



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

"Σύγκριση και αξιολόγηση των αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού του καρδιολογικού φαρμάκου digoxin, στους αυτόματους ανοσολογικούς αναλυτές AxSYM και Architect."



**Μέλλiou Σοφία
Καλύβα Κωνσταντίνα**

**ΑΘΗΝΑ
Ιούνιος 2015**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο βιοχημικό εργαστήριο του Γ.Ν.Α « Ο Ευαγγελισμός» υπό την επίβλεψη της κας Ανδριανής Γρηγοράτου και κας Αγγελικής Μελπίδου, Δρ. Χημικού και υπεύθυνες του τμήματος των επιπέδων φαρμάκων, τις οποίες ευχαριστούμε για την επιλογή του θέματος, την ουσιαστική βοήθειά τους στην ολοκλήρωση και τελειοποίηση της πτυχιακής μας εργασίας, καθώς και για το γενικότερο ενδιαφέρον τους, ώστε να αποκτήσουμε όσο το δυνατόν περισσότερες γνώσεις για τον τομέα των επιπέδων των φαρμάκων, τη λειτουργία των βιοχημικών αναλυτών και γενικότερα την άρτια λειτουργία ενός εργαστηρίου Κλινικής Χημείας.

Επιπλέον, αισθανόμαστε υπόχρεοι στη διευθύντρια του βιοχημικού τμήματος, κα Σοφία Ιωαννίδου, ιατρό βιοπαθολόγο, για τη φιλοξενία της στους χώρους του εργαστηρίου και την αμέριστη συμπαράσταση καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μας εργασίας.

Φυσικά δε θα μπορούσαμε να εξαιρέσουμε από τις ευχαριστίες το προσωπικό του νοσοκομείου για το ευχάριστο και οικείο κλίμα.

Ιδιαίτερω ευχαριστούμε κο Γουνόπουλο Παντελή, καρδιολόγο της Καρδιολογικής Κλινικής του νοσοκομείου "Ο Ευαγγελισμός", για την πολύτιμη βοήθειά του καθώς και για τις καίριες παρατηρήσεις του κατά τη συγγραφή της πτυχιακής εργασίας.

Τέλος, εκφράζουμε τις ευχαριστίες μας και την εκτίμησή μας στην καθηγήτρια του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, κα Ευρύκλεια Λιανίδου, η οποία μας έφερε για πρώτη φορά σε επαφή με το χώρο της Κλινικής Χημείας στα πλαίσια του προπτυχιακού μαθήματος Κλινικής Χημείας και μας έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσουμε τη μελέτη μας σε ένα πραγματικό χώρο εργασίας και άσκησης Κλινικής Χημείας, όπως το βιοχημικό εργαστήριο του Ευαγγελισμού.

Πίνακας περιεχομένων

Εισαγωγή.....	7
Κεφάλαιο 1: Καρδιακή Λειτουργία.....	8
1.1 Μακροσκοπική θεώρηση	8
1.2 Φυσιολογία του μυοκαρδίου	10
1.3 Φυσιολογία Μυϊκής Συστολής	14
1.4 Αρρυθμίες - Αντιαρρυθμικά	16
1.5 Καρδιοτονωτικές γλυκοσίδες	18
Κεφάλαιο 2: Μηχανισμοί Ομοιοστασίας.....	21
2.1 Εισαγωγή.....	21
2.2 "Αντλία Na ⁺ -K ⁺ "	23
2.3 Αντλία Ασβεστίου	24
2.4 Ηλεκτρολυτικές διαταραχές	28
2.4.1 Μεταβολισμός του νατρίου.....	29
2.4.2 Μεταβολισμός του καλίου	30
2.4.3 Μεταβολισμός του ασβεστίου	32
2.5 Νεφρική και ηπατική λειτουργία.....	34
2.5.1 Ήπαρ.....	34
2.5.2 Νεφροί.....	37
Κεφάλαιο 3: Γενικές αρχές της δράσης των φαρμάκων:.....	41
Φαρμακοκινητική – Φαρμακοδυναμική –Φαρμακογενωμική.....	41
3.1 Εισαγωγή.....	41
3.2 Αρχές Φαρμακοκινητικής.....	42
3.2.1. Απορρόφηση	42

3.2.2. Κατανομή.....	43
3.2.3 Μεταβολισμός.....	44
3.2.4 Απέκκριση.....	47
3.2.5 Κλινική φαρμακοκινητική.....	48
3.2.6.Τρόποι χορήγησης φαρμάκων-δοσολογικό σχήμα	52
3.2.7 Σύνδεση των φαρμάκων με πρωτεΐνες του πλάσματος	53
3.3 Αρχές Φαρμακοδυναμικής.....	55
3.3.1 Σχέσεις δόσης - αποτελέσματος συνεχούς απάντησης	56
3.4 Αρχές Φαρμακογενωμικής	60
3.4.1 Κυτόχρωμα P450	66
3.4.2 Ρ γλυκοπρωτεΐνη (Permeability glycoprotein, P-gp) ή Πρωτεΐνη πολλαπλής αντίστασης (Multi Drug Resistance Protein, MDR1)	68
Κεφάλαιο 4: Παρακολούθηση Επιπέδων Φαρμάκων στο αίμα (Π.Ε.Φ.).....	73
(Therapeutic Drug Monitoring-TDM)	73
4.1 Εισαγωγή.....	73
4.2 Ορισμός.....	74
4.3 Κατηγορίες φαρμάκων στις οποίες κρίνεται απαραίτητη η Π.Ε.Φ.	75
4.4 Προϋποθέσεις για να εφαρμοσθεί η Π.Ε.Φ.	76
4.5 Χρησιμότητα παρακολούθησης των επιπέδων φαρμάκων.....	77
4.6 Φάρμακα μη κατάλληλα για την παρακολούθηση επιπέδων	78
4.7 Σημεία προσοχής στις συνθήκες συλλογής και προσδιορισμού δειγμάτων για Π.Ε.Φ.	78
4.8 Πληροφορίες απαραίτητες για την ερμηνεία της Π.Ε.Φ.	80
Κεφάλαιο 5: Αρχές Μεθόδων – Αυτόματοι Αναλυτές	81
5.1 Ανοσοπροσδιορισμοί (immunoassays).....	81

5.2 Ταξινόμηση ανοσοπροσδιορισμών	87
5.2.1 Ανάλογα με την παρουσία ιχνηθέτη.....	87
5.2.2 Ανάλογα με τον τύπο της αντίδρασης	88
5.2.3 Ανάλογα με τον τρόπο διαχωρισμού του ιχνηθέτη	91
5.3 Αξιολόγηση ανοσοπροσδιορισμών	92
5.4 Ουσίες που παρεμβαίνουν στους ανοσοπροσδιορισμούς.....	94
5.4.1 Human anti-mouse Antibodies (HAMA)	94
5.4.2 Ετεροφυλικά αντισώματα	97
5.5 Αυτοματοποίηση ανοσοπροσδιορισμών.....	98
5.6 Ανοσοχημικοί αναλυτές τυχαίας προσπέλασης κλειστού τύπου	98
5.7 AxSYM System	99
5.7.1 ΜΕΙΑ (Μικροσωματιδιακή Ανοσοενζυμική Ανάλυση - Microparticle Enzyme Immunoassay)	100
5.7.2 AxSYM.....	103
5.8 Architect i2000 _{SR} System.....	105
5.8.1 Μικροσωματιδιακός Χημειοφωταυγής Ανοσοπροσδιορισμός – CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay)	108
5.8.2 Αναλυτής Architect i2000 _{SR}	109
Κεφάλαιο 6: Καρδιοτονωτικές Γλυκοσίδες.....	113
6.1 Εισαγωγή.....	113
6.2 Μηχανισμός δράσης	114
6.3 Φαρμακοκινητική	115
6.4 Χρήση δακτυλίτιδας στην κλινική πράξη.....	117
6.5 Δοσολογία και αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα.....	117
6.6 Ανεπιθύμητες παρενέργειες - Τοξικός δακτυλιδισμός	121

6.7 Ειδικές περιπτώσεις που χρειάζονται προσοχή	124
6.8 DLIS.....	125
Κεφάλαιο 7: Πειραματικό Μέρος.....	128
7.1 Εισαγωγή.....	128
7.2. Δείγματα.....	128
7.3 Εξοπλισμός	129
7.4 Αντιδραστήρια.....	130
7.5 Προετοιμασία της εξέτασης	132
7.6 Βαθμονόμηση.....	133
7.7 Διαδικασίες ελέγχου ποιότητας	133
7.8 Περιορισμοί της διαδικασίας μέτρησης της διγοξίνης με ανοσοπροσδιορισμούς	134
7.9 Προσδιορισμός διγοξίνης με ΜΕΙΑ στον AxSYM (Abbott)	135
7.10 Προσδιορισμός διγοξίνης με CMIA στον Architect i2000SR (Abbott).....	137
Κεφάλαιο 8: Αποτελέσματα	145
8.1 Εισαγωγή.....	145
8.2 Αξιολόγηση γραμμικής παλινδρόμησης κατά Passing– Bablok.....	147
8.2.1 Πίνακας των παραμέτρων των μεταβλητών x και y	147
8.2.2 Εξίσωση Γραμμικής Παλινδρόμησης	147
8.2.3 Ανάλυση παλινδρόμησης	147
8.3 Αποκλεισθείσες τιμές.....	150
8.4 Συμπεράσματα	151
Βιβλιογραφία	152

Εισαγωγή

Στην κατηγορία των καρδιοτονωτικών γλυκοσιδών (φάρμακα με θετική ινοτρόπο δράση) ανήκουν τα δραστικά συστατικά των φυτών δακτυλίτιδα με κύριο εκπρόσωπό τους τη διγοξίνη.

Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι φαίνεται, πως ήταν οι πρώτοι που χρησιμοποίησαν, για θεραπευτικούς σκοπούς, φυτά που περιείχαν καρδιοτονωτικές γλυκοσίδες. Αργότερα, ο γερμανός Fucshius, για να περιγράψει το φυτό foxglove, χρησιμοποίησε τον όρο δακτυλίτιδα. Επίσημα όμως, η εφαρμογή της διγοξίνης ως θεραπεία για τις καρδιακές παθήσεις άρχισε πριν 230 χρόνια, 1785, όταν ο Sir William Withering έκανε τη πρώτη δημοσίευση για τη χρήση της, όπου διαπίστωνε ότι το φάρμακο επιβράδυνε την καρδιακή συχνότητα σε ασθενείς με αρρυθμία, ενώ είχε παράλληλα και διουρητική δράση.

Η διγοξίνη είναι ένα φάρμακο που αναστέλλει τη λειτουργία της αντλίας K^+ / Na^+ , προκαλώντας αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} η οποία έχει σαν αποτέλεσμα ανάλογη αύξηση της μυοκαρδιακής συστολής. Ανήκει στην κατηγορία των φαρμάκων με στενό θεραπευτικό παράθυρο και για αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η παρακολούθηση των επιπέδων της συγκέντρωσης της στον ορό ή στο πλάσμα, ώστε να έχουμε το βέλτιστο θεραπευτικό αποτέλεσμα χωρίς την εμφάνιση τοξικότητας.

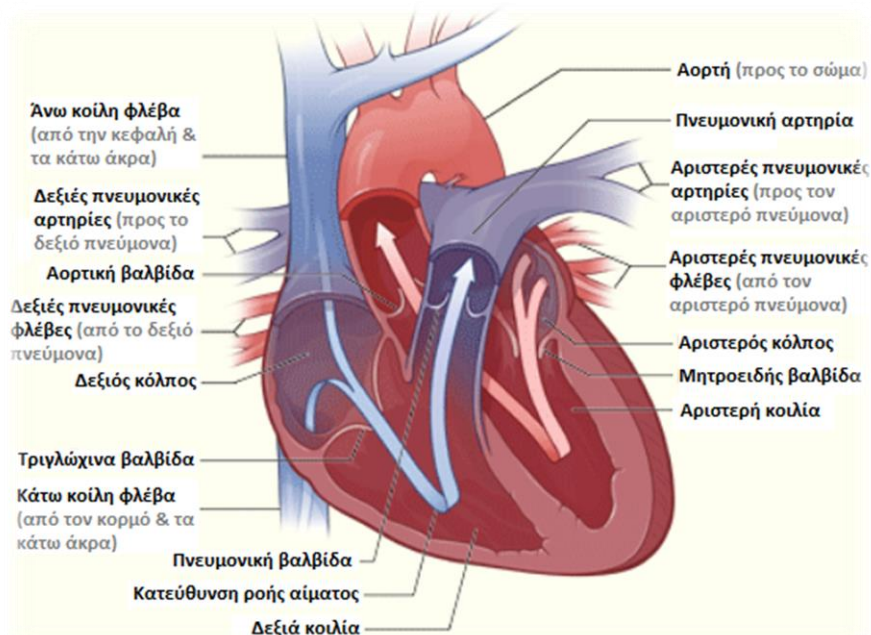
Η παρακολούθηση των επιπέδων της διγοξίνης στον ορό ή στο πλάσμα επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ανοσοπροσδιορισμών. Μάλιστα η διγοξίνη ήταν το πρώτο φάρμακο που προσδιορίστηκε με τη βοήθεια των ανοσοπροσδιορισμών το 1969 όπου και παρασκευάστηκε το πρώτο αντίσωμα έναντι αυτής.

Στην παρούσα εργασία, περιγράφεται η φυσιολογία της καρδιάς, η δράση των καρδιοτονωτικών γλυκοσιδών και συγκεκριμένα της διγοξίνης, οι μηχανισμοί ομοιοστασίας του οργανισμού, οι αρχές φαρμακοκινητικής, φαρμακοδυναμικής και φαρμακογενωμικής, η μέτρηση και παρακολούθηση των επιπέδων φαρμάκων και τέλος μελετώνται οι μέθοδοι προσδιορισμού της διγοξίνης: MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay - Μικροσωματιδιακή Ανοσοενζυμική Ανάλυση) και CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay - Μικροσωματιδιακός Χημειοφωταυγής Ανοσοπροσδιορισμός) και γίνεται σύγκριση αυτών.

Κεφάλαιο 1: Καρδιακή Λειτουργία

1.1 Μακροσκοπική θεώρηση ^{1,2}

Η καρδιά είναι το κεντρικό όργανο του κυκλοφορικού συστήματος. Πρόκειται για ένα κοίλο, μυώδες όργανο σε σχήμα ανεστραμμένης πυραμίδας, που έχει το μέγεθος γροθιάς και εντοπίζεται στη θωρακική κοιλότητα ανάμεσα στους δύο πνεύμονες. Η συγκεκριμένη χωροδιάταξη δεν είναι τυχαία μιας και η σύνδεση των τριών αυτών οργάνων επιτελεί μία ατέρμονη, θεμελιώδους σημασίας για τον οργανισμό διαδικασία: τον εμπλουτισμό του αίματος με οξυγόνο και τη διοχέτευση του στους ιστούς του σώματος. Το τελευταίο ειδικά κομμάτι αναλαμβάνει η καρδιά ως μονάδα, παίζοντας το ρόλο μίας αντλίας που ωθεί το αίμα από και προς αυτήν μέσω του πολύπλοκου και κυκλικά διαρρυθμισμένου συστήματος φλεβών και αρτηριών.



Εικόνα 1: Δομή μυοκαρδίου και κατεύθυνση ροής αίματος.

Η ροή του αίματος στο σώμα είναι καλά καθορισμένη από τη ρυθμική κίνηση της καρδιάς. Όλα ξεκινούν και τελειώνουν με αυτή: το μη εμπλουτισμένο σε O₂ αίμα, που επιστρέφει από το σώμα, μεταφέρεται μέσω της άνω και κάτω κοίλης φλέβας στο δεξιό κόλπο της καρδιάς. Η σύσπαση του κόλπου προκαλεί την άμεση διάνοιξη της κολποκοιλιακής, τριγλώχινας βαλβίδας, επιτρέποντας στο αίμα να εισέλθει με

ταχύτητα στη δεξιά κοιλία. Μια σχετικά μικρή συστολική πίεση (15-30mmHg) είναι αρκετή, ώστε να προωθηθεί το αίμα προς την πνευμονική αρτηρία, να κυκλοφορήσει στο χαμηλών αντιστάσεων αγγειακό δίκτυο των πνευμόνων και να φτάσει με πολύ χαμηλή πίεση (4-12mmHg) στον αριστερό κόλπο. Η μητροειδής βαλβίδα, λόγω συστολής του κόλπου και διαφορετικών πιέσεων, ανοίγει. Ο τέταρτος και τελευταίος θάλαμος της καρδιάς -η αριστερή κοιλία- υποδέχεται το αίμα και με μεγάλη πίεση (100-140mmHg) το εξωθεί στην αορτή. Η αρτηριακή συστολική πίεση του σφυγμικού κύματος είναι μικρότερη όσο αυτό απομακρύνεται από την καρδιά. Κατέρχεται στα 25-30mmHg στα τριχοειδή, είναι μικρότερη στο φλεβικό σκέλος της κυκλοφορίας και ελαχιστοποιείται, περίπου μηδενίζεται, στο δεξιό κόλπο. Από τα παραπάνω θα μπορούσε κανείς με κάποια υπερβολή να πει, ότι ουσιαστικά το καρδιακό έργο είναι υπόθεση της αριστερής κοιλίας. Και τούτο διότι, η μεγάλη ωστική δύναμη που χρειάζεται για να κυκλοφορήσει το αίμα στο υψηλών αντιστάσεων περιφερειακό αρτηριακό δίκτυο μέχρι τα τριχοειδή και να επιστρέψει πάλι, μέσω των φλεβών, στο δεξιό κόλπο γίνεται από την αριστερή κοιλία.

Ο καρδιακός παλμός με τη σειρά του είναι συζευγμένος και τέλεια συγχρονισμένος με τη λειτουργία των πνευμόνων. Σε κάθε εισπνοή η ενδοθωρακική πίεση ελαττώνεται, επιτρέποντας στη θωρακική κοιλότητα να εισροφήσει μεγαλύτερη ποσότητα αίματος. Το αίμα, αφού οξυγονωθεί, εισρέει στο δεξιό κόλπο της καρδιάς με αυξημένο ρυθμό με αποτέλεσμα να μεγιστοποιείται ο βαθμός κολπικής πλήρωσης καθώς και ο όγκος εξώθησης προς τη δεξιά κοιλία. Όσο οι πνεύμονες διαστέλλονται, η δεξιά κοιλία συστέλλεται παρατεταμένα, ώστε η πνευμονική βαλβίδα να μείνει ανοιχτή και να προηγηθεί η σύγκλιση της αορτικής. Σε κάθε αναπνευστικό κύκλο αντιστοιχούν 4-5 καρδιακοί κύκλοι.

Τί συμβαίνει τώρα με το αριστερό τμήμα της καρδιάς; Ο αριστερός κόλπος δέχεται αίμα από τις πνευμονικές φλέβες. Κατά την εισπνοή αυξάνει η εισροή αίματος στον αριστερό κόλπο, αφού το αίμα κυριολεκτικά συνθλίβεται μέσα στους πνεύμονες και διαφεύγει μέσω των πνευμονικών φλεβών προς τον αριστερό κόλπο. Ο τελευταίος αδειάζει το περιεχόμενό του μέσα στην αριστερή κοιλία, όταν ανοίξει η μητροειδής βαλβίδα. Η βαλβίδα ανοίγει όταν η πίεση στην αριστερή κοιλία μεταπέσει από την υψηλή συστολική της τιμή στη διαστολική τιμή, που είναι χαμηλότερη από εκείνη του αριστερού κόλπου. Η διαδικασία αυτή είναι σχετικά βραδεία, έτσι ώστε η μητροειδής βαλβίδα να ανοίγει καθυστερημένα σε σχέση με την τριγλώχινα. Φυσιολογικά, η μέση πίεση στον αριστερό κόλπο είναι κατά 4mmHg υψηλότερη από εκείνη του δεξιού

κόλπου· μία διαφορά - αντανάκλαση της υψηλότερης διαστολικής αντίστασης πληρώσεως της αριστερής κοιλίας.

Η κολπική συστολή δεν είναι ουσιαστικός παράγοντας της καρδιακής λειτουργίας, αφού σε βασικές συνθήκες, ακόμη και στη διάρκεια κολπικής μαρμαρυγής, διατηρείται ανέπαφο το 30% της καρδιακής παροχής. Το γεγονός έγκειται στην ικανότητα της φυσιολογικής καρδιάς να αντλεί 300 έως 400% περισσότερο αίμα από αυτό που συνήθως απαιτεί το σώμα σε κατάσταση ηρεμίας. Το 80% του αίματος που καταφθάνει στους κόλπους διοχετεύεται άμεσα στις κοιλίες, ακόμα και πριν την κολπική συστολή. Στη συνέχεια, με τη συστολή των κόλπων προκαλείται μία συμπληρωματική πλήρωση των κοιλιών, κατά ποσοστό 20%. Οι κόλποι, επομένως, λειτουργούν απλά ως τροφοδότριες αντλίες, οι οποίες αυξάνουν την αντλητική αποτελεσματικότητα των κοιλιών μέχρι και 20%. Εντούτοις, όταν οι κόλποι δε συστέλλονται φυσιολογικά, δεν μπορεί να επιτευχθεί μέγιστη καρδιακή παροχή υπό συνθήκες σωματικής άσκησης, οπότε σε αυτή την περίπτωση εμφανίζονται οξέα σημεία καρδιακής ανεπάρκειας και, ιδιαίτερα, δυσπνοϊκά φαινόμενα.

