευθερώνονται από το μυελό των επινεφριδίων αδρανοποιούνται κυρίως στο ήπαρ και οι μεταβολίτες τους απεκκρίνονται στα ούρα. Η αποδόμησή τους γίνεται με δύο κυρίως ενζυμικά συστήματα: το σύστημα της κατεχολ-Ο μεθυλ-τρανσφεράσης (COMT) και το σύστημα της μονο-αμινο-οξειδάσης (MAO). Το 70% των κατεχολαμινών που εκκρίνονται μεθυλιώνεται από την COMT σε νορ-μετανεφρίνη και μετανεφρίνη, το 20% απαμινώνεται οξειδωτικά σε 3,4-διυδρόξυ-αμυγδαλικό (HMMA), και το υπόλοιπο των κατεχολαμινών απεκκρίνεται στα ούρα ως ελεύθερη μορφή ή συνδεδεμένο με γλυκούρονικό ή θεικό οξύ. Το 3,4-διυδρόξυ-αμυγδαλικό μετατρέπεται 3-μεθόξυ-4-υδρόξυ-αμυγδαλικό οξύ στο γνωστό μας VMA, (vanillyl mandelic acid). Στους νευρώνες, οι κατεχολαμίνες που δεν εκκρίνονται καταβολίζονται, μέσα στο κυτταρόπλασμα, από τη MAO (Σχήμα 6).



Σχήμα 6

Δ). Προσδιορισμός Κατεχολαμίνων

i). Προαναλυτικές συνθήκες— Αλληλεπιδράσεις 26, 27

α. Αίματος

Ο ασθενής πρέπει να ακολουθήσει ειδική δίαιτα, δηλαδή να μην καταναλώνει προϊόντα με βάση τη βανίλια, να αποφεύγει μπανάνες και ξηρούς καρπούς, καφέ, τσιγάρο και να μη λαμβάνει αντιυπερτασικά φάρμακα για μία εβδομάδα.

Ο χρόνος ημίσειας ζωής, των κατεχολαμινών στο αίμα είναι μόνο 30-60 δευτερόλεπτα και ως εκ τούτου οι διακυμάνσεις στα φυσιολογικά άτομα είναι τεράστιες. Και το παραμικρό ψυχικό ή σωματικό stress είναι δυνατό να προκαλέσει στιγματική υπερκατεχολαμία. Για αυτό το λόγο το αίμα πρέπει να λαμβάνεται τουλάχιστο 20 λεπτά μετά τη διάτρηση του δέρματος και με τον ασθενή σε κατάκλιση και ηρεμία (όχι π.χ. στα εξωτερικά ιατρεία ή σε κατάμεστο θάλαμο νοσηλείας).

β. Ούρων

Κατά τη διάρκεια της συλλογής ο ασθενής θα πρέπει να αποφύγει το stress, την άσκηση, τον καφέ και το τσιγάρο. Απαραίτητη η διακοπή των αντιυπερτασικών φαρμάκων για 1 εβδομάδα. Αποφυγή μπανανών και ξηρών καρπών. Συλλογή ούρων 24ώρου σε δοχείο που περιέχει 10 ml π. υδροχλωρικό οξύ. Τα ούρα διατηρούνται στη συντήρηση κατά τη διάρκεια και μετά από τη συλλογή.

Παρεμβολές

A. Κατεχολαμινών Ούρων

- | | |
|--|---|
| <p>↑ • Καφεΐνη</p> <ul style="list-style-type: none">• Επινεφρίνη• Αιθανόλη• Ισοπροτερενόλη• L-Dopa• Νικοτίνη• Νιτρογλυκερίνη• Ρεζερπίνη (αρχική δράση)• Θεοφυλλίνη | <p>↓ • Κλονιδίνη</p> <ul style="list-style-type: none">• Γουανεθιδίνη• Πραζοσίνη• Σκιαγραφικά υλικά• Ρεζερπίνη (χρόνια χορήγηση)• Βρεττύλιο |
|--|---|