1.2 Φυσιολογία του μυοκαρδίου ^{1,3}

Για να κατανοήσουμε σε βάθος το εύρος της δραστηριότητας και τη λειτουργική ικανότητα της καρδιάς, είναι απαραίτητο να ξεκινήσουμε τη μελέτη μας από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του μυοκαρδίου.

Το μυοκάρδιο αποτελεί το βασικό μυϊκό ιστό της καρδιάς και το 75% του πάχους του καρδιακού τοιχώματος. Βρίσκεται μεταξύ του περικάρδιου, ενός ινώδους σάκου που περιβάλλει τον καρδιακό μυ και του ενδοκάρδιου, της σκληρής μεμβράνης που καλύπτει το εσωτερικό της καρδιάς. Μια πιο διεισδυτική ματιά με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκαλύπτει τη σύστασή του από κυλινδρικά, μονοπύρρηνα ή διπύρρηνα κύτταρα που ονομάζονται καρδιακές ίνες. Οι επιμήκεις αυτοί σχηματισμοί συνεχώς διαιρούνται, επανασυνδέονται και εκ νέου επεκτείνονται, σχηματίζοντας ένα τρισδιάστατο πλέγμα που επιτρέπει στην καρδιά να συστέλλεται κυματοειδώς.⁴

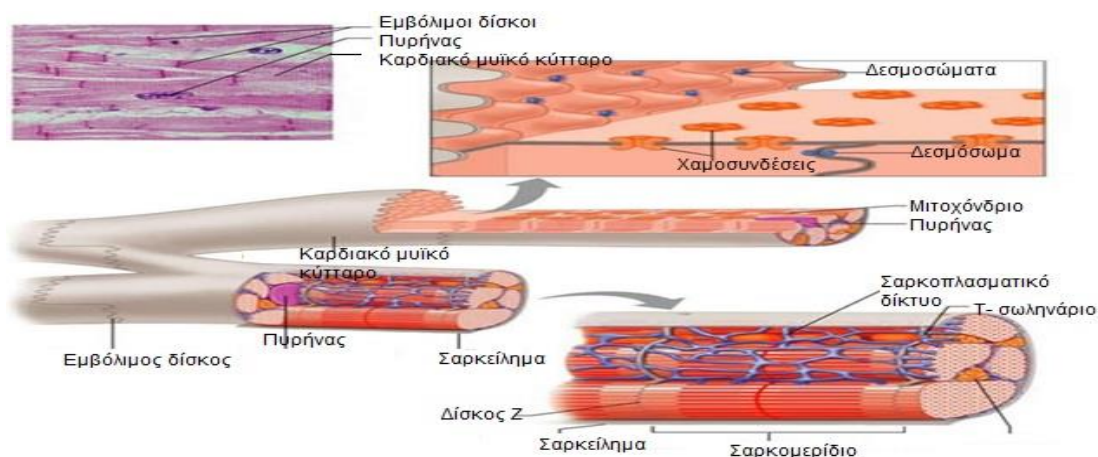
Σε αντίθεση με τις δομικές μονάδες ενός τυπικού σκελετικού ιστού, τα καρδιακά κύτταρα είναι μικρότερα σε μέγεθος και διαχωρίζονται με τους λεγόμενους **εμβόλιμους δίσκους**. Πρόκειται για πλασματικές μεμβράνες, εγκάρσια

τοποθετημένες στις μυϊκές ίνες της καρδιάς, οι οποίες συγχωνεύονται μεταξύ τους και δημιουργούν μία ασυνεχή, πτυχωτή επιφάνεια. Κάθε οπή λειτουργεί ως κανάλι ανταλλαγής ιόντων, που διευκολύνεται από τη ροή του κυτταροπλάσματος και καθιστά δυνατή όχι μόνο τη χημική επικοινωνία δύο διαδοχικών κυττάρων, αλλά και την ανάπτυξη δυναμικού δράσης για την εκδήλωση του καρδιακού παλμού. Τα κύτταρα δε συστέλλονται με διαφορετική συχνότητα και ένταση· οι εμβόλιμοι δίσκοι διαθέτουν **δεσμοσώματα** που προσφέρουν μηχανική σταθερότητα στις καρδιακές ίνες και άγουν ταχύτατα τις ηλεκτρικές ώσεις από κύτταρο σε κύτταρο και τελικά σε ολόκληρη την καρδιά. Θα μπορούσαμε, επομένως, να πούμε ότι η "κοινωνία" αυτών των κυττάρων που δρουν συνεργειακά, καθιστούν το μυοκάρδιο "λειτουργικό" και όχι "πραγματικό" συγκύτιο, όπως στην περίπτωση των σκελετικών μυών, διότι οι εμβόλιμοι δίσκοι ορθώνονται ως ένα είδος τοίχου που επιτρέπει την ηλεκτρική και όχι τη μηχανική σύνδεσή τους.

Δεδομένου του μεγάλου έργου που καλείται να επιτελέσει η καρδιά, κάθε μυϊκό της κύτταρο είναι εξοπλισμένο με ένα μεγάλο πλήθος μιτοχονδρίων. Τα βιολογικά αυτά εργοστάσια παραγωγής ενέργειας, μεταβολίζουν με οξειδωτικό τρόπο λιπαρά οξέα και σε μικρότερο βαθμό γαλακτικό οξύ ή γλυκόζη. Έτσι, η διαθέσιμη χημική ενέργεια (ATP) μετατρέπεται σε κινητική, δίνοντας τη δυνατότητα στην καρδιά να αντλεί 4 έως 6 λίτρα αίμα ανά λεπτό σε κατάσταση ηρεμίας, ενώ σε περίπτωση έντονης μυϊκής δραστηριότητας την τετραπλάσια έως και την επταπλάσια ποσότητα.²

Η δομική υπομονάδα της καρδιακής ίνας που ευθύνεται για τη συστολή του μυοκαρδίου ονομάζεται σαρκομερίδιο. Το επαναλαμβανόμενο αυτό τμήμα μυϊκής ίνας εκτείνεται μεταξύ δύο διαδοχικών δίσκων Z, που προσδίδουν στην καρδιά την εικόνα ενός γραμμωτού μυ. Η μία επιφάνεια του "δίσκου" ζώνης Z ορίζει το τέλος ενός σαρκομεριδίου, ενώ η επόμενη την αρχή του σαρκομεριδίου που ακολουθεί. Νημάτια ακτίνης προσφύονται στις δύο πλευρές του δίσκου και διατάσσονται παράλληλα στον επιμήκη άξονα του ινιδίου. Ανάμεσα στα άκρα τους -σε κατάσταση χάλασης του μυός και σε επίσης παράλληλη διεύθετηση- εντοπίζονται νημάτια μωσίνης. Αν οι δίσκοι πιεστούν να προσεγγίσουν, τότε τα νημάτια της ακτίνης εισχωρούν στα διάκενα ανάμεσα στα νημάτια της μωσίνης, ούτως ώστε να επικαλύπτονται μεταξύ τους στο μέγιστο βαθμό. Με αυτόν τον τρόπο, η μυϊκή συστολή πραγματοποιείται με μηχανισμό διολίσθησης των νηματίων. Τί είναι όμως εκείνο που προκαλεί τη διολίσθηση των νηματίων της ακτίνης ανάμεσα στα νημάτια της μωσίνης;^{5,6}

Το ερώτημα υπολανθάνει κάποιου είδους αδυναμία της καρδιακής ίνας να θέτει αυθόρμητα το σύστημα των εγκάρσιων γεφυρών σε κίνηση, παρά την άμεση και συνεχή διάθεση των συστατικών που επιτρέπουν τη δραστηριότητά του (ακτίνη, μυοσίνη, ATP). Η αδυναμία αυτή -επωφελής για τον οργανισμό, διότι σε άλλη περίπτωση θα είχαμε συνεχή συστολή του μυοκαρδίου και συνεπώς την αδρανοποίησή του- έγκειται στην παρουσία δύο πρωτεϊνών - ρυθμιστών στην επιφάνεια των λεπτών νηματίων, της τροπονίνης και της τροπομυοσίνης.



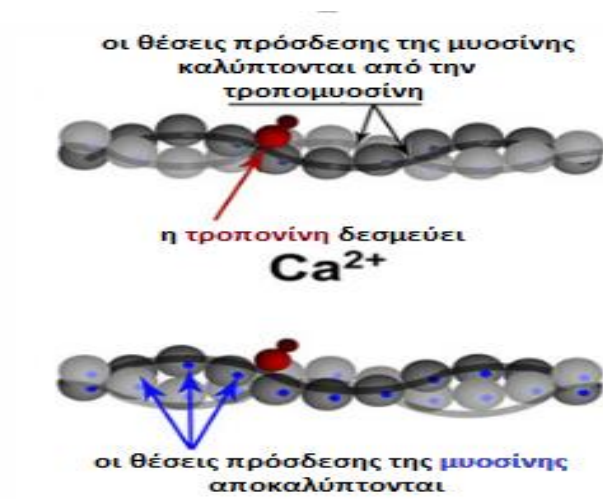
Εικόνα 2: Μικροσκοπική ανατομία καρδιακής ίνας.

Τα άκαμπτα και ραβδοειδή μόρια της τροπομυοσίνης έχουν τη μορφή μίας διπλής έλικας πολυπεπτιδίων και μήκος ίσο περίπου το μήκος επτά μορίων ακτίνης. Σαν τους κρίκους μίας αλυσίδας συνδέονται μεταξύ τους και τυλίγονται γύρω από το λεπτό νηματίο ώστε, αφενός να σταθεροποιήσουν τη δομή του ως κάποιο είδος σκελετού, και αφετέρου να καλύψουν μερικώς τις θέσεις πρόσδεσης της μυοσίνης εμποδίζοντας τις εγκάρσιες γέφυρες να έρθουν σε επαφή με την ακτίνη.

Κάθε μόριο τροπομυοσίνης διατηρείται σε αυτή την αποφρακτική θέση από την τροπονίνη, μία μικρή, σφαιρική πρωτεΐνη που αποτελεί το σύμπλεγμα τριών υπομονάδων:

- της τροπονίνης T (από το Troponin) που συνδέει την τροπονίνη με την τροπομυοσίνη
- της τροπονίνης I (από το Inhibition) που προστατεύει τη θέση σύνδεσης της μυοσίνης στην ακτίνη και αναστέλλει την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών

- της τροπονίνης C (από το Calcium), η οποία παρουσία ιόντων ασβεστίου **(1)** αλλάζει τη χωροδιάταξη ολόκληρου του μορίου, **(2)** επιδρά πάνω στην τροπομυοσίνη έλκοντάς την και **(3)** αποκαλύπτει τη μυοσινική θέση πρόσδεσης σε κάθε μόριο ακτίνης. Αντίθετα, απομάκρυνση του ασβεστίου από την τροπονίνη αναστρέφει τη διαδικασία και ενεργοποιεί εκείνη της διαστολής.



Εικόνα 3: Τρισδιάστατη απεικόνιση της επαγόμενης δράσης της τροπομυοσίνης. (Nature 368, 65-67 (1994)).

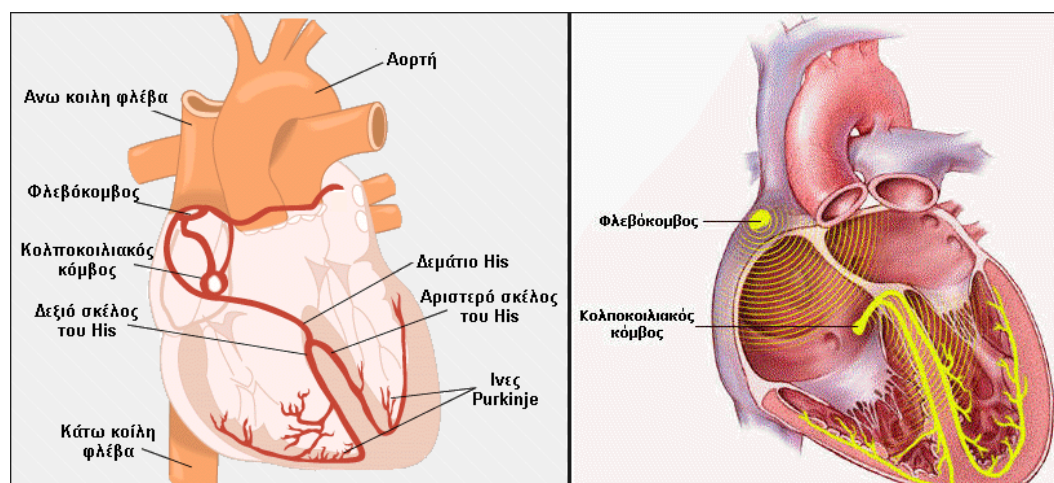
Καταλαβαίνουμε, επομένως, ότι το γεγονός που πυροδοτεί την κίνηση της καρδιάς είναι η σύνδεση των ιόντων ασβεστίου με την υπομονάδα C της τροπονίνης. Τέσσερα ιόντα ασβεστίου καλούνται να συνδεθούν στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης με σκοπό την αλλαγή της τριτοταγούς δομής και την αδρανοποίησή του συστήματος τροπονίνης-τροπομυοσίνης. Τα φορτισμένα σωματίδια διαπερνούν παθητικά την κυτταρική μεμβράνη (σαρκεΐλημα) του καρδιακού κυττάρου μέσω της διευκολυμένης, καθοδικής διάχυσης που επιτρέπουν οι διάλυτοι ασβεστίου. Το φαινόμενο διαρκεί μερικά msec, ενώ κινητήρια δύναμη για την εκδήλωσή του είναι το ηλεκτροχημικό δυναμικό: η βαθμίδωση συγκέντρωσης και δυναμικού εκατέρωθεν της μεμβράνης.⁷

Η καρδιακή μυϊκή ίνα, εντούτοις, είναι τόσο μεγάλη, ώστε τα δυναμικά δράσης που διατρέχουν την επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης δεν προκαλούν σχεδόν καμία ουσιαστική ροή ρεύματος βαθιά στο εσωτερικό της. Για να επιτευχθεί μία μέγιστη καρδιακή συστολή, τα δυναμικά δράσης μεταβιβάζονται κατά μήκος των T-σωληναρίων, που καταβυθίζονται στον όγκο της μυϊκής ίνας και τη διασχίζουν εγκάρσια από τη μία πλευρά ως την άλλη. Στη συνέχεια, τα δυναμικά δράσης των T-

σωληναρίων προκαλούν την απελευθέρωση των ιόντων ασβεστίου από τα σωληνάκια του σαρκοπλάσματικού δικτύου που βρίσκεται σε άμεση γειτνίαση με τα μυϊκά ινίδια. Τα ιόντα ασβεστίου με τη σειρά τους, προκαλούν τη συστολή. Η συνολική αυτή διαδικασία ονομάζεται ζεύξη διέγερσης – συστολής.

1.3 Φυσιολογία Μυϊκής Συστολής ^{1,2,8}

Η συσταλτική ικανότητα του μυοκαρδίου δεν είναι το αποτέλεσμα της αγωγής εξωτερικά ηλεκτρικά σήματα, όπως συμβαίνει με τους σκελετικούς μύες ή τους νευρώνες. Η παραγωγή ρυθμικών ώσεων, η ταχύτερη μετάδοσή τους σε κάθε καρδιακή ίνα και τελικά η απόλυτα συντονισμένη λειτουργία της κοιλιακής μυϊκής μάζας καθορίζεται από ένα σύνολο βηματοδοτικών κυττάρων, που χαρακτηρίζονται από αυτοματισμό, διεγερσιμότητα και αγωγιμότητα. Στο σχήμα που ακολουθεί, παρουσιάζεται το λεγόμενο **ερεθισματοαγωγό σύστημα** της καρδιάς.



Εικόνα 4: Ερεθισματοαγωγό σύστημα της καρδιάς

Ο **φλεβόκομβος** (ή κόμβος Keith - Flack ή πρωτεύον κέντρο παραγωγής διεγέρσεων) είναι μία μικρή, επίπεδη, ελλειψοειδής λωρίδα από εξειδικευμένο μυϊκό ιστό, που βρίσκεται κοντά στην εκβολή της άνω κοίλης φλέβας. Οι μυϊκές ίνες του κόμβου δεν περιέχουν σχεδόν καθόλου συσταλτά μυϊκά ινίδια και έχουν διάμετρο τρεις φορές μικρότερη από την αντίστοιχη των παρακείμενων κολπικών μυϊκών ινών. Οι μυϊκές ίνες του φλεβόκομβου συνδέονται άμεσα με τις κολπικές μυϊκές ίνες κατά τρόπο, ώστε το δυναμικό δράσης, που αναπτύσσεται στο φλεβόκομβο να εκτείνεται αμέσως προς το τοίχωμα του κολπικού μυοκαρδίου.^{5,6}

Με αυτόν τον τρόπο το δυναμικό δράσης επεκτείνεται σε ολόκληρη τη μάζα του μυοκαρδίου των κόλπων και τελικά φθάνει στον κολποκοιλιακό κόμβο. Η ταχύτητα αγωγής στο μυοκάρδιο των κόλπων είναι περίπου 0.3m/s. Εντούτοις, η αγωγή είναι ταχύτερη κατά 1m/s περίπου σε τρεις μικρές δεσμίδες ινών των κολπικών διαμερισμάτων: στην *πρόσθια*, στην *ενδιάμεση* και στην *οπίσθια* διακομβική οδό. Η μεγαλύτερη ταχύτητα αγωγής με αυτές τις δεσμίδες οφείλεται στην παρουσία, εξειδικευμένων μυϊκών ινών αγωγής. Οι ίνες αυτές μοιάζουν με τις ταχείας αγωγής ίνες Purkinje των κοιλιών, οι οποίες περιγράφονται παρακάτω.³

Το σύστημα αγωγής των κόλπων είναι οργανωμένο κατά τρόπο, ώστε η καρδιακή διέγερση να μη μεταδίδεται από τους κόλπους στις κοιλίες πολύ γρήγορα. Η καθυστέρηση αυτή παρέχει τον απαραίτητο χρόνο στους κόλπους να προωθήσουν το περιεχόμενό τους στις κοιλίες, πριν την έναρξη της κοιλιακής συστολής. Η καθυστέρηση της μετάδοσης της διέγερσης από τους κόλπους προς τις κοιλίες οφείλεται, πρωταρχικά, στον κολποκοιλιακό κόμβο και στις παρακείμενες ίνες αγωγής.

Ο **κολποκοιλιακός κόμβος** (ή κόμβος Aschoff-Tawara ή δευτερεύον κέντρο παραγωγής διεγέρσεων) βρίσκεται στη δεξιά οπίσθια θέση του μεσοκολπικού διαφράγματος και είναι το μοναδικό σημείο ηλεκτρικής σύνδεσης κόλπων και κοιλιών. Σημειώνεται ότι η διέγερση, μετά τη διαδρομή της μέσα από τη διακομβική οδό, φθάνει στον κολποκοιλιακό κόμβο περίπου 0.03s μετά τη γέννησή της από το φλεβόκομβο. Ακολουθεί καθυστέρηση 0.09s στον κολποκοιλιακό κόμβο, πριν η διέγερση να διαπεράσει τον ινώδη ιστό που διαχωρίζει τους κόλπους από τις κοιλίες. Έτσι, αν αθροίσουμε όλες τις χρονικές καθυστερήσεις μεταγωγής σήματος από τη στιγμή που δημιουργείται στο φλεβόκομβο, υπολογίζουμε ότι η ολική καθυστέρηση ανέρχεται σε 0.16s, πριν το ερέθισμα να φθάσει τελικά στον κοιλιακό μυ.^{5,6}

Το δεμάτιο του His, όπως αποκαλείται, εκτείνεται από τον κολποκοιλιακό κόμβο προς το μεσοκοιλιακό διάφραγμα και τελικά διαιρείται στο δεξιό και τον αριστερό κλάδο. Ο δεξιός κλάδος διέρχεται κάτω από το ενδοκάρδιο ως ένα μοναδικό δεμάτιο, ενώ ο αριστερός διακλαδώνεται περισσότερο περιβάλλοντας τόσο το πρόσθιο όσο και το οπίσθιο διαμέρισμα της αριστερής κοιλίας. Οι ίνες αυτές εμφανίζουν εντελώς αντίθετα λειτουργικά χαρακτηριστικά από εκείνα του κολποκοιλιακού κόμβου. Εκτός από το μέγεθός τους, που είναι μεγαλύτερο από κάθε άλλη καρδιακή ίνα, η ταχύτητα, με την οποία άγουν τα δυναμικά δράσης είναι 1.5 - 4.0m/s, δηλαδή εξαπλάσια από εκείνη

του συνήθους μυοκαρδίου και 150 φορές μεγαλύτερη από εκείνη των ινών του κολποκοιλιακού κόμβου. Αυτό επιτρέπει τη σχεδόν άμεση διαβίβαση της καρδιακής διέγερσης σε ολόκληρο το σύστημα των κοιλιών. Επίσης, το δεμάτιο του His περιέχει ελάχιστα μόνο μυϊκά ινίδια, επομένως, συστέλλεται ελάχιστα κατά την αγωγή του ερεθίσματος.

Καθώς οι δύο κλάδοι επεκτείνονται προς την κορυφή της αντίστοιχης κοιλίας, διαιρούνται σταδιακά σε μικρότερους κλάδους. Κάθε άθροισμα έξι περίπου κλάδων αυτού του είδους αποκαλείται ίνα Purkinje. Από τη στιγμή της εισόδου της καρδιακής διέγερσης στα δεσμικά σκέλη στο κοιλιακό διάφραγμα και μέχρι να φτάσει στις απολήξεις των ινών Purkinje, μεσολαβεί χρονικό διάστημα 0.03s περίπου. Κατά συνέπεια, όταν η καρδιακή διέγερση εισέλθει στο σύστημα Purkinje, μεταβιβάζεται σχεδόν αμέσως σε ολόκληρη την κοιλιακή μυϊκή μάζα.³

Ο φλεβόκομβος, ο κόλπος και ο κολποκοιλιακός κόμβος νευρώνονται από το αυτόνομο νευρικό σύστημα. Το παρασυμπαθητικό σύστημα καταστέλλει τον αυτοματισμό και παρατείνει την ανερέθιστη περίοδο του φλεβόκομβου (η μικρή χρονική περίοδος μετά την εκπόλωση της μυοκαρδιακής ίνας, κατά την οποία η ίνα δε διεγείρεται οσηδήποτε και αν είναι η ισχύς του ερεθίσματος). Επίσης, ελαττώνει την ανερέθιστη περίοδο και την ταχύτητα αγωγής του κολπικού μυοκαρδίου. Τέλος, η επίδρασή του στον κολποκοιλιακό κόμβο είναι ίδια με αυτή που ασκεί στο φλεβόκομβο. Αντίθετα, το συμπαθητικό σύστημα ανταγωνίζεται τη δράση του παρασυμπαθητικού.

1.4 Αρρυθμίες - Αντιαρρυθμικά ⁸⁻¹⁰

Αρρυθμία αποκαλείται κάθε διαταραχή του ομαλού καρδιακού ρυθμού. Πρόκειται για ένα σύνολο ανατομικών ανωμαλιών, που εντοπίζονται στον κόλπο, στην κολποκοιλιακή σύνδεση ή στην κοιλία και μπορούν να αναγκάσουν την καρδιά:

- να επιβραδύνει το ρυθμό της (φλεβοκομβική ταχυκαρδία),
- να επιταχύνει το ρυθμό της (φλεβοκομβική ή κοιλιακή ταχυκαρδία, πρόωρη κολπική εκπόλωση, κολπικός πτερυγισμός),
- να ανταποκρίνεται σε ώσεις που παράγονται σε άλλες θέσεις εκτός του φλεβόκομβου,

- να ανταποκρίνεται σε ώσεις που μεταδίδονται κατά μήκος βοηθητικών (πρόσθετων) οδών που καταλήγουν σε έκτοπες εκπολώσεις (κολποκοιλιακή επανείσοδος, σύνδρομο Wolff-Parkinson - White).

Η ακριβής διάγνωση της αρρυθμίας έχει μεγάλη σημασία, γιατί ανάλογα με τη μορφή της είναι δυνατόν να εξαχθούν συμπεράσματα σε σχέση με τη δυνατότητα διασφάλισης ηλεκτρικής ή αιμοδυναμικής σταθερότητας για τον ασθενή. Υπό την έννοια αυτή, οι αρρυθμίες διακρίνονται σε υψηλού και χαμηλού κινδύνου.

Ως σοβαρές και επικίνδυνες αρρυθμίες αντιμετωπίζονται όσες συνδέονται με καρδιακές παθήσεις, όπως η στεφανιαία νόσος. Η κλινική τους εικόνα περιλαμβάνει έντονα συμπτώματα ζάλης, αίσθημα παλμών και αδιαθεσίας, που μπορεί να συνοδεύονται από υπόταση και να καταλήξουν σε επεισόδια απώλειας συνείδησης.

Αντίθετα, οι αθώες αρρυθμίες είναι συνήθως ασυμπτωματικές. Η εμφάνισή τους παρατηρείται σε υγιή άτομα που επιβαρύνουν τον οργανισμό τους με άγχος, κόπωση, υπερβολική εργασία, κάπνισμα, υπερβολική κατανάλωση καφέ και ποτών. Αρρυθμίες μηδαμινής σημασίας είναι μερικές φορές το αποτέλεσμα εξωκαρδιακών αιτιών, όπως ο υπερθυρεοειδισμός, το έλκος στομάχου, η χολοκυστοπάθεια και η κολίτιδα.

Η διάγνωση των αρρυθμιών γίνεται με το ηλεκτροκαρδιογράφημα και την ηλεκτροφυσιολογική μελέτη. Όταν η ανάγνωση του ηλεκτροκαρδιογραφήματος γίνεται μεθοδικά και προσεκτικά, τότε τίθεται η ακριβής διάγνωση των αρρυθμιών. Η ηλεκτροφυσιολογική μελέτη είναι χρήσιμη στις περιπτώσεις, όπου το ηλεκτροκαρδιογράφημα αδυνατεί να διαγνώσει την αρρυθμία καθώς και το γενεσιουργό της μηχανισμό.

Αιτίες των αρρυθμιών:

Οι περισσότερες αρρυθμίες προέρχονται είτε από ανωμαλία στην παραγωγή του ερεθίσματος (ανώμαλος αυτοματισμός) είτε από ελάττωμα στην αγωγή του ερεθίσματος.

1. Ανώμαλος αυτοματισμός: Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο φλεβόκομβος λειτουργεί ως κύριος ρυθμιστής του καρδιακού παλμού. Τα ερεθίσματα, που παράγει, μεταδίδονται με τη βοήθεια του κολποκοιλιακού κόμβου στο δεμάτιο His, από εκεί στις ίνες Purkinje και τελικά σε ολόκληρο το μυοκάρδιο. Ωστόσο, αν κάποιος από

τους δευτερεύοντες βηματοδότες εμφανίσει αυξημένο αυτοματισμό, μπορεί να παραχθούν ανταγωνιστικές ηλεκτρικές ώσεις, με αποτέλεσμα την αρρυθμία. Ανώμαλος αυτοματισμός εμφανίζεται και σε περίπτωση βλάβης του μυοκαρδίου (π.χ. από υποξία ή από διαταραχή καλίου), οπότε τα κύτταρά του εκπολώνονται μερικώς κατά τη διαστολή και φτάνουν στον ουδό της πυροδότησης νωρίτερα από τα φυσιολογικά (ανώμαλες αυτόματες εκφορτίσεις).

2. Επίδραση των φαρμάκων στον αυτοματισμό: Τα περισσότερα αντιαρρυθμικά καταστέλλουν τον αυτοματισμό αποκλείοντας διαύλους νατρίου ή ασβεστίου. (Ο λόγος των ιόντων ως προς το κάλιο και η κλίση της καμπύλης εκπόλωσης στη Φάση 4 (διαστολική) μειώνονται, ή/και αυξάνεται η ουδός εκφόρτωσης προς λιγότερο αρνητικό δυναμικό). Τέτοια φάρμακα μειώνουν τη συχνότητα εκφόρτωσης σε κύτταρα με δραστηριότητα έκτοπου βηματοδότη, και όχι τόσο σε φυσιολογικά κύτταρα.

3. Ανωμαλίες στην αγωγή του ερεθίσματος: η γραμμική μετάδοση μιας νευρικής ώσης από τα ανώτερα βηματοδοτικά κέντρα στις οδούς που διακλαδώνονται και ενεργοποιούν ολόκληρη την κοιλιακή επιφάνεια, μπορεί να παρεμποδιστεί κατά το φαινόμενο της *επανεϊσόδου*. Έπειτα από ένα τραυματισμός του μυοκαρδίου ή μια παρατεταμένη ανερέθιστη περίοδο πιθανόν επέρχεται φραγμός σε κάποιο από τα σκέλη της οδούς αγωγής.

4. Επίδραση των φαρμάκων σε ανωμαλίες αγωγής: Οι αντιαρρυθμικές ουσίες εμποδίζουν την επανείσοδο με την επιβράδυνση της αγωγής ή/και με την αύξηση της ανερέθιστης περιόδου, που απαιτείται για να ανασταλεί ο φραγμός και να μετατραπεί μία οδός μονής κατεύθυνσης σε διπλής.¹¹

1.5 Καρδιοτονωτικές γλυκοσίδες ^{11,12}

Οι καρδιακές γλυκοσίδες (ή με μία λέξη η δακτυλίτιδα) αποτελούν κλασσικό παράδειγμα καρδιοτονωτικών φαρμάκων, που αυξάνουν την ένταση της καρδιακής συστολής. Σύμφωνα με το εθνικό συνταγολόγιο ΕΟΦ, η χορήγησή τους ενδείκνυται στην καρδιακή ανεπάρκεια και στις υπερκοιλιακές αρρυθμίες, ενώ προσαρμόζει την κοιλιακή ανταπόκριση σε ασθενείς με κολπική μαρμαρυγή.¹³

Ως ουσίες με θετική ινοτρόπο δράση, οι γλυκοσίδες επενεργούν πάνω στο μηχανισμό διολίσθησης των νηματίων ακτίνης - μυοσίνης. Σκοπός τους είναι η αύξηση της διαθέσιμης ποσότητας ασβεστίου Ca^{2+} στο εξωκυττάριο υγρό του σαρκομεριδίου, ώστε να διεισδύσει στο εσωτερικό του αναστέλλοντας το φραγμό, που εμποδίζει την αλληλεπίδρασή τους.

Η αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου [Ca^{2+}] επιτυγχάνεται με δύο τρόπους: Ο πρώτος περιλαμβάνει την αναστολή της αντλίας Na^+/K^+ - ΑΤΡάσης για την ενίσχυση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης νατρίου. Η δράση αυτή ενεργοποιεί και το δεύτερο μηχανισμό, που εξάγει το ασβέστιο από την καρδιακή ίνα μέσω της ανταλλαγής Na^+ - Ca^{2+} .

Οι ενέργειες των καρδιακών γλυκοσίδων στις ηλεκτρικές ιδιότητες της καρδιάς είναι ένα μίγμα άμεσων και αυτόνομων δράσεων. Οι άμεσες δράσεις στο σαρκείλημα των καρδιακών ινών ακολουθούν μία καθορισμένη εξέλιξη: μία πρώιμη, σύντομη παράταση του δυναμικού ενέργειας, ακολουθούμενη από μία παρατεταμένη περίοδο βράχυνσης (ιδιαίτερα στη φάση του οροπεδίου -plateau). Όλες αυτές οι ενέργειες μπορεί να παρατηρηθούν επί απουσίας έκδηλης τοξικότητας. Η βράχυνση του δυναμικού ενέργειας, συμβάλλει στη βράχυνση της ανερέθιστης περιόδου του κόλπου και της κοιλίας.

Αυξάνοντας σταδιακά τις συγκεντρώσεις του ασβεστίου, το δυναμικό της μεμβράνης γίνεται όλο και πιο αρνητικό, η τοξικότητα εξελίσσεται και ταλαντευόμενα εκπολωτικά μεταδυναμικά παρουσιάζονται μετά τα κανονικώς προκαλούμενα δυναμικά ενέργειας. Η μορφή του ηλεκτροκαρδιογραφήματος δε θυμίζει εκείνο των υγιών ατόμων. Αντιθέτως, απεικονίζει ξεκάθαρα την κλινική εικόνα της διδυμίας, της αυτο-συντηρούμενης ταχυκαρδίας, της μαρμαρυγής, η οποία μπορεί να αποβεί θανατηφόρα, αν οι ποσότητες το ασβεστίου συνεχίσουν να αυξάνονται με αυτό το ρυθμό. Επιπλέον εκδηλώσεις του τοξικού δακτυλιδισμού αποτελεί ο κομβικός ρυθμός, οι πρόωρες κοιλιακές εκπολώσεις και ο δεύτερου βαθμού κολποκοιλιακός αποκλεισμός. Γενικά, μπορεί να προκληθεί οποιοδήποτε είδος αρρυθμίας. Οι αυτόνομες δράσεις των καρδιακών γλυκοσίδων στην καρδιά, σχετίζονται τόσο με το παρασυμπαθητικό όσο και με το συμπαθητικό σύστημα. Στο κατώτερο μέρος του δοσολογικού εύρους, κυριαρχούν οι καρδιοεκλεκτικές, παρασυμπαθητικομιμητικές ενέργειες. Αντιθέτως, σε τοξικά επίπεδα είναι αυξημένη η συμπαθητική διέγερση, που

ευαισθητοποιεί το μυοκάρδιο και επιδεινώνει όλες τις τοξικές ενέργειες του φαρμάκου.

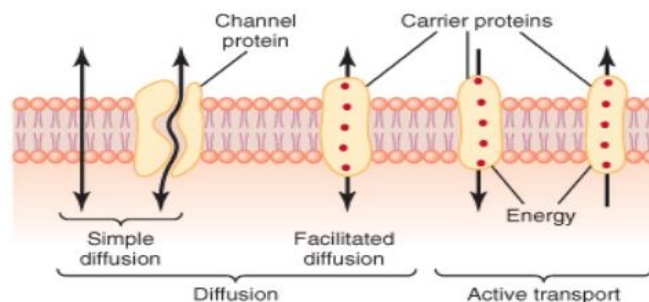
Κεφάλαιο 2: Μηχανισμοί Ομοιοστασίας

2.1 Εισαγωγή

Οι πρώτοι αυτόνομοι σχηματισμοί - πρόγονοι των σύγχρονων κυττάρων δεν είχαν την ανάγκη μηχανισμών επικοινωνίας για να αλληλεπιδράσουν με το περιβάλλον τους. Αποτελούσαν μικρογραφίες της αρχέγονης θάλασσας που τους περιέβαλε: υδατικά σύνολα πλούσια σε κάλιο και μαγνήσιο. Μία απλή διάχυση των ουσιών μέσω του τυπικού φραγμού της κυτταρικής μεμβράνης ήταν αρκετή για την ανίχνευση των χημικών σημάτων. Οι γεωλογικές, όμως, μεταβολές που ακολούθησαν και οι ουσίες που εκχύθηκαν από το εσωτερικό της γης με τις συνεχείς εκρήξεις ηφαιστειών, αλλοίωσαν τη σύσταση των ωκεανών αυξάνοντας βαθμιαία το ποσοστό των αλάτων ασβεστίου και νατρίου. Στο διαφοροποιημένο, πλέον, περιβάλλον των υδρόβιων μορφών ζωής, αποκτούσαν εξελικτικό πλεονέκτημα τα κύτταρα που ανέπτυσαν στη μεμβρανική τους επιφάνεια αντλίες ιόντων. Με αυτόν τον τρόπο κατάφεραν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν, ελέγχοντας και ρυθμίζοντας τη μετακίνηση του καλίου, του μαγνησίου, του ασβεστίου και του νατρίου από και προς το μικροπεριβάλλον τους.^{14,15}

Υπάρχουν τρεις κυρίως τρόποι με τους οποίους είναι δυνατόν να μετακινηθούν μόρια εκατέρωθεν μιας μεμβράνης

- η ελεύθερη διάχυση (παθητική μεταφορά),
- η υποβοηθούμενη διάχυση και
- η ενεργή μεταφορά



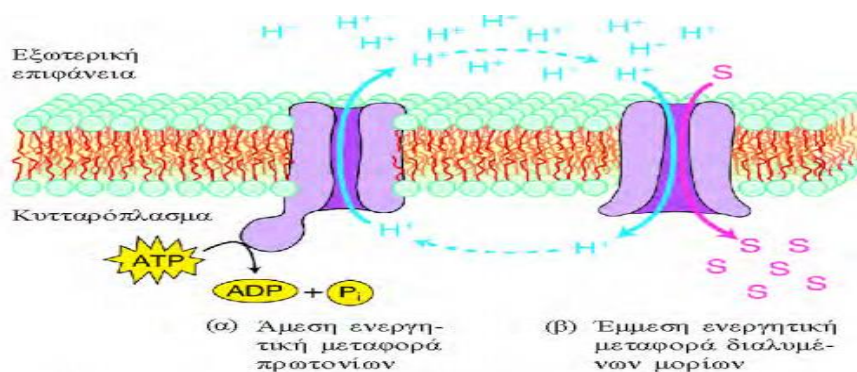
Εικόνα 5: Τρόποι μετακίνησης μορίων στο επίπεδο της μεμβράνης (Elsevier. Guyton and Hall : Textbook of medical physiology (2012))

Η ενεργητική μεταφορά λειτουργεί ενάντια στην "ηλεκτροχημική διαφορά συγκέντρωσης" (gradient) και η κίνηση μορίων επιτυγχάνεται με κατανάλωση ενέργειας, που προέρχεται από την υδρόλυση ATP ή με τη χρήση διαφοράς συγκέντρωσης ιόντων Na^+ που έχει δημιουργηθεί από την "αντλία καλίου-νατρίου".

Η ενεργητική μεταφορά επιτελεί τρεις κύριες λειτουργίες στα κύτταρα και στα οργανίδια:

- i. Επιτρέπει την πρόσληψη θρεπτικών ουσιών από το περιβάλλον ή από τα γύρω υγρά, ακόμη και αν οι συγκεντρώσεις τους στο περιβάλλον είναι μικρότερες από το εσωτερικό του κυττάρου.
- ii. Επιτρέπει σε διάφορες ουσίες, στα εκκρινόμενα συστατικά και στις άχρηστες ουσίες να μετακινούνται έξω από τα κύτταρα ή τα οργανίδια, ακόμη και αν η συγκέντρωσή τους είναι μεγαλύτερη από ότι το εσωτερικό του κυττάρου.
- iii. Επίσης, επιτρέπει συγκεκριμένες ενδοκυττάρειες συγκεντρώσεις ειδικών ανόργανων ιόντων, όπως K^+ , Na^+ , Ca^{2+} και H^+ ανεξάρτητα από τις εξωκυττάρειες.

Στην ενεργητική μεταφορά διακρίνουμε δύο τύπους: την άμεση ενεργητική μεταφορά και την έμμεση ενεργητική μεταφορά. Η πρώτη περιλαμβάνει ένα σύστημα μεταφοράς συνδεδεμένο με υδρόλυση ATP, όπου το ATP προωθεί την προς τα έξω μεταφορά H^+ εγκαθιστώντας ηλεκτροχημική βαθμίδωση πρωτονίων κάθετα στη μεμβράνη. Η έμμεση ενεργητική μεταφορά περιλαμβάνει ένα σύστημα μεταφοράς με συμμεταφορά κατιόντων, ενώ η ενέργεια που παρέχεται για τη μεταφορά των κατιόντων χρησιμοποιείται για τη μεταφορά άλλων ουσιών, αντίθετα από τη συγκέντρωσή τους ή την ηλεκτροχημική βαθμίδωση.¹⁶



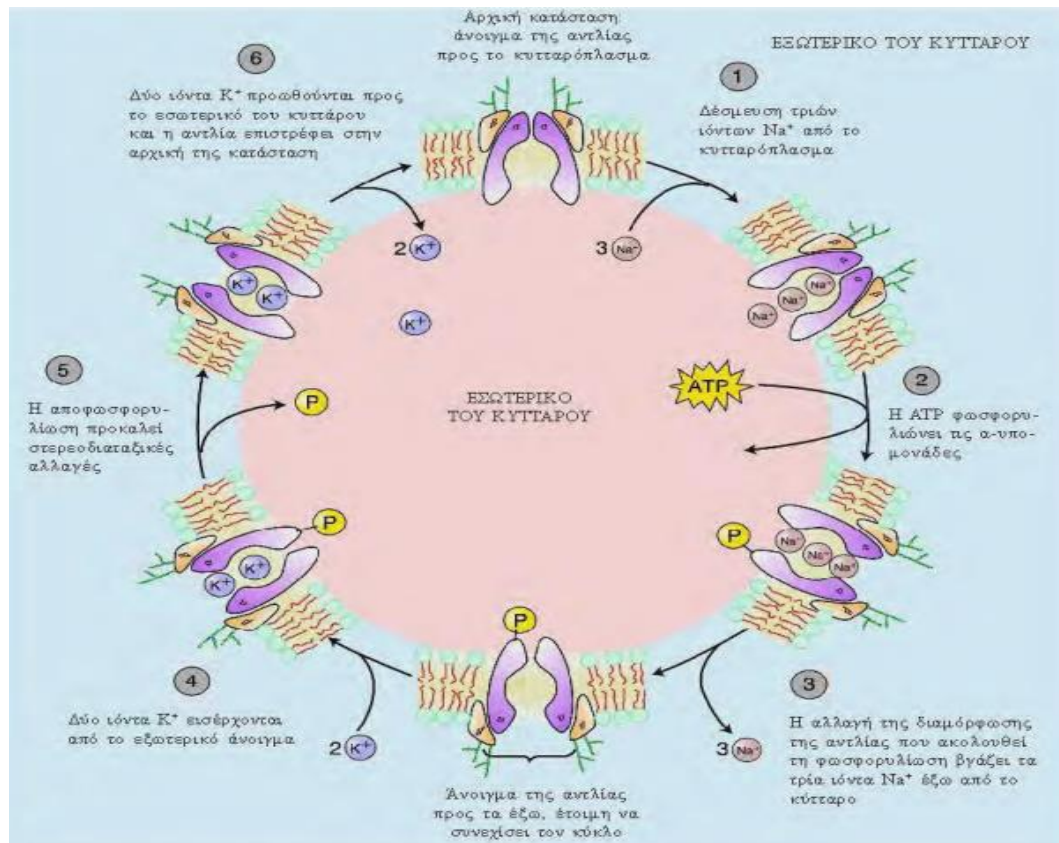
Εικόνα 6: Τύποι ενεργητικής μεταφοράς

2.2 "Αντλία Na⁺-K⁺" ¹⁶

Η "αντλία Na⁺-K⁺" αποτελεί παράδειγμα άμεσης ενεργητικής μεταφοράς και ο ρόλος της είναι να "αντλεί" ιόντα Na⁺ από το εσωτερικό του κυττάρου προς τα έξω με ταυτόχρονη την αντίθετης κατεύθυνσης μεταφορά ιόντων K⁺. Αποτελεί μόνη της ένα σύστημα ATPάσης, δηλαδή ανήκει στην κατηγορία των πρωτεϊνών μεταφοράς, που ειουργούν καταναλώνοντας ATP.