B. VMA

- | | |
|--|--|
| <p>↑ • Επινεφρίνη</p> <ul style="list-style-type: none">• Γλυκαγόνη• Ισταμίνη | <p>↓ • Χλωροπροπαμίδη</p> <ul style="list-style-type: none">• Κλονιδίνη• Δισουλφιράμη |
|--|--|

- Ινσουλίνη (υψηλές δόσεις)
- Λεβοντόπα
- Λίθιο
- ΞΝιτρογλυκερίνη
- Παράγωγα υδροξίνης
- Αναστολείς ΜΑΟ
- Μορφίνη
- Σκιαγραφικές ουσίες (ανταγωνίζονται στην απέκκριση μετά iv χορήγηση)

Γ. Μετανεφρινών

- ↑ • Παράγωγα υδραλαζίνης
• Αναστολείς ΜΑΟ
- ↓ • Ντοπαμίνη

Κατεχολαμινών Πλάσματος

- ↑ • Διοζαξείδη
Αιθανόλη
Αναστολές ΜΑΟ
Νιτρογλυκερίνη
Φαιντολαμίνη
Θεοφυλλίνη
Φαινοθειαζίδες
L-DOPA
Μέθυλντόπα

ii). Μέθοδοι προσδιορισμού

- Φωτομετρικά: Είναι απλή αλλά χρονοβόρος με χαμηλή ακρίβεια και αποτελεσματικότητα. Μπορούμε να μετρήσουμε μόνο το VMA και το σύνολο των μετανεφρινών.
- Ραδιοανοσολογικά με την μέθοδο του ανταγωνισμού. Είναι όμως χρονοβόρος διότι απαιτείται ξεχωριστή διαδικασία για κάθε μόριο κατεχολαμινών.
- Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή. Αποτελεί μέθοδο αναφοράς για τον προσδιορισμό των κατεχολαμινών και των παραγώγων τους. Με τη μέθοδο αυτή έχουμε ταυτόχρονο πιοιτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των κατεχολαμινών και μετανεφρινών.

Είναι όμως αναγκαίο να μετράμε όλα τα μόρια των κατεχολαμινών και των παραγώγων τους; Η απάντηση είναι όχι. Η πιο αξιόπιστη μέθοδος για τη διάγνωση του φαιοχρωμοκυττώματος είναι η μέτρηση μετανεφρινών σε ούρα 24ώρου. Η μέτρηση με HPLC παρουσιάζει μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία. Οι αντίστοιχες μετρήσεις για VMA και κατεχολαμίνες στα ούρα είναι μεν ειδικές αλλά λιγότερο ευαίσθητες (περισσότερα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα)

απ' ότι η μέτρηση των μετανεφρινών. Επίσης όταν οι μετρήσεις των μετανεφρινών (ή και των VMA και κατεχολαμινών) γίνονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα αποτελούν πιο ευαίσθητο δείκτη από μεμονωμένες χρονικά μετρήσεις..