Δομικά η "αντλία Na⁺-K⁺" είναι μια τετραμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη της μορφής α₂β₂. Οι α υπομονάδες είναι καταλυτικά ενεργές και αφ' ενός διαθέτουν θέσεις δέσμευσης για ATP και ιόντα Na⁺ στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης, αφ' ετέρου διαθέτουν θέσεις δέσμευσης για ιόντα K⁺ στην εξωκυττάρια πλευρά της μεμβράνης. Επίσης είναι γνωστό, ότι οι υπομονάδες β εντοπίζονται στην εξωκυττάρια πλευρά, είναι γλυκιωμένες, αλλά δεν είναι ακόμα σαφής η λειτουργία τους.

Η "αντλία Na⁺-K⁺" είναι μια αλλοστερική πρωτεΐνη με δύο στερεοδιατάξεις, που αναφέρονται ως A1 και A2. Κατά την A1 διαμόρφωση, η πρωτεΐνη είναι ανοιχτή προς το εσωτερικό του κυττάρου και έχει υψηλή συγγένεια σύνδεσης για τα ιόντα Na⁺, ενώ η A2 διαμόρφωση είναι ανοιχτή προς το εξωτερικό του κυττάρου με υψηλή συγγένεια σύνδεσης για τα ιόντα K⁺. Η φωσφορυλίωση του ενζύμου, που ενεργοποιείται από τα ιόντα Na⁺, την σταθεροποιεί στη A2 διαμόρφωση. Η αποφωσφορυλίωση, που ενεργοποιείται από K⁺, σταθεροποιεί το ένζυμο στη διαμόρφωση A1. Όπως φαίνεται στην εικόνα 7 ο πραγματικός μηχανισμός μεταφοράς περιλαμβάνει τη σύνδεση τριών ιόντων Na⁺ από την αντλία Na⁺-K⁺ στη διαμόρφωση A1 στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης. Η σύνδεση ενεργοποιείται από φωσφορυλίωση του ενζύμου από την ATP, με αποτέλεσμα τη μετάπτωση της πρωτεΐνης από τη διαμόρφωση A1 στην A2 και τη μεταφορά και ελευθέρωση των ιόντων Na⁺ στην εξωκυττάρια πλευρά της μεμβράνης. Στη συνέχεια ιόντα K⁺ από την εξωκυττάρια πλευρά προσδένονται στις α-υπομονάδες προκαλώντας αποφωσφορυλίωση και επαναφορά της αντλίας στην αρχική A1 διαμόρφωση. Σε αυτή την πορεία τα ιόντα K⁺ μεταφέρονται στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης, όπου αποσπώνται, επιτρέποντας την έναρξη του επόμενου κύκλου. Η ποσότητα των ιόντων Na⁺ που εξέρχονται μέσω της αντλίας υπερβαίνει την ποσότητα των ιόντων K⁺ που μεταφέρονται μέσα στο κύτταρο με αναλογία 3:2.



Εικόνα 7: Μηχανισμός αντλίας Na^+/K^+

2.3 Αντλία Ασβεστίου ¹⁷

Σε αντίθεση με τα ιόντα K^+ , Na^+ , το κυτταρόπλασμα των διαφοροποιημένων σκελετικών, καρδιακών και νευρικών κυττάρων δε διαθέτει υψηλές συγκεντρώσεις ελεύθερα κινούμενου ασβεστίου.

Κάθε κύτταρο του οργανισμού, σε κατάσταση ηρεμίας, διατηρεί τα αποθέματα ασβεστίου του σε οργανίδια, όπως το σαρκοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια, και σε συγκεντρώσεις της τάξης του 10^{-7}M , ενώ τα επίπεδα του ιόντος στο εξωκυττάριο υγρό είναι περίπου ίσα με 2,4 mM. Με αυτό τον τρόπο, δημιουργείται μία μεγάλη βαθμίδωση της συγκέντρωσης, που ευνοεί την είσοδο του ασβεστίου στο κύτταρο.

Η ρύθμιση της συγκέντρωσης $[\text{Ca}^{2+}]$ γίνεται μέσω τριών βασικών μηχανισμών:

1. τον έλεγχο της εισόδου Ca^{2+}
2. τον έλεγχο της αποβολής Ca^{2+} .

3. ανταλλαγή Ca^{2+} ανάμεσα στο κυτταρόπλασμα και στις ενδοκυττάρειες αποθήκες.

Μηχανισμοί εισόδου του ασβεστίου:¹⁷

Τα κύτταρα διαθέτουν τέσσερις βασικές οδούς εισαγωγής ασβεστίου από τις κυτταρικές μεμβράνες:

- δίαυλους (κανάλια) Ca^{2+} , που εξαρτώνται από το δυναμικό ενέργειας (voltage - activated calcium channels) εκατέρωθεν της κυτταρικής μεμβράνης.
- δίαυλους (κανάλια) Ca^{2+} , που εξαρτώνται από την πρόσδεση του κατάλληλου υποδοχέα (receptor - operated channels - ROC).
- δίαυλοι (κανάλια) Ca^{2+} , που ρυθμίζονται από αποθέματα (store - operated calcium channels - SOC)
- ανταλλαγή Na^+ - Ca^{2+} (λειτουργεί και προς τις δύο κατευθύνσεις, βλ. *Μηχανισμοί αποβολής ασβεστίου*)

Ο πρώτος μηχανισμός λειτουργεί συνδυαστικά με τις αντλίες Na^+/K^+ για τον καθορισμό του δυναμικού, επιτρέποντας σε μυϊκά και νευρικά κύτταρα να εισάγουν σημαντικές ποσότητες Ca^{2+} στο εσωτερικό τους, όταν εκπολώνεται η κυτταρική μεμβράνη. Παρουσιάζουν υψηλή εκλεκτικότητα για ιόντα ασβεστίου και δευτερευόντως για ιόντα βαρίου Ba^{2+} , αποκλείοντας το ενδεχόμενο ανταλλαγής νατρίου ή καλίου. Ηλεκτροφυσιολογικές και φαρμακολογικές ενδείξεις υποδεικνύουν την ύπαρξη πέντε διακριτών υποτύπων καναλιών Ca^{2+} , που εξαρτώνται από το δυναμικό εκατέρωθεν της κυτταρικής μεμβράνης: των L, T, N, P/Q και R (τα P και Q έχουν τόσες ομοιότητες, ώστε συνήθως αναφέρονται μαζί). Οι υπότυποι διαφέρουν ως προς την κινητική ενεργοποίησης και απενεργοποίησής τους, τον ουδό δυναμικού για την ενεργοποίησή τους, την αγωγιμότητά τους και την ευαισθησία τους σε παράγοντες αποκλεισμού. Ως προς τη λειτουργία τους θα μπορούσαμε να πούμε, ότι τα L κανάλια παίζουν σπουδαίο ρόλο στη ρύθμιση της συσταλτικότητας του μυοκαρδίου και των λείων μυών, τα N μαζί με τα P/Q εμπλέκονται στην απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών και ορμονών, ενώ τα T κανάλια ελέγχουν διάφορες λειτουργίες των νευρώνων, που καθορίζονται από το ασβέστιο, όπως τη ρύθμιση άλλων καναλιών ή ενζύμων. Καρδιαγγειακά, αναλγητικά, αντιεπιληπτικά φάρμακα, τοξίνες που αξιοποιούνται ως πειραματικά εργαλεία παρεμβαίνουν άμεσα

στη λειτουργία αυτών των καναλιών. Έμμεσα αλληλεπιδρά μόνο μία μερίδα φαρμάκων που ασκεί τη δράση της σε συζευγμένους με G-πρωτεΐνη υποδοχείς.

Ο δεύτερος μηχανισμός απαιτεί για την ενεργοποίησή του ένα διεγερτικό νευροδιαβιβαστή, ενώ δεν παρουσιάζει μεγάλη εκλεκτικότητα για το ασβέστιο, επιτρέποντας τη μεταφορά και άλλων ιόντων. Εναλλακτικά, χαρακτηρίζεται ως **τοξικότητα εκ διεγέρσεως**, μιας και πιθανόν εμπλέκεται σε διάφορες νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Παρόλο που μπορεί να προκαλέσουν νευρολογικά προβλήματα, οι διάλυτοι ROC, δεν εντοπίζονται στην επιφάνεια του λείου μυϊκού ιστού. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί ο υποδοχέας P_{x2}.

Στην τρίτη περίπτωση, έχουμε κανάλια της μεμβρανικής επιφάνειας με πολύ χαμηλή αγωγιμότητα. Τα κανάλια αυτά ανοίγουν για να επιτρέψουν την είσοδο Ca²⁺, όταν εξαντλούνται τα αποθέματα του ενδοπλασματικού δικτύου, χωρίς να είναι ευαίσθητα στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση του ιόντος, πρόσφατα όμως διαπιστώθηκε ότι εμπλέκεται η πρωτεΐνη Stim1 της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου, που ανιχνεύει το Ca²⁺. Η πρωτεΐνη αυτή συνδέεται απευθείας με την πρωτεΐνη του διαύλου (Orai1) στην κυτταρική μεμβράνη. Τα κανάλια αυτά, όπως και τα αντίστοιχα του ενδοπλασματικού και του σαρκοπλασματικού δικτύου, μπορούν να χρησιμεύσουν στην ενίσχυση της αύξησης της συγκέντρωσης ασβεστίου [Ca²⁺], η οποία προκύπτει από την απελευθέρωση Ca²⁺ από τα σημεία αποθήκευσης.

Μηχανισμοί αποβολής ασβεστίου¹⁷

Η ενεργητική μεταφορά του ασβεστίου προς τα έξω, μέσω του σαρκειλήματος, και προς τα μέσα, με τη βοήθεια των μεμβρανών του ενδοπλασματικού ή του σαρκοπλασματικού δικτύου, ρυθμίζεται από μία ασβεστιο-εξαρτώμενη ATPάση, παρόμοια με εκείνη της αντλίας Na⁺/K⁺.

Η λειτουργία της αντλίας Na⁺/Ca²⁺ στηρίζεται στην ηλεκτροχημική βαθμίδωση του Na⁺. Πρόκειται για ένα δεύτερο μηχανισμό απομάκρυνσης ασβεστίου, που παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των καρδιακών κυττάρων. Κατά την απομάκρυνση ενός ιόντος ασβεστίου δημιουργείται περίσσεια ηλεκτρονίων στο κυτταρόπλασμα, που όμως αντισταθμίζεται από την είσοδο τριών ιόντων νατρίου (υπερπολωτικό ρεύμα). Η εισροή αυτή οδηγεί σε μείωση της βαθμίδωσης συγκέντρωσης νατρίου και

μείωση του ρυθμού αποβολής ασβεστίου με αποτέλεσμα μία δευτερογενή αύξηση στη συγκέντρωση $[Ca^{2+}]$. Η αντλία μπορεί στην πραγματικότητα να λειτουργήσει και αντίστροφα, εάν η συγκέντρωση $[Na^+]$ αυξηθεί υπερβολικά, οδηγώντας σε αυξημένη είσοδο ασβεστίου στο κύτταρο.

Μηχανισμοί απελευθέρωσης του ασβεστίου¹⁷

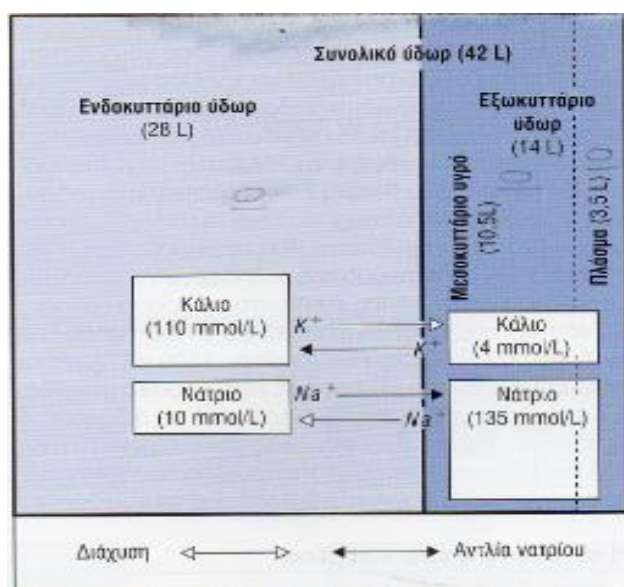
Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι καναλιών Ca^{2+} στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού και του σαρκοπλασματικού δικτύου, οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απελευθέρωση του από τις κυτταρικές αποθήκες.

- I. Ο **υποδοχέας της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (Inositol Triphosphate Receptor - IP3R)** κατατάσσεται στην ομάδα των υποδοχέων που εξαρτώνται από το πρόσδεμα. Η λειτουργία του εξαρτάται άμεσα από τη λειτουργία των υποδοχέων που συζεύγνυνται με G-πρωτεΐνες, διότι παράγουν την τριφωσφορική ινοσιτόλη IP₃, ένα δεύτερο αγγελιοφόρο και ενεργοποιητή του υποδοχέα IP₃R. Αποτέλεσμα της σύνδεσης IP₃R - προσδέματος είναι η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου.
- II. Ο **υποδοχέας της ρυανιδίνης (Ryanodine Receptor - RyR)** ασκεί ιδιαίτερη επίδραση στα κύτταρα των σκελετικών μυών· η σύμπραξη RyR υποδοχέων από την επιφάνεια του σαρκοπλασματικού δικτύου με υποδοχείς διυδροπυριδίνης, που βρίσκονται στην επιφάνεια των T-σωληναρίων, έχει ως φυσικό επακόλουθο την παραγωγή δυναμικού ενέργειας και τελικά την απελευθέρωση Ca^{2+} . Ακόμη, όμως, και σε κύτταρα που δε διαθέτουν T-σωληνάκια βρίσκουν εφαρμογή μέσω της απελευθέρωσης Ca^{2+} , που επάγεται από το Ca^{2+} (Calcium - Induced Calcium Release - CICR). Το συγκεκριμένο φαινόμενο λειτουργεί ως ενισχυτής σήματος του Ca^{2+} , που παράγεται από άλλους μηχανισμούς, όπως η διάνοιξη καναλιών Ca^{2+} στην κυτταρική μεμβράνη. Η CICR σημαίνει, ότι ο μηχανισμός απελευθέρωσης είναι ανανεώσιμος, καθώς μία αρχική απελευθέρωση Ca^{2+} απελευθερώνει περισσότερο, προκαλώντας τοπικές "αιχμές" ή "κύματα" απελευθέρωσης Ca^{2+} .

2.4 Ηλεκτρολυτικές διαταραχές ¹⁸

Το ύδωρ είναι η πιο άφθονη χημική ένωση στο ανθρώπινο οργανισμό και παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του όγκου των κυττάρων, στη μεταφορά θρεπτικών συστατικών και στην απομάκρυνση των περιττών ουσιών από τον οργανισμό. Κατά τη βρεφική ηλικία το συνολικό ποσοστό του ύδατος (total body water-TBW) στον οργανισμό είναι μεγαλύτερο από 80% και με την πάροδο των χρόνων το ποσοστό αυτό μειώνεται. Ένας ενήλικος υγιής άνδρας, έχει κατά μέσο όρο 35-45L ύδατος στον οργανισμό του σε σχέση με μια γυναίκα, που ο μέσος όρος ύδατος στον οργανισμό της φθάνει τα 25-33L (η διαφορά αυτή οφείλεται στη αυξημένη μυϊκή μάζα των ανδρών καθώς και στην αυξημένη ποσότητα λιπώδους ιστού των γυναικών). Η ποσότητα του ύδατος αρχίζει να μειώνεται ακόμα περισσότερο κατά τη μέση ηλικία και είναι απότομη στις γυναίκες μετά τα 60 τους χρόνια. Ο μέσος όρος μείωσης είναι 4L για τους άνδρες και 6L για τις γυναίκες.^{19,20}

Από το συνολικό ύδωρ το 66% βρίσκεται στο ενδοκυττάριο υγρό (ΕΚΥ), το 33% στο εξωκυττάριο υγρό (ΕΞΥ) και το υπόλοιπο 8% είναι κατανεμημένο στο πλάσμα. Τα τρία διαμερίσματα είναι ισότονα και οποιαδήποτε μεταβολή στην περιεκτικότητα των διαλυμένων ουσιών σε ένα από αυτά, έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση του ύδατος, έτσι ώστε να αποκατασταθεί η ισοτονικότητα. Η μετατόπιση αυτή δεν πραγματοποιείται ενεργητικά μέσα στον οργανισμό αλλά το ύδωρ διαχέεται ανάμεσα στο ΕΚΥ και ΕΞΥ ανάλογα με την ωσμωτικότητα.



Εικόνα 8: Κατανομή του ύδατος, του νατρίου και του καλίου στο σώμα άνδρα 70 κιλά

Σε φυσιολογικές καταστάσεις, το ποσό του ύδατος που προσλαμβάνεται από τον οργανισμό είναι ίσο με αυτό που χάνεται στην ίδια χρονική περίοδο. Ο παρακάτω πίνακας (πιν. 1) δείχνει τις πηγές και τις απώλειες ύδατος στον οργανισμό.

Υποχρεωτικές απώλειες	mL	Πηγές	mL
Δέρμα	500	Ύδωρ από οξειδωτικό μεταβολισμό	400
Πνεύμονες	400		
Έντερο	100	Ελάχιστο από τροφή	1100
Νεφροί	500		
Σύνολο	1500	Σύνολο	1500

Πίνακας 1: Πηγές και απώλειες ύδατος

Αρκετές όμως είναι και οι περιπτώσεις, που η πρόσληψη είναι αρκετά μεγαλύτερη από την ελάχιστη ημερήσια απαιτούμενη ποσότητα και η περίσσεια αποβάλλεται από τους νεφρούς.

Το ύδωρ αποτελεί τον κύριο παράγοντα μεταβολής της ωσμωτικότητας στο ΕΞΥ, επομένως διαταραχές στο μεταβολισμό του ύδατος μπορούν να διαχωριστούν σε υποωσμωτικές διαταραχές, στις οποίες υπάρχει περίσσεια ύδατος, και σε υπερωσμωτικές διαταραχές, στις οποίες υπάρχει έλλειμμα ύδατος στο σώμα. Το Na⁺ είναι το κύριο ιόν που συνεισφέρει στην ωσμωτικότητα του ΕΞΥ, για αυτό και οι διαταραχές αυτές χαρακτηρίζονται και ως υπονατριαιμία και υπερνατριαιμία αντίστοιχα.²¹

2.4.1 Μεταβολισμός του νατρίου

Το Na⁺ είναι το κύριο ιόν που βρίσκεται στο εξωκυττάριο υγρό (135-145 mmol/L) και με ενεργητική μεταφορά, μέσω της "αντλίας Na⁺-K⁺ -ΑΤΡασης", διατηρεί τη συγκέντρωσή του σταθερή μεταξύ ΕΞΥ και ΕΚΥ. Από το συνολικό Na⁺ που βρίσκεται στον οργανισμό, το 50% βρίσκεται στο ΕΞΥ και ανταλλάσσεται εύκολα με το 10%

που βρίσκεται στο ΕΚΥ και το υπόλοιπο 40% βρίσκεται υπό μορφή συμπλόκων στα οστά. Η απέκκρισή του γίνεται από τα ούρα και ελέγχεται από το ρυθμό σπειραματικής διήθησης και την αλδοστερόνη, ορμόνη που απελευθερώνεται από το φλοιό των επινεφριδίων σε απάντηση της ενεργοποίησης του συστήματος ρενίνης-αγγειοτασίνης και διεγείρει την επαναρρόφηση Na^+ .

Από κλινική άποψη οι διαταραχές του Na^+ διακρίνονται σε:

1. Ως **υπονατριαιμία** ορίζεται συγκέντρωση Na^+ στον ορό είναι $[\text{Na}^+] < 136 \text{ mmol/L}$. Αποτελεί ένα δευτερογενές φαινόμενο που δείχνει μόνο την παρουσία του συμπτώματος και δεν υποδεικνύει απαραίτητα την έλλειψη Na^+ , αλλά μπορεί να είναι αποτέλεσμα βλάβης στην ομοιοστασία του ύδατος, η οποία προκαλεί κατακράτηση αυτού και μείωση της $[\text{Na}^+]$ στο πλάσμα. Οι κύριες αιτίες υπονατριαιμίας είναι:

- Έλλειψη ύδατος και Na^+ (υποογκαιμική υπονατριαιμία)
- Περίσσεια ύδατος (ευογκαιμική υπονατριαιμία)
- Περίσσεια ύδατος και Na^+ (υπερογκαιμική υπονατριαιμία)
- Ελαττούμενο ποσοστό του περιεχομένου στο πλάσμα ύδατος (ψευδοϋπονατριαιμία)
- Προσθήκη στο πλάσμα μιας ουσίας που περιορίζεται στο $\text{E}\Xi\text{Y}$
- Ελάττωση στο συνολικό αρνητικό φορτίο των πρωτεϊνών του πλάσματος

2. Ως **υπερνατριαιμία** ορίζεται η περίπτωση εκείνη, που η συγκέντρωση Na^+ στον ορό είναι $[\text{Na}^+] > 148 \text{ mmol/L}$ και είναι πάντα αποτέλεσμα της αφυδατώσεως, μολονότι το αντίστροφο δε συμβαίνει.²²

2.4.2 Μεταβολισμός του καλίου ¹⁸

Το K^+ είναι το κύριο ιόν του ενδοκυττάριου υγρού που προέρχεται κυρίως από την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών (περίπου 70-150 mmol/ημέρα). Από το συνολικό K^+ που βρίσκεται στον οργανισμό το 90% είναι ελεύθερο και σε ανταλλάξιμη μορφή, ενώ το υπόλοιπο 10% δεσμεύεται στα ερυθροκύτταρα του αίματος. Το κατιόν αυτό, έχει την τάση να διαχέεται από το ΕΚΥ στο $\text{E}\Xi\text{Y}$ (αντίθετα από τη βαθμίδωση της συγκέντρωσης) αλλά αντισταθμίζεται από τη δράση της "αντλίας $\text{Na}^+-\text{K}^+ \text{-ATP}$ ασης". Η απέκκρισή του ρυθμίζεται εν μέρει από την

αλδοστερόνη, αλλά εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την οξεοβασική ισορροπία του οργανισμού και το pH του αίματος καθώς και την απέκκριση Na^+ και H_2O .

Αν και η συγκέντρωση του K^+ πλάσμα δεν είναι ακριβής δείκτης των επιπέδων του συνολικού καλίου του σώματος, η μέτρηση καθεαυτή είναι σημαντική, εξαιτίας της επίδρασης του K^+ στη διεγερσιμότητα των μεμβρανών. Από κλινική άποψη δύο είναι οι περιπτώσεις διαταραχής του K^+ :

1. Ως **υποκαλιαιμία** ορίζονται περιπτώσεις με συγκεντρώσεις K^+ στον ορό $[\text{K}^+] < 3,5$ mmol/L, αλλά πρέπει να συνεκτιμώνται και άλλοι παράγοντες και ιδιαίτερος η οξεοβασική ισορροπία του οργανισμού και το pH του αίματος. Ως πιθανά αίτια της διαταραχής είναι η ανεπαρκής πρόσληψη σε συνδυασμό με την αυξημένη απώλεια K^+ από το έντερο ή τους νεφρούς.

2. Ως **υπερκαλιαιμία** ορίζονται οι περιπτώσεις εκείνες, στις οποίες η συγκέντρωση K^+ στον ορό είναι $[\text{K}^+] > 5$ mmol/L. Πρέπει όμως να λαμβάνονται υπόψη για την ερμηνεία, η οξεοβασική ισορροπία του οργανισμού και το pH του αίματος καθώς και η κατάσταση των ενδοκυτταρικών μεταβολικών διεργασιών. Ως κύρια αίτια θεωρούνται η υπερβολική πρόσληψη και η ελαττωμένη απέκκριση του K^+ . Στις περιπτώσεις υπερκαλιαιμίας συμπεριλαμβάνεται και η ψευδής υπερκαλιαιμία, που οφείλεται σε αιμόλυση λόγω της καταστροφής των ερυθροκυττάρων (ερυθρών αιμοσφαιρίων) και η έξοδος του K^+ προκύπτει ως αποτέλεσμα δύσκολης αιμοληψίας.²²

Η υπερκαλιαιμία αποτελεί μια επικίνδυνη διαταραχή, διότι μέσω της επίδρασης της στην καρδιά μπορεί να προκαλέσει απροειδοποίητο θάνατο. Με την αύξηση του καλίου στο αίμα, ελαττώνεται το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης καθώς και το δυναμικό καρδιακής ενέργειας και αυξάνει η ταχύτητα επαναπόλωσης. Με αυτό τον τρόπο, η καρδιακή ανακοπή κατά την ασυστολία ή τη βραδεία κοιλιακή μαρμαρυγή μπορεί να είναι το πρώτο σημείο της υπερκαλιαιμίας. Ο κίνδυνος αυξάνει ακόμα περισσότερο όταν η συγκέντρωση γίνει $[\text{K}^+] > 6,5$ mmol/L. Στις περιπτώσεις αυτές συχνά η υπερκαλιαιμία είναι ιατρογενές περιστατικό και οφείλεται σε φαρμακευτική αγωγή ή ακατάλληλη χορήγηση καλίου.

2.4.3 Μεταβολισμός του ασβεστίου ²³

Το ασβέστιο αποτελεί στοιχείο απαραίτητο των λειτουργιών του οργανισμού και γι' αυτό, σε φυσιολογικές συνθήκες, τα επίπεδά του στο αίμα διατηρούνται μέσα σε στενά όρια (8.5 - 10.5 mg/dL). Από το ποσό αυτό, μόνο το μισό περίπου (47%) είναι ελεύθερο (ιονισμένο) και επομένως βιολογικά δραστικό, ενώ το υπόλοιπο, που είναι συνδεδεμένο (με αλβουμίνες 37%, σφαιρίνες 10%, ή ως σύμπλοκα άλατα - φωσφόρου, κιτρικών και διττανθρακικών - 6%), είναι βιολογικά αδρανές.

Η διατήρηση του ασβεστίου αίματος σε σταθερά επίπεδα (ομοιοστασία) επιτυγχάνεται μέσω τριών οργάνων (έντερο, οστά, νεφροί), των οποίων η λειτουργία ρυθμίζεται από τις λεγόμενες ασβεστιοτρόπες ορμόνες (κυρίως η παροθορμόνη, οι βιταμίνες D και οι κυττοκίνες).

Από κλινική άποψη δύο είναι οι περιπτώσεις διαταραχής του Ca^{2+} :

1. Ως **υπερασβεσταιμία** ορίζονται περιπτώσεις με συγκεντρώσεις Ca^{2+} στον ορό [Ca^{2+}] > 10.5 mg/dL. Περίπου, 50% των υπερασβεσταιμιών οφείλεται σε πρωτοπαθή υπερλειτουργία των παραθυροειδών (πρωτοπαθής υπερπαραθυροειδισμός), το 30% σε διάφορες κακοήθειες (κυρίως πνευμόνων, μαστού, αιμοποιητικού) και το υπόλοιπο 20% σε διάφορα αίτια, όπως κοκκιωματώδεις νόσοι (λήψη διουρητικών θειαζίδων ή λιθίου, δηλητηρίαση με βιταμίνες D και A ή δηλητηρίαση με αργίλιο σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια στον τεχνητό νεφρό), καθώς και -σπάνια- σε ενδοκρινοπάθειες (υπερθυροειδισμός νόσος Addison, φαιοχρωμοκύττωμα), παρατεταμένη κατάκλιση (εγκεφαλικά, σοβαρά τροχαία) και άστοχη παρεντερική σίτιση.

Ανεξάρτητα από τα αίτια που την προκαλούν, η υπερασβεσταιμία προκαλεί σημεία και συμπτώματα, που όμως δεν είναι ούτε ειδικά ούτε χαρακτηριστικά, αφού παρουσιάζονται και σε άλλες παθήσεις και καταστάσεις. Η έντασή τους εξαρτάται από την ταχύτητα εμφάνισης και το ύψος της υπερασβεσταιμίας καθώς και την ηλικία (βαρύτερη στους ηλικιωμένους). Περιλαμβάνουν, κυρίως, νευροψυχιατρικές διαταραχές (διαταραχές ύπνου, ευερεθιστότητα, κατάθλιψη, συγχυτικά φαινόμενα, υπνηλία, λήθαργο μέχρι και κώμα), γαστρεντερικές (ανορεξία, έμετοι, δυσκοιλιότητα, οξεία παγκρεατίτιδα), καρδιαγγειακές (αρρυθμίες, πιθανώς υπέρταση), νεφρικές (πολυουρία και πολυδιψία κυρίως λόγω υπερασβεστιουρίας, νεφρασβέστωση, εκπτώσεις της νεφρικής λειτουργίας) και σκελετικές (αρθραλγίες).

Η αντιμετώπιση της υπερασβεστιαμίας είναι κυρίως αιτιολογική. Σε βαριές υπερασβεστιαμίες επείγει η ταχεία ελάττωση του ασβεστίου, που επιτυγχάνεται - ανεξάρτητα από την αιτία- με ενυδάτωση με φυσιολογικό ορό και αναστολή της οστεοκλαστικής δραστηριότητας με ενδοφλέβια χορήγηση διφωσφονικών (ιδιαίτερα επί κακοηθειών και μέχρις ότου, η παράλληλα εφαρμοζόμενη αντινεοπλασματική αγωγή δώσει αποτελέσματα). Ως προς τον πρωτοπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό, που αποτελεί τη μόνη σχεδόν αιτία υπερασβεστιαμίας με υψηλή παραθορμόνη, η αντιμετώπιση είναι χειρουργική. Στις περιπτώσεις που το χειρουργείο δεν ενδείκνυται, υπάρχει η δυνατότητα συντηρητικής αντιμετώπισης με ασβεστομιμητικά (αποκατάσταση του ασβεστίου αίματος στο φυσιολογικό και ελάττωση της παραθορμόνης), ενώ σε πειραματικό ακόμα στάδιο δοκιμάζονται ουσίες με ειδική δράση σε μοριακό επίπεδο. Σημειώνεται, τέλος, πως τα ασβεστομιμητικά αποτελούν και τη μόνη συντηρητική θεραπεία του ανεγχείρητου καρκίνου των παραθυρεοειδών, με μη ικανοποιητικά, όμως ακόμη, αποτελέσματα.

2. Ως **υπασβεστιαμία** ορίζονται περιπτώσεις με συγκεντρώσεις Ca^{2+} στον ορό $[\text{Ca}^{2+}] < 8.5 \text{ mg/dL}$ και μπορεί να οφείλεται σε:

- ανεπάρκεια έκκρισης παραθορμόνης (PTH) ή ενεργοποίηση του αντίστοιχου υποδοχέα
- διαταραχές του μεταβολισμού του μαγνησίου
- ανεπάρκεια βιταμίνης D ή της δραστηριότητας του αντίστοιχου υποδοχέα
- σοβαρές κλινικές καταστάσεις, στις οποίες συμμετέχουν πολλοί παράγοντες (παγκρεατίτις, σηψαιμία, επιπλοκές εκτεταμένων εγκαυμάτων ή βαρέων νοσημάτων).

Η εμφάνιση ή όχι συμπτωματολογίας εξαρτάται από τη διάρκεια, τη βαρύτητα και τον τρόπο εκδήλωσης της υπασβεστιαμίας. Τυπικά εκδηλώνεται ως τετανία, με μεταβολή της διανοητικής κατάστασης, ανθιστάμενη συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, με σπασμούς των λείων μυϊκών ινών (βρογχόσπασμος, λαρυγγόσπασμος), με επιληπτικές κρίσεις ή με πιο ήπιες και συνάμα άτυπες κλινικές εκδηλώσεις όπως κράμπες, παραισθήσεις και αιμωδίες άκρων, αλλαγή συμπεριφοράς. Σε μακροχρόνια υπασβεστιαμία, μπορεί να μην υπάρχουν συμπτώματα, παρά τις χαμηλές τιμές ιοντισμένου ασβεστίου αίματος $[\text{Ca}^{2+}]$.

Επειδή η υπασβεστιαμία οφείλεται σε ποικίλα αίτια, είναι απαραίτητη η κατά την αρχική εκτίμηση, λήψη λεπτομερούς ατομικού και οικογενειακού ιστορικού και κλινική

εξέταση, για τυχόν αποκάλυψη δυσμορφιών, διαταραχών αναπτύξεως, νοητικής υστέρησης, ευρυμάτων αυτοανοσίας που οδηγούν στη διάγνωση χαρακτηριστικών συνδρόμων. Εργαστηριακά είναι απαραίτητες οι μετρήσεις ασβεστίου (ολικού και ιονισμένου) στο αίμα, που συνοδεύονται απαραίτητα από εξετάσεις λευκωματίνης, φωσφορικών, μαγνησίου, κρεατινίνης και παραθορμόνης Intact PTH. Θεραπευτικά, επί σοβαρών συμπτωμάτων υπασβεστιαϊμίας, απαραίτητη είναι η ενδοφλέβια χορήγηση ασβεστίου και η εν συνέχεια ρύθμιση με από του στόματος χορήγηση ασβεστίου και δραστικών μεταβολιτών της βιταμίνης D (στη χώρα μας 1α(OH) βιταμίνη D). Βέβαια, επειδή η αιτιολογική θεραπεία δεν είναι συνήθως δυνατή (π.χ. υποπαραθυρεοειδισμός, γενετικά σύνδρομα), η χρόνια αντιμετώπιση της υπασβεστιαϊμίας με ασβέστιο και βιταμίνη D, αν και δεν είναι η ιδεώδης, παραμένει όμως και η μόνη εφικτή, παρ' όλους τους περιορισμούς και τις προφυλάξεις που απαιτεί.

2.5 Νεφρική και ηπατική λειτουργία ¹⁸

2.5.1 Ήπαρ ²⁴

Το ήπαρ είναι το μεγαλύτερο όργανο στον ανθρώπινο οργανισμό και έχει ζωτική σημασία τόσο στον ενδιάμεσο μεταβολισμό, όσο και στην απομάκρυνση των τοξικών ουσιών. Η ικανότητά του να αναγεννά διαρκώς ηπατικά κύτταρα το καθιστά ανθεκτικό σε μεγάλο βαθμό, με αποτέλεσμα η λειτουργικότητά του συνήθως να μην επηρεάζεται από τυχόν βλάβες. Η μεταβολική δραστηριότητα του ήπατος εντοπίζεται κυρίως στα παρεγχυματικά κύτταρα, όπου αποτελούν και το 80% του όγκου του.

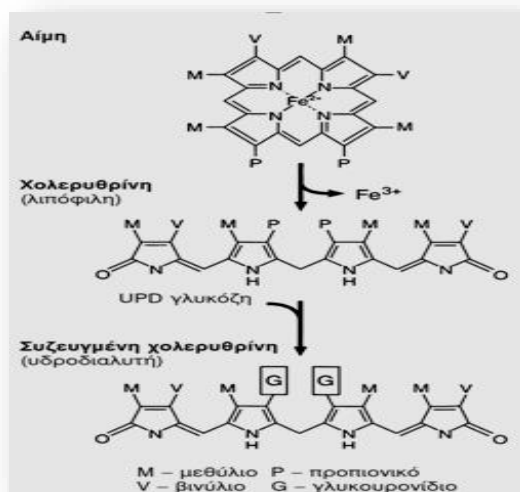
Οι πιο κοινές ασθένειες που επηρεάζουν το ήπαρ είναι:

- Η ηπατίτιδα, στην οποία υπάρχει βλάβη στα ηπατικά κύτταρα.
- Η κίρρωση, στην οποία η αύξηση του ινώδους ιστού οδηγεί σε συρρίκνωση του ήπατος, ελάττωση της ηπατοκυτταρικής λειτουργίας και παρεμπόδιση ροής της χολής.
- Όγκοι, συνήθως δευτεροπαθείς, που προκύπτουν εξαιτίας καρκινικών μεταστάσεων.

Ασθενείς με ηπατοπάθεια, συχνά παρουσιάζουν χαρακτηριστικά συμπτώματα, ιδίως ίκτερο. Ο ίκτερος, μία κίτρινο-πορτοκαλί χρώση του δέρματος, οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση χολερυθρίνης στο πλάσμα.

Χολερυθρίνη

Η χολερυθρίνη είναι μία χρωστική που προέρχεται κυρίως από την αίμη του μορίου της αιμοσφαιρίνης καθώς και από τη μυοσφαιρίνη και τα κυτοχρώματα. Όταν τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα απομακρύνονται από την κυκλοφορία μέσω του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, η αίμη απελευθερώνεται από την αιμοσφαιρίνη. Ο σίδηρος της αίμης επαναχρησιμοποιείται, αλλά ο τετραπυρρολικός δακτύλιος αποικοδομείται σε χολερυθρίνη. Η χολερυθρίνη συναντάται είτε μη συζευγμένη, έμμεση χολερυθρίνη, που δεν είναι υδατοδιαλυτή και μεταφέρεται στην κυκλοφορία του αίματος προσδεδεμένη στη λεκωματίνη, είτε συζευγμένη κυρίως με γλυκουρονικό οξύ, άμεση χολερυθρίνη, που είναι υδατοδιαλυτή. Το 95% της χολερυθρίνης, που βρίσκεται στο πλάσμα είναι μη συζευγμένη.



Εικόνα 9: Δομή χολερυθρίνης

Σε ημερήσια βάση παράγονται περίπου 300mg χολερυθρίνης, αλλά το υγιές ήπαρ μεταβολίζει και εκκρίνει τη δεκαπλάσια ποσότητα, με αποτέλεσμα η μέτρηση της συγκέντρωσης της χολερυθρίνης στο πλάσμα, να αποτελεί μια ευαίσθητη εξέταση της λειτουργίας του ήπατος.

Διαταραχές του μεταβολισμού της χολερυθρίνης:

Η υπερχολερυθριναιμία είναι αποτέλεσμα της αύξησης παραγωγής της χολερυθρίνης, λόγω βλαβών του μεταβολισμού, μειωμένη απέκκριση ή συνδυασμού αυτών. Διακρίνεται σε:

1. Μη συζευγμένη υπερχολερυθριναιμία: οφείλεται σε αιμόλυση (η παραγωγή της χολερυθρίνης υπερβαίνει την ικανότητα του ήπατος να απομακρύνει και να συζεύξει τη χρωστική) ή στο σύνδρομο Gilbert.
2. Συζευγμένη υπερχολερυθριναιμία: οφείλεται στη διαρροή της χολερυθρίνης από τα ηπατοκύτταρο ή από το χοληφόρο σύστημα στην κυκλοφορία του αίματος, όταν η φυσιολογική οδός έκκρισης παρεμποδίζεται.

Σε κάθε περίπτωση, η υπερχολερυθριναιμία δεν συναντάται μόνον σε ασθενείς, που πάσχουν από κάποια ηπατική νόσο, ούτε σχετίζεται αποκλειστικά με ηπατοπάθεια.

Ένζυμα πλάσματος:

Τα ηπατικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση της ηπατικής λειτουργίας είναι τα εξής:

- Αμινοτρανσφεράση (τρανσαμινάση) του ασπαρτικού (AST)
- Αμινοτρανσφεράση (τρανσαμινάση) της αλανίνης (ALT)
- Αλκαλική φωσφατάση (ALP)
- γ-γλουταμινοτρανσφεράση (γ-GT)

Από τα παραπάνω ένζυμα, κανένα δεν είναι ειδικός δείκτης της ηπατικής λειτουργίας. Η γ-GT είναι ένας πολύ ευαίσθητος δείκτης, που υποδεικνύει ηπατοκυτταρική βλάβη και χολόσταση ενώ οι αυξημένες δραστηριότητες των αμινοτρανσφερασών αντανakλούν κυτταρική βλάβη. Έτσι, αν και σε διάφορους τύπους ηπατικής νόσου παρατηρούνται ορισμένα πρότυπα δραστηριότητας ενζύμων του πλάσματος, δεν είναι διαφοροδιαγνωστικά. Εφόσον τεθεί διάγνωση όμως, η δραστηριότητα των ενζύμων είναι πολύ χρήσιμη στην παρακολούθηση της προόδου της ηπατικής νόσου.