Τιμές αναφοράς

A. Κατεχολαμινών

Αδρεναλίνη (επινεφρίνη) ούρων: 1,7 - 22,4 mg/24h

Νοραδρεναλίνη (νορεπινεφρίνη) ούρων: 12,1 - 85,5 mg/24h

Αδρεναλίνη πλάσματος: 14 - 111 pg/dl

Νοραδρεναλίνη πλάσματος: 100 - 550 pg/dl

Ντοπαμίνη: 0 - 30 pg/ml

B. VMA

1,8 - 6,7 mg/24h

Παιδιά: <4 mg/24h

C. Μετανεφρινών

Ολικές μετανεφρίνες: 100 – 800 mg/24h

Μετανεφρίνες: 52 - 341 mg/24h

Νορμετανεφρίνες: 88 - 444 mg/24h

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Μουτσάτσου – Λαδικού, Ν. Θαλασσινός: Βασικές αρχές της ραδιοανοσοανάλυσης και των μη ισοτοπικών ανοσοαναλύσεων, Αθήνα 1992.
2. Yalow, R.S. and Berson, S.A. (1961). J. Clin. Invest. 40, 2190.
3. Rubenstein N.M. (1986). In Handbook of Clinical Laboratory management, Aspen Publishers, Inc, Rockville, Maryland.
4. J.S. Woodhead, Journal of Clinical Immunoassay, 1984, 7, 82.
5. McCarpa, Journal of Bioluminescence and chemiluminescence 1989, 4, 51.
6. G. Messari, European Clinical Laboratory, 1998, 6.
7. L.J. Kricka, Analytical Chemistry, 1999, 71, 12: 305 R.
8. Grotjan, H.E., and Keel, B.A., in Immunoassay, ed Diamandis, E.P. and Christopoulos, T.K., Academic press Inc., New York, 1996, ch. 4, pps.
9. Larry Kricka: Human Anti-Animal Antibody Interferences in Immunological Assay. Clin Chemistry 1999, 45: 7, 942 – 956.
10. Σ. Κακαμπάκος: Γενικές αρχές ανοσοχημικών μεθόδων. Σε Στοιχεία Ενδοκρινολογίας και Εργαστηριακή Διερεύνηση των ορμονικών διαταραχών (I), Αθήνα 2005.
11. Ιατρική Βιοχημεία. Έκδοση Παρισιάνου ΑΕ. Πρωτότυπο Έκδοση: Medical Biochemistry, by

- J. Baynes, M. Dominiczak, 2002, Harcourt Brace and company Limited 1999.
12. Demers, L.M., Pituitary Function in Tietz Fundamentals in clinical chemistry, 5th Edition, 2001, 39, 822-38 41, 857-75.
13. Margioris AN, Stratakis C and Chrousos GP. Glucocorticoids and other adrenal steroids. In: Human Pharmacology: Molecular to clinical, Wingard LB, Brody TM, Larner J, Schwartz A (eds), Mosby Yearbook, St Louis, 464-493, 1991.
14. Ashwood, ER, Burtis CA, Tietz Textbook of Clin Chen 3rd Ed: 1563, Wb Saunders Co. Phila: 1999.
15. Sealey, JE: Plasma Renin Activity and Plaoma prorenin Assays. Clin Chem. 37/10(B): 1811-1819, 1991.
16. Pudek MR. Adrenal hormones. In: Kaplan LA, Pesce AJ, editors. Clinical chemistry: therapy, analysis, and correlation. St. Louis: CV Mosby, 1989. p.672-81.
17. Whitley RJ, Meikle AW, Watts NB. Endocrinology, part VI: adrenocortical steroids. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Textbook of clinical chemistry, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1994. p.1808-21.
18. Chodosh LA, Daniels GH. Addison's disease. Endocrinologist 1993;3(3):166-81.
19. Miller J, Crapo L. The biochemical diagnosis of hypercortisolism. Endocrinologist 1994;4(1):7-16.
20. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedures for handling and processing of blood specimens; approved guideline. NCCLS Document H18-A. Wayne (PA): NCCLS; 1990 Dec. 34p.
21. Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards. How to define, determine, and utilize referenceintervals in the clinical laboratory; approved guideline. NCCLS Document C28-A. Wayne (PA): NCCLS; 1995 June 59p.
23. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Interference testing in clinical chemistry. Proposed Guideline. NCCLS document EP7-9. Wayne (PA):NCCLS;1986.
24. Tietz NW (ed): Fundamentals of Clinical chemistry, 3rd ed. W.B. Saundrers Co, Philadelphia 1987, p.560.
25. Morris DJ: The Metabolism and mechanism of action of Aldosterone. Endocrin Rev. 2:234-247, 1981.
26. Young, D.S.ed, Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, pp.3-241, AACC Press, Washington DC, (1990).
27. Ε. Μπότουλα: Προσδιορισμοί των μετανεφρινών, VMA, κατεχολαμινών. Σε Στοιχεία Ενδοκρινολογίας και Εργαστηριακή Διερεύνηση των ορμονικών διαταραχών (II), Αθήνα, 2005