Φάρμακα και ήπαρ:

Το ήπαρ παίζει έναν κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό πολλών φαρμάκων, μετατρέποντάς τα σε πολικούς, υδατοδιαλυτούς μεταβολίτες, που εκκρίνονται στη χολή και στα ούρα.

Η επαγόμενη από φάρμακα ηπατική βλάβη μπορεί να προβλεφθεί και προκαλείται, όταν ένας τοξικός μεταβολίτης παράγεται στην αντίδραση φάσης 1 του μεταβολισμού, με ρυθμό που υπερβαίνει την αποτοξινωτική ικανότητα της αντίδρασης φάσης 2 (π.χ. παρακεταμόλη). Οι τοξικές επιδράσεις των φαρμάκων είναι συνήθως απρόβλεπτες και μπορεί να είναι ανεξάρτητες της χορηγούμενης δόσης.

Άλλες αρνητικές επιδράσεις φαρμάκων στο ήπαρ είναι:

- ηπατική ίνωση ή κίρρωση (π.χ. μεθοτρεξάτη)
- δημιουργία κοκκιώματος
- αγγειακή νόσος
- ανάπτυξη όγκων

2.5.2 Νεφροί

Οι νεφροί είναι δύο όργανα στρατηγικά τοποθετημένα στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο εκατέρωθεν της αορτής, που δέχονται προς επεξεργασία το 20% της καρδιακής παροχής.

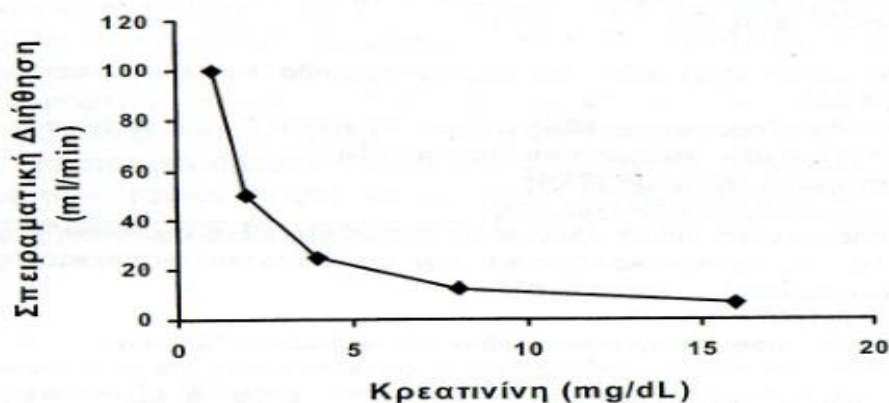
Οι νεφροί έχουν τρεις βασικές λειτουργίες:

- i. Απέκκριση άχρηστων ουσιών
- ii. Διατήρηση της σύστασης και του όγκου του εξωκυττάριου υγρού
- iii. Σύνθεση ορμονών

Επίσης συμβάλλουν στην παροχή γλυκόζης κατά τη νηστεία μέσω γλυκονογένεσης και δρουν ως ενδοκρινείς αδένες, που παράγουν τη ρενίνη, την ερυθροποιητίνη και την 1,25 διυδροξυ-βιταμίνη D.

Τα επίπεδα κρεατινίνης ορού αποτελούν δείκτη της νεφρικής λειτουργίας, διότι η κρεατινίνη παράγεται μη ενζυμικά με σταθερό ρυθμό από τους μύς και διηθείται

ελεύθερα από το σπείραμα. Η εξάρτησή της όμως από τη μυϊκή μάζα, την καθιστά έναν ειδικό αλλά με χαμηλή ευαισθησία δείκτη, καθώς μεταβολές της κρεατινίνης στο πλάσμα είναι δυνατό να παρατηρηθούν ανεξάρτητα από τη νεφρική λειτουργία και οφείλονται σε μεταβολές της μυϊκής μάζας. Συμπερασματικά, μια φυσιολογική κρεατινίνη πλάσματος δε συνεπάγεται απαραίτητα φυσιολογική νεφρική λειτουργία, αν και αυξημένη τιμή κρεατινίνης συνήθως υποδηλώνει διαταραχή της νεφρικής λειτουργίας.



Εικόνα 10: Σχέση σπειραματικής διήθησης GFR με κρεατινίνη

ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΚΡΕΑΤΙΝΙΝΗΣ (mg/dl)		
ΑΓΟΡΙΑ	ΚΟΡΙΤΣΙΑ	ΚΡΕΑΤΙΝΙΝΗ
1 – 2 ετών	1 – 3 ετών	0.2 - 0.6
3 -4 ετών	4 – 5 ετών	0.3 - 0.7
5 – 9 ετών	6 - 8 ετών	0.5 - 0.8
10 – 11 ετών	>9 ετών	0.6 - 0.9
12 – 13 ετών		0.6 – 1.0
14 – 15 ετών		0.7 – 1.1
Ενήλικες		0.8 – 1.2

Πίνακας 2: Τιμές αναφοράς για την κρεατινίνη

Για την καλύτερη και πλησιέστερη στην πραγματικότητα εκτίμηση της σπειραματικής διήθησης GFR χρησιμοποιούνται τύποι, που λαμβάνουν υπ' όψιν τους την ηλικία, το φύλο και το σωματικό βάρος των ασθενών.

$$GFR = \frac{[140 - \text{Ηλικία}] \times \text{Σωματικό Βάρος}}{72 \times \text{Κρεατινίνη Ορού}} \quad (\text{άνδρες})$$

$$GFR = \frac{[140 - \text{Ηλικία}] \times \text{Σωματικό Βάρος}}{85 \times \text{Κρεατινίνη Ορού}} \quad (\text{γυναίκες})$$

Όπου GFR= σπειραματική διήθηση σε ml/min, η ηλικία σε έτη, το βάρος σώματος σε Kg, Cr= η κρεατινίνη ορού σε mg/dL.²⁵

Όπως φαίνεται και στους παραπάνω τύπους η συγκέντρωση της κρεατινίνης στο πλάσμα είναι αντιστρόφως ανάλογη του GFR.

Η ουρία συντίθεται στο ήπαρ κυρίως ως παραπροϊόν της απαμίνωσης των αμινοξέων και η απομάκρυνσή της στα ούρα αποτελεί τη σπουδαιότερη οδό απέκκρισης του αζώτου. Η συγκέντρωση της ουρίας του πλάσματος είναι λιγότερο αξιόπιστος δείκτης της νεφρικής σπειραματικής λειτουργίας από την κρεατινίνη. Η παραγωγή ουρίας αυξάνει σε περιπτώσεις υψηλής πρόσληψης πρωτεϊνών, σε καταβολικές καταστάσεις και μετά από γαστρεντερική αιμορραγία, λόγω απορρόφησης αμινοξέων και πεπτιδίων. Αντίστροφα, η παραγωγή της ελαττώνεται σε ασθενείς με χαμηλή πρόσληψη πρωτεΐνης και μερικές φορές σε ασθενείς με ηπατική νόσο.

Η κυστατίνη C είναι ένα μικρού μοριακού βάρους πεπτίδιο, που παράγεται από όλα τα εμπύρρηνα κύτταρα. Απομακρύνεται από το πλάσμα και η συγκέντρωσή της σε αυτό είναι αντανακλά το GFR. Όμως η συγκέντρωσή της στο πλάσμα έχει εντονότερες διακυμάνσεις από την κρεατινίνη, αυξάνει σε κακοήθειες και μετά τη χορήγηση κορτικοστεροειδών. Η μέτρηση της κυστατίνης C χρησιμοποιείται ευρέως και θεωρείται πιο ευαίσθητος δείκτης της ήπιας νεφρικής ανεπάρκειας από την κρεατινίνη.

Νεφρικές διαταραχές:

Δύο από τις κυριότερες νεφρικές διαταραχές είναι η οξεία νεφρική ανεπάρκεια και η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια.

Η οξεία νεφρική ανεπάρκεια είναι μια απειλητική κατάσταση για τη ζωή, κατά την οποία υπάρχει επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας, που δυνητικά είναι αναστρέψιμη. Οι πιο συχνές αιτίες της είναι η νεφρική υποαιμάτωση, συγκεκριμένες νεφρικές παθήσεις και νεφροτοξικά φάρμακα. Όταν είναι υπεύθυνη η υποαιμάτωση, τότε είναι δυνατή η πρόληψη της ενδονεφρικής βλάβης με την αποκατάσταση της φυσιολογικής αιμάτωσης. Τα βιοχημικά χαρακτηριστικά της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας περιλαμβάνουν αύξηση της συγκέντρωσης της ουρίας και της κρεατινίνης του πλάσματος, υπερκαλιαιμία, υπερφωσφαταιμία, οξέωση και κατακράτηση υγρών. Οι ασθενείς παρουσιάζουν συνήθως ολιγουρία και χρειάζονται αιμοκάθαρση μέχρι να αποκατασταθεί η νεφρική λειτουργία.

Στη χρόνια ή τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια, η απώλεια της νεφρικής λειτουργίας είναι μη αναστρέψιμη και οι ασθενείς πιθανώς να χρειασθούν μεταμόσχευση ή μακράς διάρκειας αιμοκάθαρση. Στις αιτίες περιλαμβάνονται ο διαβήτης, οι αγγειακές παθήσεις, η σπειραματονεφρίτιδα και η πυελονεφρίτιδα. Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια αναπτύσσεται κατά κανόνα βαθμιαία και επειδή οι νεφροί διαθέτουν ικανοποιητικά λειτουργικά αποθέματα, οι ασθενείς συνήθως παρουσιάζονται στον ιατρό σε προχωρημένο στάδιο της νόσου. Χαρακτηριστικά ευρήματα είναι η κατακράτηση ουρίας, κρεατινίνης και άλλων άχρηστων προϊόντων, καθώς και διαταραχές της ομοιόστασης των ηλεκτρολυτών και του ύδατος.

Κεφάλαιο 3: Γενικές αρχές της δράσης των φαρμάκων: Φαρμακοκινητική – Φαρμακοδυναμική –Φαρμακογενωμική.

3.1 Εισαγωγή

Στόχος της φαρμακευτικής αγωγής είναι να προλαμβάνει, να θεραπεύει και να ελέγχει διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Για να επιτευχθεί το θεραπευτικό αποτέλεσμα, το φάρμακο θα πρέπει να φθάσει στους ιστούς-στόχους σε επαρκή, αλλά όχι τοξικά επίπεδα. Η πορεία και η δράση των φαρμάκων μελετάται^{9,26} από δύο μεγάλα κεφάλαια της φαρμακολογίας, τη φαρμακοκινητική και τη φαρμακοδυναμική.

Η **φαρμακοκινητική** μελετά τις γενικές αρχές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να περιγράψουν ή να προβλέψουν την τύχη των φαρμάκων στον ανθρώπινο οργανισμό και περιλαμβάνει τις διεργασίες από τη χορήγηση του φαρμάκου μέχρι και τη σύνδεσή του με τον υποδοχέα.

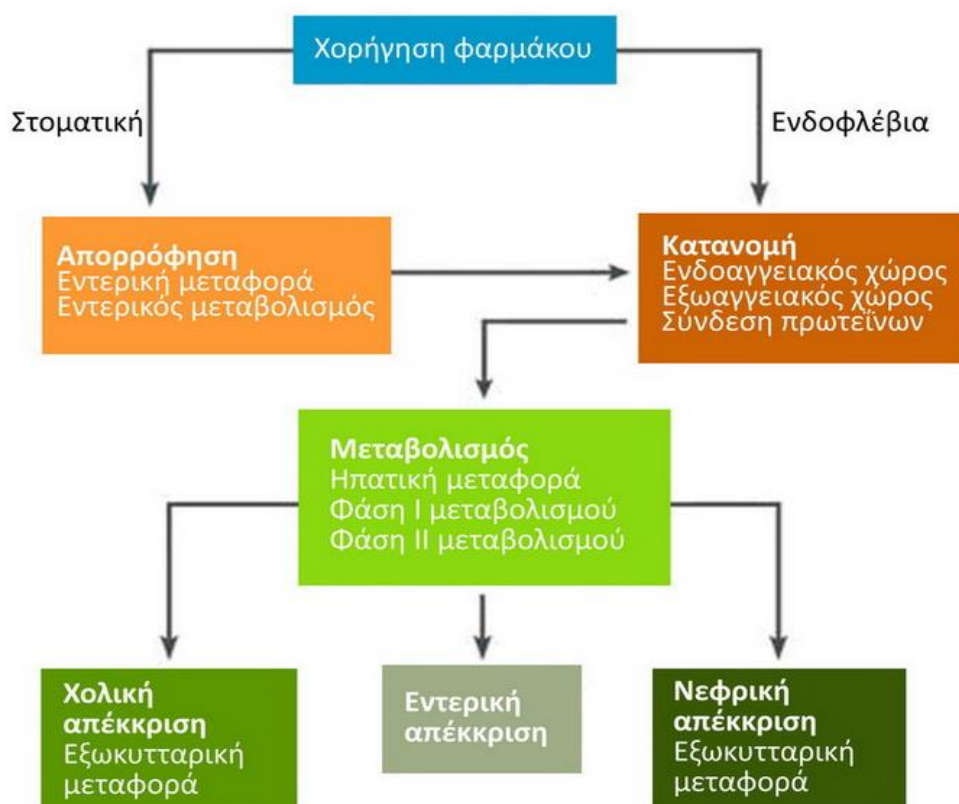
Η **φαρμακοδυναμική** μελετά τις βιοχημικές και φυσιολογικές δράσεις των φαρμάκων, το μηχανισμό δράσης τους, καθώς και την επίδραση της συγκέντρωσής τους στην ένταση της απάντησης. Η φαρμακοδυναμική φάση ξεκινά από την σύνδεση του φαρμάκου στον υποδοχέα του έως το θεραπευτικό αποτέλεσμα.



Εικόνα 11: Διεργασίες πορείας φαρμάκου στον οργανισμό

3.2 Αρχές Φαρμακοκινητικής

Η ταχύτητα έναρξης της δράσης ενός φαρμάκου, η ένταση του φαρμακευτικού αποτελέσματος και η διάρκεια δράσης του ρυθμίζονται από τους παρακάτω παράγοντες, ο συνδυασμός των οποίων, γνωστός και ως ακροστιχίδα **LADME**, δίνει το φαρμακοκινητικό προφίλ κάθε φαρμάκου. Αυτοί είναι: η απελευθέρωση (**L**iberation), η απορρόφηση (**A**bsorption), η κατανομή (**D**istribution), ο μεταβολισμός (**M**etabolism) και η απέκκριση (**E**xcretion).



Εικόνα 12: Οδοί διακίνησης των φαρμάκων

3.2.1. Απορρόφηση

Ως απορρόφηση ορίζεται η μεταφορά ενός φαρμάκου από τη θέση χορήγησης, στην κυκλοφορία του αίματος, προκειμένου να δράσει στους απομακρυσμένους ιστούς-στόχους. Η ταχύτητα και η αποτελεσματικότητα της απορρόφησης εξαρτώνται από την οδό χορήγησης. Για παράδειγμα στην ενδοφλέβια χορήγηση η απορρόφηση είναι πλήρης, δηλαδή το σύνολο της δόσης του φαρμάκου φτάνει στη συστηματική

κυκλοφορία, ενώ η χορήγηση φαρμάκων με άλλους τρόπους μπορεί να οδηγήσει σε μερική μόνο απορρόφηση και ως εκ τούτου σε χαμηλότερη βιοδιαθεσιμότητα.

3.2.2. Κατανομή

Από τη στιγμή που το φάρμακο εισέρχεται στο σώμα, από κάποια οδό χορήγησης, έχει τη δυνατότητα να κατανεμηθεί σε οποιοδήποτε από τα τρία λειτουργικώς διακριτά υδατικά διαμερίσματα του οργανισμού ή να κατακρατηθεί σε κάποια κυτταρική θέση. Η διαδικασία με την οποία ένα φάρμακο εγκαταλείπει αντιστρεπτά την κυκλοφορία του αίματος και εισέρχεται στον διάμεσο χώρο (εξωκυττάριο υγρό) ή/και στα κύτταρα των ιστών καλείται κατανομή.

Οι κυριότεροι παράγοντες που προσδιορίζουν την κατανομή του φαρμάκου είναι:

- α) αιματική ροή
- β) η μεμβρανική διαβατότητα - η διαλυτότητα στους ιστούς
- γ) η σύνδεση με πρωτεΐνες

Η αρχική (1^η) φάση κατανομής αντανακλά το κλάσμα εξώθησης της καρδιάς, τον καρδιακό όγκο και την τοπική αιματική ροή, η οποία προσδιορίζει την ταχύτητα με την οποία τα φάρμακα φθάνουν στο συγκεκριμένο ιστό και την αποτελεσματική διατήρηση της διαφοράς συγκέντρωσης μεταξύ ιστών και αίματος. Επομένως, όργανα με μεγάλη αιματική ροή, όπως καρδιά, ήπαρ, νεφροί, εγκέφαλος δέχονται το μεγαλύτερο μέρος του φαρμάκου κατά τα πρώτα λεπτά μετά τη απορρόφηση και η ισορροπία μεταξύ των συγκεντρώσεων του φαρμάκου στο αίμα και στο όργανο επέρχεται γρήγορα. Η κατανομή του φαρμάκου στους μύες, στα σπλάχνα, το δέρμα και το λιπώδη ιστό είναι βραδύτερη. Αυτοί οι ιστοί πιθανόν απαιτούν αρκετό (συγκριτικά περισσότερο) χρόνο πριν επιτευχθεί η δυναμική κατάσταση ισορροπίας (steady state - 2^η φάση κατανομής). Για πολλά φάρμακα ακολουθεί και μια 3^η φάση όπου γίνεται η πρόσληψη του φαρμάκου από το λιπώδη ιστό, ο οποίος είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί σαν αποθήκη, για να παραταθεί η δράση του φαρμάκου. Με αυτό τον τρόπο ένα φάρμακο βραχείας δράσης μετατρέπεται σε φάρμακο μακράς δράσης. Άλλο παράδειγμα "αποθήκης" χρήσιμων στοιχείων για τον οργανισμό είναι τα οστά, τα οποία αποθηκεύουν ιόντα, κυρίως βαρέων μετάλλων και φθορίου.

Η κατανομή των φαρμάκων εξαρτάται και από τη διαλυτότητά τους . Έτσι ουσίες υδατοδιαλυτές, μικρού μοριακού βάρους μπορούν ελεύθερα να κατανέμονται στο ολικό σωματικό ύδωρ, ενώ φάρμακα που έχουν υψηλή λιποδιαλυτότητα, κατανέμονται στο λιπώδη ιστό.

Τέλος η κατανομή του φαρμάκου εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των φαρμάκων και από το βαθμό σύνδεσης τους με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και των ιστών. Τα φάρμακα στο αίμα συχνά συνδέονται, σε σημαντικό βαθμό, με λευκωματίνες ή σφαιρίνες και μερικές άλλες πρωτεΐνες. Η αντιστρεπτή αυτή σύνδεση μετατρέπει τα φάρμακα σε μια μορφή, η οποία δε μπορεί να διαχυθεί και να διαπεράσει τη μεμβράνη με αποτέλεσμα να καθυστερεί τη μεταφορά τους έξω από τον αγγειακό χώρο. Παρόλα αυτά, το ελεύθερο κλάσμα του φαρμάκου βρίσκεται σε ισορροπία με το δεσμευμένο, έτσι ώστε μεταβολές της συγκέντρωσης του ελεύθερου φαρμάκου θα έχουν ως αποτέλεσμα και μεταβολές στο συνδεόμενο με πρωτεΐνες φάρμακο. Επιπλέον μόνο το ελεύθερο φάρμακο δύναται να διαπεράσει τις μεμβράνες και να φθάσει στον ιστό στόχο.

3.2.3 Μεταβολισμός

Για να απομακρυνθούν τα φάρμακα και τα ξενοβιοτικά από τον οργανισμό πρέπει να μεταβολισθούν και να μετατραπούν σε περισσότερο υδατοδιαλυτούς μεταβολίτες, οι οποίοι άλλοτε είναι περισσότερο τοξικοί από την αρχική ένωση και άλλοτε λιγότερο. Επίσης υπάρχουν περιπτώσεις που το μητρικό φάρμακο είναι ανενεργό, δηλαδή αποτελεί το "προφάρμακο" και η δραστική μορφή του είναι το προϊόν μεταβολισμού.

Ο μεταβολισμός λοιπόν αναφέρεται σε όλες εκείνες τις χημικές μετατροπές, που επιτελεί ο οργανισμός στο χορηγούμενο φάρμακο και το προϊόν του μεταβολισμού, που μπορεί να είναι ένα ή και περισσότερα, χαρακτηρίζεται ως μεταβολίτης. Οι μεταβολίτες είναι συνήθως προϊόντα ενζυμικών αντιδράσεων, τα οποία είναι πάντοτε περισσότερο πολικά από το μητρικό φάρμακο καθιστώντας έτσι ευκολότερη την απομάκρυνση τους από τον οργανισμό.²⁷

Το ήπαρ, οι νεφροί και το έντερο είναι οι σημαντικότερες θέσεις μεταβολισμού των φαρμάκων, αλλά κάποια φάρμακα μπορεί να υποστούν βιομετατροπή και σε άλλους ιστούς ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια.

Οι χημικές αντιδράσεις που ενέχονται στο μεταβολισμό των φαρμάκων διακρίνονται σε μικροσωματικές και μη οξειδώσεις, σε αναγωγές, σε υδρολύσεις και σε συζεύξεις και ταξινομούνται σε αντιδράσεις 1^{ης} και 2^{ης} φάσης.

Στις διεργασίες της 1^{ης} φάσης, τα φάρμακα υφίστανται αντιδράσεις "υποβιβασμού της δραστηρότητάς τους". Σε αυτή τη φάση συμπεριλαμβάνονται η οξειδωση, η αναγωγή και η υδρόλυση, αντιδράσεις που προσθέτουν στο φαρμακευτικό μόριο μια λειτουργική ομάδα (συνήθως εστερομάδα), που αυξάνει την πολικότητά του και συγχρόνως το καθιστά ικανό για τις αντιδράσεις της 2^{ης} φάσης.

Στη 2^η φάση έχουμε αντιδράσεις σύζευξης, όπου μια χημική ομάδα μεγάλου μεγέθους, όπως γλυκουρονικό οξύ, θειικά, γλουταθειόνη και οξικά, συνδέονται στο φαρμακευτικό μόριο με σκοπό την αύξηση της υδατοδιαλυτότητας και την αποβολή του φαρμάκου, εάν δεν έχει αποβληθεί κατά την 1^η φάση. Οι μεταβολίτες που παράγονται σε αυτή τη φάση είναι συνήθως θεραπευτικώς αδρανείς.

Οι παραπάνω αντιδράσεις επιτυγχάνονται με τη μεσολάβηση μεταβολικών ενζύμων (μικροσωματικά ένζυμα), τα οποία υφίστανται σε πολλαπλές μορφές και εμφανίζουν σχετική εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα.

Το ηπατικό μικροσωμικό ενζυμικό σύστημα είναι υπεύθυνο για το μεγαλύτερο αριθμό βιομετατροπών. Τα μικροσωματικά ένζυμα του ήπατος μετατρέπουν πολλά λιποδιαλυτά φάρμακα και ξένες ουσίες σε περισσότερο υδατοδιαλυτούς μεταβολίτες. Οι οξειδωτικές αντιδράσεις 1^{ης} φάσης πραγματοποιούνται με τα ένζυμα του κυτοχρώματος P-450 παρουσία οξυγόνου, NADPH (αναχθέν φωσφορικό νικοταμίδιο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο) και NADPH αναγωγάσης (οξειδάση μικτής λειτουργίας), όπου ένα άτομο οξυγόνου μεταφέρεται στο μόριο του φαρμάκου (οξειδωμένο φάρμακο), ενώ το άλλο άτομο οξυγόνου ανάγεται προς σχηματισμό ύδατος.⁵

Παράγοντες που επηρεάζουν τον μεταβολισμό:

Οι κλασικοί παράγοντες που επηρεάζουν τον μεταβολισμό είναι η ηλικία, το φύλο, η φυλή, τα συγχορηγούμενα φάρμακα, το περιβάλλον, το βάρος, τα συνυπάρχοντα νοσήματα κλπ.

Οι γενετικές διαφορές μεταξύ των ατόμων, ως προς το μεταβολισμό των φαρμάκων, αποτελούν σημαντικό παράγοντα των διαφορών που παρατηρούνται σε κλινικό

επίπεδο, με αποτέλεσμα ορισμένες φορές να εμφανίζονται ανεπιθύμητες παρενέργειες. Ο μεταβολισμός μπορεί να επηρεαστεί έμμεσα και από άλλους παράγοντες, που επιδρούν στη δραστικότητα των μεταβολικών ενζύμων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα και την αύξηση του χρόνου ημιζωής των φαρμάκων. Αρκετοί από αυτούς τους παράγοντες είναι ιδιαίτερα σημαντικοί, ενώ άλλοι αποκτούν σημασία μόνο σε ειδικές περιπτώσεις:

1. Η σύνδεση με πρωτεΐνες περιορίζει το ρυθμό μεταβολισμού των φαρμάκων.
2. Η καθήλωση του φαρμάκου στο λιπώδη ιστό ή στο ήπαρ προστατεύει από το βιομετασχηματισμό και παρατείνει τον χρόνο ημιζωής.
3. Οι διάφορες ηπατοπάθειες καθώς και η ανωριμότητα των ηπατικών ενζύμων κατά τη νεογνική περίοδο της ζωής διαφοροποιούν τον μεταβολισμό αρκετών φαρμάκων.
4. Ένα φάρμακο είναι δυνατόν να αναστείλει το μεταβολισμό ενός άλλου και να επιτείνει έτσι τη δράση του αλληλεπιδρώντος φαρμάκου.⁵

Ιδιαίτερη κλινική σημασία στο θέμα του μεταβολισμού εμφανίζει το φαινόμενο της ενζυμικής επαγωγής και της ενζυμικής αναστολής σε περιπτώσεις που έχουμε αλληλεπιδράσεις συγχωρηγούμενων φαρμάκων σε έναν ασθενή.

Ενζυμική επαγωγή καλείται το φαινόμενο κατά το οποίο η χρόνια χορήγηση μερικών φαρμάκων (ή/και άλλων χημικών ουσιών) μπορεί να διεγείρει στο ήπαρ τη βιοσύνθεση των μικροσωμιακών ενζύμων, που μεταβολίζουν τα φάρμακα, με αποτέλεσμα την επιτάχυνση του μεταβολισμού τους. Επαγωγή ενζύμων που μεταβολίζουν το ίδιο το φάρμακο καλείται **αυτοεπαγωγή**.

Ενζυμική αναστολή καλείται το φαινόμενο, κατά το οποίο παρεμποδίζεται ο μεταβολισμός ενός φαρμάκου από κάποιο άλλο φάρμακο ή άλλη ουσία με αποτέλεσμα την αύξηση της διάρκειας και της έντασης της φαρμακολογικής δράσης. Συνήθως οφείλεται σε ανταγωνισμό φαρμάκων για τη σύνδεση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Μεταξύ των αναστολέων συμπεριλαμβάνονται η σιμετιδίνη, η ερυθρομυκίνη, η κετοκοναζόλη, η κινιδίνη και ο χυμός του grape-fruit.

Οι κλινικές συνέπειες της επαγωγής προκύπτουν από την επιτάχυνση του μεταβολισμού των συγχωρηγούμενων φαρμάκων, με αποτέλεσμα τη θεραπευτική αποτυχία (υποθεραπευτικά επίπεδα φαρμάκου). Αντιθέτως, οι κλινικές συνέπειες της ενζυμικής αναστολής είναι κυρίως τα τοξικά επίπεδα των φαρμάκων. Επιπλέον, η

ενζυμική επαγωγή προϋποθέτει πρωτεϊνοσύνθεση του ενζύμου, συνεπώς εκδηλώνεται στον ασθενή μετά από ένα ορισμένο διάστημα, ενώ η ενζυμική αναστολή συμβαίνει άμεσα.

Τέλος, αξ σημειωθεί ότι ο μεταβολισμός ορισμένων ουσιών δημιουργεί ελεύθερες ρίζες, που αντιδρούν με τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών και προσδίδουν αντιγονικές ιδιότητες σε πρωτεϊνικά μόρια, εξηγώντας έτσι μερικές περιπτώσεις φαρμακευτικής αλλεργίας.⁵

3.2.4 Απέκκριση

Το πέρας της δράσης ενός φαρμάκου εξαρτάται από τη βιομετατροπή του σε ανενεργά προϊόντα που απεκκρίνονται. Κυριότερα όργανα αποβολής φαρμάκων είναι οι νεφροί (ούρα), το ήπαρ (χολή), ο γαστρεντερικός σωλήνας (κόπρανα) και οι πνεύμονες (εκπνεόμενος αέρας). Μικρότερης σημασίας οδοί αποβολής αποτελούν ο ιδρώτας και το μητρικό γάλα.

- I. Νεφροί: η νεφρική απέκκριση των φαρμάκων σχετίζεται με την ικανότητα των νεφρών να απεκκρίνουν την κρεατινίνη. Η κάθαρση της κρεατινίνης στα ούρα 24ώρου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της νεφρικής λειτουργίας εφαρμόζοντας τον αποδεκτό αλγόριθμο των Cockcroft και Gault:

$$CL_{Cr} (ml/min) = \frac{[(140 - \text{ηλικία}) \times \text{ιδανικό σωματικό βάρος}(kg)]}{[0,8145 \times C_{pCr} (\mu mol/L)]}$$

Όπου: CL_{Cr} : κάθαρση κρεατινίνης, C_{pCr} : τιμή κρεατινίνης στο πλάσμα

Η εξίσωση αυτή ισχύει για άνδρες, ενώ για τις γυναίκες η υπολογιζόμενη τιμή κάθαρσης της κρεατινίνης, θα πρέπει να πολλαπλασιάζεται με 0,65.

- II. Ήπαρ: το ήπαρ είναι το πιο σημαντικό όργανο μεταβολισμού. Η χολή περιέχει υψηλή συγκέντρωση μεταβολιτών, ιδιαίτερα εάν οι μεταβολίτες είναι σε ιονισμένη μορφή. Τα φάρμακα και οι μεταβολίτες, που απεκκρίνονται στη χολή, μεταφέρονται από τους χοληδόχους πόρους και τον κοινό ηπατικό πόρο στο δωδεκαδάχτυλο. Μερικά φάρμακα επαναροφώνται από τον

βλεννογόνο του εντέρου και επανέρχονται ξανά στην κυκλοφορία. Αυτή η ανακύκλωση καλείται εντεροηπατικός κύκλος.

- III. Γαστρεντερικός σωλήνας: τα τοιχώματα του στομάχου και του εντέρου αποτελούν μεγάλη λιποειδική μεμβράνη, εκατέρωθεν της οποίας μπορούν να μεταφέρονται φάρμακα από την κυκλοφορία στον γαστρεντερικό σωλήνα. Αυτή η παθητική διάχυση ορισμένες φορές είναι σημαντική, όταν πχ μια ασθενώς βασική ουσία βρίσκεται σε πολύ μεγάλη συγκέντρωση στο αίμα.
- IV. Πνεύμονες: σημαντική οδός αποβολής αερίων και πτητικών υγρών. Κατά τη διάρκεια αναισθησίας, γίνεται παρακολούθηση της τελικής συγκέντρωσης ενός πτητικού αναισθητικού στον εκπνεόμενο αέρα. Επίσης χρησιμοποιείται ως μη παρεμβατική μέθοδος για την εκτίμηση αιθανόλης στο αίμα (αλκοτέστ).
- V. Μικρότερες οδοί: ιδρώτας, σίελος, δάκρυα και μητρικό γάλα

3.2.5 Κλινική φαρμακοκινητική

Η φαρμακοκινητική, μέσω της εξατομίκευσης του δοσολογικού σχήματος, προσφέρει τη δυνατότητα βελτίωσης του θεραπευτικού αποτελέσματος του ασθενή.

Οι κύριες κλινικές φαρμακοκινητικές παράμετροι που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη προκειμένου να καθορισθεί ή τροποποιηθεί ένα δοσολογικό σχήμα είναι α) η κάθαρση, β) ο όγκος κατανομής, γ) ο χρόνος ημιζωής, δ) η βιοδιαθεσιμότητα

α. Κάθαρση (clearance, CL):

Η συνολική (σωματική) κάθαρση ή απλά κάθαρση, είναι το άθροισμα όλων των επιμέρους διαδικασιών των οργάνων απομάκρυνσης, που καθαίνουν ορισμένο όγκο αίματος από το φάρμακο ανά μονάδα χρόνου. Η κάθαρση λοιπόν μπορεί να χαρακτηρίζεται σαν νεφρική, η οποία αναφέρεται στην απέκκριση του φαρμάκου από τους νεφρούς και σαν ηπατική, η οποία περιλαμβάνει τη βιομετατροπή και την απέκκριση μέσω χολής.²⁸

Η κάθαρση ενός δεδομένου φαρμάκου είναι συνήθως σταθερή για τις συγκεντρώσεις των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται κλινικά. Όσο οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου

είναι χαμηλές, ακολουθείται κινητική πρώτης τάξεως (ο απόλυτος ρυθμός απομάκρυνσης του φαρμάκου είναι ουσιαστικά γραμμική συνάρτηση της συγκέντρωσης στο πλάσμα). Σε υψηλές συγκεντρώσεις όμως, η κινητική γίνεται μηδενικής τάξεως, δηλαδή παρατηρείται κορεσμός μεταβολικών ενζύμων και η ποσότητα του φαρμάκου που καθαίρεται είναι σταθερή, με αποτέλεσμα να καθυστερεί η απομάκρυνσή του από τον οργανισμό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η κάθαρση των αντιεπιληπτικών, όπως η φαινυτοΐνη.

Υποθέτοντας ότι υπάρχει πλήρης βιοδιαθεσιμότητα, η δυναμική κατάσταση ισορροπίας (steady state) και η επιθυμητή συγκέντρωση (C_{ss}), θα επιτευχθεί όταν ο ρυθμός αποβολής του φαρμάκου είναι ίσος με το ρυθμό χορήγησής του.

$$\text{Ρυθμός χορήγησης δόσης (Dosing rate)} = CL \times C_{ss} = \text{Ρυθμός αποβολής}$$

$$\Rightarrow CL = \text{Ρυθμός αποβολής} / C_{ss}$$

Όπως αναφέρθηκε, η κάθαρση ενός φαρμάκου από τον οργανισμό είναι αθροιστική, δηλαδή αφορά την απομάκρυνση του φαρμάκου από κάθε οδό αποβολής:

$$CL_{\text{νεφρική}} + CL_{\text{ηπατική}} + CL_{\text{άλλων οργάνων}} = CL_{\text{συστηματική}}$$

β. Όγκος κατανομής (volume of distribution, V_d):

Ο όγκος κατανομής είναι ο φαινομενικός όγκος, τον οποίο θα κατελάμβανε η δόση του φαρμάκου που χορηγήθηκε, εάν το φάρμακο ήταν κατανεμημένο παντού με την ίδια συγκέντρωση που μετρήθηκε στο πλάσμα. Αν και αυτή η υπόθεση δεν είναι ορθή από ανατομικής πλευράς, ο υπολογισμός του όγκου κατανομής είναι χρήσιμος για τον καθορισμό των δόσεων που θα χορηγηθούν στους ασθενείς, όταν είναι γνωστή η επιθυμητή συγκέντρωση του φαρμάκου. Ο όγκος κατανομής μεταβάλλεται σε συνάρτηση με το ποσό του φαρμάκου που χορηγήθηκε (A) και τη συγκέντρωση στο πλάσμα (C_p):

$$V_d = A/C_p$$

Ο όγκος κατανομής ενός φαρμάκου εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου, από το βαθμό σύνδεσής του με πρωτεΐνες του πλάσματος ή των ιστών,

από την ηλικία (τα νεογνά έχουν μεγάλο V_d , ενώ οι ηλικιωμένοι μικρό), από το φύλο (οι γυναίκες έχουν μικρότερο V_d από τους άνδρες) και από το υποκείμενο νόσημα.

γ. Χρόνος ημιζωής (elimination half-life, $t_{1/2}$):

Ο χρόνος ημιζωής είναι ο χρόνος που απαιτείται, ώστε η συγκέντρωση στο πλάσμα ή η ποσότητα του φαρμάκου στο σώμα να μειωθεί στο 50%. Ο χρόνος ημιζωής μεταβάλλεται σε συνάρτηση με την κάθαρση και τον όγκο κατανομής σύμφωνα με τον τύπο:

$$t_{1/2} = 0.693 V_d / CL$$

Ο μεγάλος όγκος κατανομής έχει μια σημαντική επίδραση στο χρόνο ημιζωής του φαρμάκου, αφού η απομάκρυνση του φαρμάκου εξαρτάται από την ποσότητα του που μεταφέρεται στο ήπαρ ή στους νεφρούς (ή άλλα όργανα που μεταβολίζουν το φάρμακο) στη μονάδα του χρόνου. Η μεταφορά του φαρμάκου στα όργανα απέκκρισης εξαρτάται όχι μόνο από την αιματική ροή, αλλά και από το κλάσμα του φαρμάκου που βρίσκεται στο πλάσμα. Αν ο όγκος κατανομής είναι μεγάλος, το περισσότερο φάρμακο βρίσκεται στον εξωαγγειακό χώρο και δεν είναι διαθέσιμο στα απεκκριτικά όργανα. Συνεπώς, κάθε παράγοντας που αυξάνει τον όγκο κατανομής μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του χρόνου ημιζωής και να επιμηκύνει τη διάρκεια δράσης του φαρμάκου.

Η γνώση του χρόνου ημιζωής ενός φαρμάκου είναι χρήσιμη στη φαρμακοκινητική παρακολούθηση των ασθενών, επειδή παρέχει πληροφορίες για το χρονικό διάστημα που χρειάζεται ένα φάρμακο για να αποβληθεί από το σώμα (πχ. σε περιστατικά χορήγησης υπερβολικής δόσης φαρμάκου). Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του μεσοδιαστήματος μεταξύ δύο διαδοχικών δόσεων. Τέλος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του χρονικού διαστήματος, που πρέπει να διαρκέσει η χορήγηση ενός φαρμάκου, πριν επιτευχθεί η κατάσταση ισορροπίας (steady-state). Να σημειωθεί ότι για να αποβληθεί μια ουσία από τον οργανισμό ή για να φθάσει το φάρμακο σε κατάσταση ισορροπίας, απαιτούνται 5 χρόνοι ημιζωής.²⁸

Μεταξύ των παραγόντων που επηρεάζουν το χρόνο ημιζωής συμπεριλαμβάνονται: η ηλικία, το φύλο, η σύνδεση με πρωτεΐνες, ασθένειες όπως νεφρική και ηπατική ανεπάρκεια, φάρμακα που προκαλούν ενζυμική επαγωγή ή αναστολή, κλπ.

δ. Βιοδιαθεσιμότητα (bioavailability):

Βιοδιαθεσιμότητα καλείται το ποσό του αμετάβλητου φαρμάκου, που φθάνει στη συστηματική κυκλοφορία, χωρίς να υποστεί καμία χημική μεταβολή και εκφράζεται ως κλάσμα (F) της δόσης που χορηγείται. Προσδιορίζεται συγκρίνοντας τα επίπεδα του φαρμάκου στο πλάσμα μετά τη χορήγηση του από μια συγκεκριμένη οδό (πχ. από το στόμα) με τα επίπεδα του φαρμάκου στο πλάσμα που επιτυγχάνονται από ενδοφλέβια ένεση, κατά την οποία ολόκληρη η χορηγούμενη ποσότητα εισέρχεται στην κυκλοφορία. Σε χορήγηση από το στόμα, μόνο ένα μέρος της χορηγούμενης δόσης εμφανίζεται στο πλάσμα και η βιοδιαθεσιμότητα είναι πολύ μικρότερη της μονάδας.

Η **βιοϊσοδυναμία** είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει τη βιοδιαθεσιμότητα και δείχνει κατά πόσον, η ίδια δόση του φαρμάκου σε διαφορετικά σκευάσματα (γενόσημα) δίνει ανάλογες συγκεντρώσεις στο αίμα. Δηλαδή δείχνει, αν το φάρμακο εισέρχεται στην κυκλοφορία στο ίδιο ποσοστό και με την ίδια ταχύτητα.

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα είναι:

- Η διαλυτότητα του φαρμάκου: τα πολύ υδρόφιλα φάρμακα δεν απορροφώνται καλά, επειδή δε μπορούν να διαπεράσουν τις λιποειδικές κυτταρικές μεμβράνες, αλλά και τα πολύ υδρόφοβα μόρια αδυνατούν να απορροφηθούν, καλά εξαιτίας της αδυναμίας τους να διαλυθούν στα υδατικά σωματικά υγρά. Έτσι, για να μπορεί να απορροφηθεί εύκολα ένα φάρμακο, πρέπει να είναι αρκετά υδρόφοβο, διατηρώντας όμως παράλληλα κάποια διαλυτότητα σε υδατικά διαλύματα.
- Η χημική αστάθεια: μερικά φάρμακα είναι ασταθή στο pH του γαστρικού περιεχομένου και μπορεί να καταστραφούν στο γαστρεντερικό σωλήνα από ένζυμα.
- Ο μεταβολισμός: φάρμακα τα οποία μεταβολίζονται γρήγορα στο ήπαρ έχουν χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα, αφού ελαττώνεται η ποσότητα του φαρμάκου που φθάνει αμετάβλητη στη συστηματική κυκλοφορία.