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΕΠΙΛΟΓΗΣ

1. Ποιά είναι η διαφορά των RIA από τις IRMA μεθόδους:

- α) επισήμανση της πρωτεΐνης –υποδοχέα
- β) επισήμανση του αντισώματος
- γ) επισήμανση του αντιγόνου
- δ) κανένα από τα παραπάνω

2. Για να είναι μια μέθοδος ακριβής πρέπει να συνδονάζει:

- α) επαναληψιμότητα
- β) εξειδίκευση
- γ) το α) και β)
- δ) ευαισθησία

3. Ο προσδιορισμός της ACTH μπορεί να γίνει:

- α) στον ορό μετά από αιμοληψία με παγωμένη σύριγγα
- β) στο πλάσμα μετά από αιμοληψία με παγωμένη σύριγγα
- γ) και στον ορό και στο πλάσμα
- δ) στο πλάσμα μετά από αιμοληψία οποιαδήποτε ώρα

4. Ο νυχθήμερος ρυθμός της κορτιζόλης επηρεάζει:

- α) τη μέτρηση της κορτιζόλης των ούρων 24ώρου
- β) τη μέτρηση της κορτιζόλης στον ορό ή στο πλάσμα
- γ) τη μέτρηση στο σίελο
- δ) τα β) και γ)

5. Ποιό από τα κατωτέρω είναι σωστό:

- α) σε ένα νεογνό είναι καλύτερα να μετράμε επίπεδα κορτιζόλης το βράδυ
- β) σε ένα 12χρονο αγόρι δεν έχει αναπτυχθεί βιορυθμός κορτιζόλης
- γ) σε ένα νεογνό δεν έχει σημασία πότε θα προσδιοριστούν επίπεδα κορτιζόλης
- δ) στο κορίτσι τα επίπεδα κορτιζόλης είναι διαφορετικά από ότι στο αγόρι

- 6. Ποια εργαστηριακή παράμετρος έχει τη μεγαλύτερη εναισθησία για τη διάγνωση των φαιοχρωμοκυττώματος στα ούρα:**
- a) το VMA
 - β) οι μετατανεφρίνες μια δεδομένη στιγμή
 - γ) οι κατεχολαμίνες
 - δ) οι μετανεφρίνες ανά τακτά χρονικά διαστήματα
- 7. Τι ενεργοποιεί την προρενίνη σε δείγμα ασθενούς σε ρενίνη:**
- α) η παραμονή στους 4βαθμούς C
 - β) η μεταβολή του pH
 - γ) η αγγειοτενσίνη I
 - δ) το αγγειοτενσινογόνο
- 8. Τα επίπεδα της αλδοστερόνης στο αίμα επηρεάζονται:**
- α) από τη θέση του ασθενούς
 - β) από την παραμονή του δείγματος στους 4 βαθμούς C
 - γ) από το νάτριο
 - δ) από το α) και γ)
- 9. Τα ετεροφιλικά αντισώματα τα επίπεδα ποιας ορμόνης επηρεάζονται:**
- α) της κορτιζόλης
 - β) της DHEAS
 - γ) της αλδοστερόνης
 - δ) της 170HP
- 10. Τα επίπεδα της κορτιζόλης στον ορό ή στο πλάσμα ανξάνονται:**
- α) κατά τη θεραπεία με ανδρογόνα
 - β) με τη χορήγηση δεξαμεθαζόνης
 - γ) με τη χορήγηση αντισυλληπτικών
 - δ) τίποτα από τα παραπάνω

Σωστές απαντήσεις κατά σειρά
β, γ, β, δ, γ, δ, α, δ, α, γ,