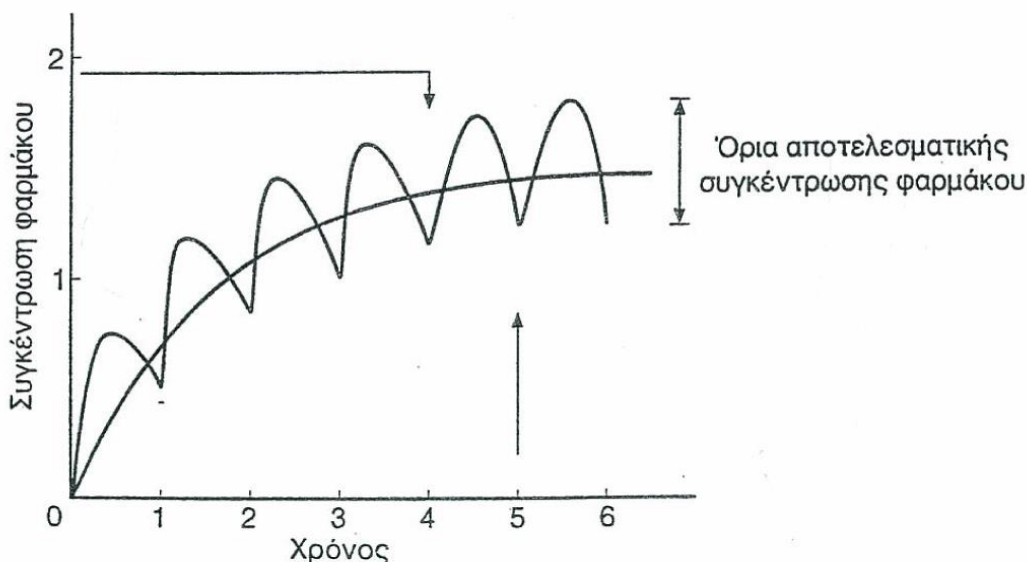
3.2.6. Τρόποι χορήγησης φαρμάκων-δοσολογικό σχήμα

Παραπάνω περιγράφηκαν οι φαρμακοκινητικές διαδικασίες που καθορίζουν το ρυθμό απορρόφησης, κατανομής και απομάκρυνσης των φαρμάκων. Η φαρμακοκινητική όμως, περιγράφει και τις ποσοτικές μεταβολές, που επέρχονται με την πάροδο του χρόνου στη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα και στη συνολική ποσότητα του φαρμάκου στο σώμα, μετά τη χορήγησή του από διάφορες οδούς. Η σημασία της φαρμακοκινητικής ενός φαρμάκου δεν αφορά μόνο στον προσδιορισμό των παραγόντων που επηρεάζουν την παραμονή και τα επίπεδά του στον οργανισμό, αλλά και στην ακριβή ρύθμιση του θεραπευτικού σχήματος ιδίως για φάρμακα που έχουν αυξημένες πιθανότητες τοξικότητας.

Στην περίπτωση που έχουμε συνεχή ενδοφλέβια έγχυση, η ταχύτητα εισόδου του φαρμάκου στον οργανισμό είναι σταθερή, ενώ η ταχύτητα εξόδου είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα σε κάθε χρονική στιγμή (κινητική 1^{ης} τάξης).

Χορήγηση διαδοχικών δόσεων ενός φαρμάκου

Όταν ένα φάρμακο χορηγείται επανειλημμένα σε τακτά χρονικά διαστήματα, η συγκέντρωσή του στο πλάσμα αυξάνει, μέχρι να επιτευχθεί κατάσταση ισορροπίας. Επειδή τα περισσότερα φάρμακα χορηγούνται με μεσοδιαστήματα μικρότερα από πέντε χρόνους ημιζωής και επειδή αποβάλλονται εκθετικά σε συνάρτηση με το χρόνο, κάποια ποσότητα φαρμάκου από την πρώτη δόση παραμένει στο σώμα τη στιγμή που χορηγείται η δεύτερη δόση· κάποια ποσότητα από τη δεύτερη δόση παραμένει τη στιγμή που χορηγείται η τρίτη κ.ο.κ. Συνεπώς το φάρμακο συσσωρεύεται στο σώμα, έτσι ώστε μετά από μερικές χορηγήσεις να επέλθει κατάσταση ισορροπίας.



Εικόνα 13: Μεταβολές της συγκέντρωσης ενός φαρμάκου, συναρτήσει του χρόνου μετά από χορηγήσεις διαδοχικών δόσεων για την επίτευξη και διατήρηση αποτελεσματικής συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα σε σταθερή κατάσταση.

Στην περίπτωση χορήγησης από το στόμα, τα φάρμακα μπορεί να απορροφούνται αργά και η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα επηρεάζεται τόσο από την ταχύτητα απορρόφησης όσο και από την ταχύτητα απομάκρυνσης.

3.2.7 Σύνδεση των φαρμάκων με πρωτεΐνες του πλάσματος

Τα φάρμακα στο αίμα συνδέονται με λευκωματίνες (κυρίως με αλβουμίνη), σφαιρίνες καθώς και άλλες πρωτεΐνες σε κυμαινόμενο βαθμό. Στη βρεφική ηλικία η σύνδεση φαρμάκων με πρωτεΐνες του πλάσματος είναι μικρή σε αντίθεση με τους ηλικιωμένους, που παρατηρείται μεγάλο ποσοστό σύνδεσης των χορηγούμενων φαρμάκων με πρωτεΐνες. Η ποσότητα του ολικού φαρμάκου στο πλάσμα ισούται με το άθροισμα του κλάσματος του ελεύθερου φαρμάκου και το κλάσμα που είναι δεσμευμένο με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Από αυτά τα δύο κλάσματα, το ελεύθερο φάρμακο είναι εκείνο που μπορεί να διαπεράσει τις μεμβράνες των κυττάρων και να φθάσει στον ιστό στόχο. Αντίθετα, το κλάσμα που είναι συνδεδεμένο με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, "παγιδεύεται", και στην ουσία αδρανοποιείται.

Τα φάρμακα που περιέχουν όξινες ομάδες, συνδέονται συνήθως με την αλβουμίνη του πλάσματος (η συγκέντρωσή της στο αίμα είναι περίπου 5 g/dL). Τα φάρμακα

που περιέχουν βασικές ομάδες, συνδέονται με την α₁-όξινη γλυκοπρωτεΐνη και τις λιποπρωτεΐνες, ενώ μερικές ενδογενείς ουσίες, βιταμίνες και μεταλλικά ιόντα, συνδέονται κυρίως με τις γλοβουλίνες (σφαιρίνες) και τα στεροειδή συνδέονται με ειδικές γλοβουλίνες. Οι δεσμοί που συμμετέχουν στην πρωτεϊνική σύνδεση είναι συνήθως δεσμοί υδρογόνου, ιοντικοί, υδρόφοβοι, Van der Waals. Η σύνδεση των φαρμάκων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος είναι αντιστρεπτή και οι ρυθμοί σύνδεσης και αποσύνδεσης είναι ταχύτατοι, με αποτέλεσμα να υπάρχει ισορροπία μεταξύ του ελεύθερου και του συνδεδεμένου με πρωτεΐνες κλάσματος.²⁹

Στην περίπτωση που χορηγούνται συγχρόνως δύο φάρμακα με υψηλή συγγένεια για κάποια πρωτεΐνη του πλάσματος, αυτά συναγωνίζονται μεταξύ τους για τις διαθέσιμες θέσεις σύνδεσης στην πρωτεΐνη. Για παράδειγμα, τα φάρμακα με υψηλή συγγένεια προς τη λευκωματίνη διαιρούνται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με το αν η δόση του φαρμάκου είναι μεγαλύτερη ή μικρότερη από τη δεσμευτική ικανότητα της λευκωματίνης. Έτσι έχουμε:

1. Φάρμακα κατηγορίας I: αν η δόση του φαρμάκου είναι μικρότερη από τη δεσμευτική ικανότητα της λευκωματίνης, τότε οι θέσεις δέσμευσης βρίσκονται σε περίσσεια σε σχέση με το διαθέσιμο φάρμακο και το συνδεδεμένο κλάσμα του φαρμάκου είναι μεγάλο.
2. Φάρμακα κατηγορίας II: τα φάρμακα αυτά χορηγούνται σε δόσεις που ξεπερνούν κατά πολύ τον αριθμό των δεσμευτικών θέσεων στη λευκωματίνη, με αποτέλεσμα το ελεύθερο κλάσμα του φαρμάκου να είναι σχετικά μεγάλο.

Οι επιπτώσεις της εκτόπισης του φαρμάκου από τις πρωτεΐνες του πλάσματος εξαρτάται τόσο από τον όγκο κατανομής, όσο και από το θεραπευτικό δείκτη του φαρμάκου. Αν ο όγκος κατανομής είναι μεγάλος, το φάρμακο που εκτοπίζεται από τις πρωτεΐνες του πλάσματος, κατανέμεται στην περιφέρεια, οπότε η αλλαγή στη συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου δεν είναι σημαντική. Αν ο όγκος κατανομής είναι μικρός, το εκτοπιζόμενο φάρμακο δε μετακινείται σε μεγάλη έκταση προς τους ιστούς, οπότε και η αύξηση του ελεύθερου φαρμάκου στο πλάσμα είναι περισσότερο έντονη. Επιπλέον, αν ο θεραπευτικός δείκτης είναι μικρός, αυτή η αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου, μπορεί να έχει σημαντικές κλινικές επιπτώσεις και να οδηγήσει σε περιπτώσεις τοξικότητας.

3.3 Αρχές Φαρμακοδυναμικής ^{9,17,11}

Φαρμακοδυναμική ονομάζουμε την επίδραση που ασκεί ένα φάρμακο στον οργανισμό από τη στιγμή της σύνδεσής του με ένα δομικά συμβατό βιολογικό υπόστρωμα. Το υπόστρωμα αυτό προϋπάρχει και προορίζεται φυσιολογικά για σύζευξη με ενδογενή χημικά σήματα - όπως ορμόνες, νευροδιαβιβαστές, διαμεσολαβητές φλεγμονής - και όχι με ξενοβιοτικές ουσίες. Ωστόσο, η προσεκτική επιλογή δραστικών ενώσεων, που μορφολογικά και λειτουργικά προσομοιάζουν με τα φυσικά προσδέματα, και η χορήγησή τους σε περιπτώσεις απορρύθμισης του οργανισμού, "ξεγελά" το σύστημα χημικής επικοινωνίας και επιβάλλει τη δράση των φαρμάκων. Στο σημείο αυτό αναφέρουμε τη γενική, κλινική αρχή που υποστηρίζει, ότι τα φάρμακα δε δημιουργούν ενέργειες εκ του μηδενός, αλλά ενισχύουν ή περιορίζουν μία ήδη υπάρχουσα φυσιολογική διαδικασία.

Για την ανάπτυξη ενός νέου φαρμάκου, που προσφέρει ικανοποιητικό θεραπευτικό αποτέλεσμα με τις ελάχιστες δυνατές παρενέργειες, αναζητούνται δομικά και μεταβολικά μονοπάτια του οργανισμού, που μπορεί να λειτουργήσουν ως σημαντικά εργαλεία στα χέρια των επιστημόνων. Έτσι, από τη μία υπάρχουν τρισεκατομμύρια διαφοροποιημένα κύτταρα, που συνιστούν τον οργανισμό, και από την άλλη ένα πλήθος μηχανισμών, που επιφέρουν ομοιοστατική ισορροπία. Εφόσον ο ερευνητής, βάσει αυτής της πολυπλοκότητας, στοχεύει στην πρόκληση μιας ισχυρής βιολογικής απόκρισης, γίνεται κατανοητό ότι η δράση των φαρμάκων πρέπει να είναι εξειδικευμένη, ενώ η κατανομή στους ιστούς είναι ανομοιογενής. Διαφορετικά, ελλοχεύει ο κίνδυνος της εκδήλωσης υποθεραπευτικών ή τοξικών αποτελεσμάτων, που θέτουν σε κίνδυνο τη ζωή των ασθενών.

Απομονώνοντας τους φαρμακολογικούς στόχους και χαρακτηρίζοντας την τρισδιάστατη δομή τους, μπορούμε να παρασκευάσουμε δραστικές ουσίες, που βάσει της αρχής συμπληρωματικότητας δεσμεύονται εκλεκτικά από ορισμένα μόνο μακρομόρια - στόχους. Το μέγεθος, το σχήμα, η κατανομή φορτίου στο μόριο του φαρμάκου υποδεικνύει ποιες από τις χιλιάδες θέσεις σύνδεσης στα κύτταρα και στους ιστούς, είναι κατάλληλες για αλληλεπίδραση με το πρόσδεμα.

Το μοντέλο "κλειδιού-κλειδαριάς", που προτάθηκε από τον Emil Fischer το 1899, αποτελεί μία χρήσιμη σύλληψη για την εξήγηση της παραπάνω συμβατότητας. Όπως συμβαίνει με τα ένζυμα και τα υποστρώματα τους ή τα

αντισώματα με τα αντίστοιχα αντιγόνα, έτσι το ακριβές ταίριασμα που απαιτείται για το φάρμακο αντιστοιχεί στα χαρακτηριστικά του "κλειδιού", ενώ το άνοιγμα της "κλειδαριάς" αντιστοιχεί στην ενεργοποίηση του υποστρώματος. Ο τρόπος με τον οποίο τίθεται σε λειτουργία η θέση δέσμησης μπορεί να περιγραφεί από το μοντέλο επαγόμενης προσαρμογής, όπως το διατύπωσε ο D.E. Koshland το 1958. Το μακρομόριο υποδοχής προσαρμόζει τη δομή του γύρω από το χημικό διαμεσολαβητή και μεταφράζει τη σύνδεση σε μία αντίδραση, που ικανοποιεί τις φαρμακολογικές επιταγές του προσδέματος.

3.3.1 Σχέσεις δόσης - αποτελέσματος συνεχούς απάντησης

Το πρότυπο του Koshland αποτελεί για ένα υπεραπλουστευμένο μοντέλο σύζευξης φαρμάκου - υποδοχέα, που δεν λαμβάνει υπόψη του αλληλεπιδράσεις με άλλες δομές σήμανσης ή ανίχνευσης στο κυτταρικό περιβάλλον. Επίσης, επιτρέπει την εξαγωγή μίας ποσοτικής σχέσης ανάμεσα στη συγκέντρωση του φαρμάκου και το ποσοστό κατάληψης των υποδοχέων χωρίς μεγάλη δυσκολία. Έτσι, πειραματικά αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι με την αύξηση της χορηγούμενης δόσης, η απόκριση του οργανισμού στη δράση του φαρμάκου αυξάνει κατά τρόπο συνεχή και γραμμικό. Η αναλογική αυτή σχέση επεκτείνεται μέχρι του σημείου, όπου οι υποδοχείς υφίστανται κορεσμό και καθιστούν δυνατή τη μέτρηση μίας σταθερής τιμής, που δεν εξαρτάται από μεταβολές στη συγκέντρωση του φαρμάκου.

Δύο είναι οι σημαντικές παράμετροι της φαρμακολογικής δράσης:

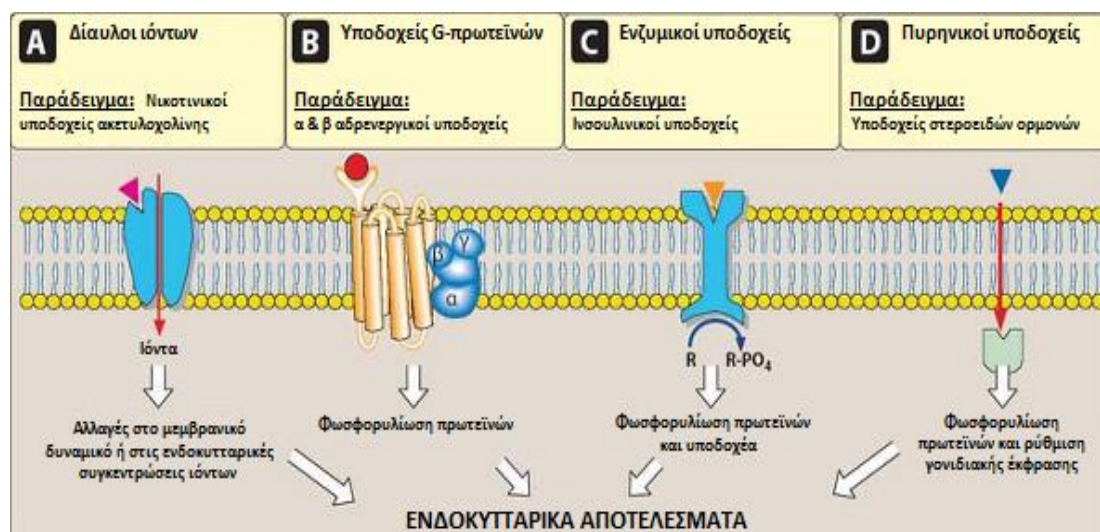
1. **Ισχύς (potency):** Το μέτρο της ποσότητας του φαρμάκου που απαιτείται για να παραχθεί ένα αποτέλεσμα δεδομένης έντασης.
2. **Αποτελεσματικότητα (efficacy):** Το μέγεθος αυτό εξαρτάται από το πλήθος των συμπλεγμάτων φαρμάκου - υποδοχέα καθώς και από τη συσχέτιση της κυτταρικής απόκρισης με την αποδοτικότητα της ενεργοποίησης του υποδοχέα.

Μηχανισμοί μεταγωγής σήματος και φαρμακολογική δράση^{9,17,11}

Υπάρχουν έξι είδη πρωτεϊνικών στόχων στην επιφάνεια μιας κυτταρικής μεμβράνης. Η σύνδεσή τους που μπορούν να συνδεθούν με φάρμακα με αποτέλεσμα τη διαμεμβρανική μεταγωγή σήματος:

- i. Διάλυτοι ιόντων
- ii. Διαμεμβρανικοί υποδοχείς με ενζυμική δραστικότητα
- iii. Υποδοχείς κυτταροκινών
- iv. Υποδοχείς G-πρωτεϊνών και δεύτεροι αγγελιοφόροι
- v. Πυρηνικοί υποδοχείς
- vi. Πρωτεΐνες μεταφοράς

Θα μελετήσουμε ιδιαίτερα τους διαλύτες ιόντων, τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς με ενζυμική δραστικότητα και τις πρωτεΐνες μεταφοράς.



Εικόνα 14: Διαμεμβρανικοί υποδοχείς

➤ Διάλυτοι ιόντων

Τα ελεγχόμενα από το πρόσδεμα κανάλια ιόντων αποτελούν την πιο απλή ίσως κατηγορία μηχανισμών μεταγωγής σήματος, η δράση της οποίας σχετίζεται με την ταχύτατη απόκριση των νευρομυϊκών συνάψεων και των αισθητήρων αφής σε ηλεκτρικά ερεθίσματα. Κάθε μετασυναπτική μεμβράνη ενός διεγέρσιμου κυττάρου διαθέτει ένα σύνολο πρωτεϊνικών υποδοχέων. Οι υποδοχείς αυτοί μοιάζουν με πόρους γεμάτους νερό που επιτρέπουν την ανταλλαγή ιόντων, αυξάνοντας

προσωρινά τη διαπερατότητα της μεμβράνης σε συγκεκριμένα ιόντα. Δύο τύπους ιοντοτρόπων καναλιών μπορούμε να διακρίνουμε:

- τα ελεγχόμενα από το πρόσδεμα (ligand - gated) και
- τα εξαρτώμενα από το δυναμικό (voltage - gated).

Τα πρώτα ορθά κατατάσσονται στους υποδοχείς, καθώς η ενεργοποίησή τους εξαρτάται από την παρουσία ενός ή περισσότερων αγωνιστών στη θέση δέσμευσης. Η δράση τους ξεκινάει από τη στιγμή που κάποιος νευροδιαβιβαστής, όπως για παράδειγμα, η ακετυλοχολίνη, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) ή τα διεγερτικά αμινοξέα ασπαρτικό και γλουταμικό, συνδέεται εξωτερικά με τον υποδοχέα, τροποποιώντας τη δομή του. Σαν αποτέλεσμα, ο κεντρικός υδατικός διάυλος ανοίγει παροδικά και ιόντα (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) διεισδύουν από το εξωκυττάριο υγρό στο εσωτερικό του κυττάρου.

Υπάρχουν, ωστόσο, και ελεγχόμενα από το πρόσδεμα κανάλια της κυτταρικής μεμβράνης που αντιδρούν σε ενδοκυττάρια και όχι σε εξωκυττάρια σήματα, με κυριότερα τα εξής:

- ενεργοποιούμενα από Ca^{2+} κανάλια K^+ , που απαντούν στα περισσότερα κύτταρα και ανοίγουν όταν αυξάνονται τα επίπεδα Ca^{2+} , με συνέπεια την εκπόλωση του κυττάρου
- τα ευαίσθητα στην ATP κανάλια K^+ , που ανοίγουν όταν η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της ATP μειώνεται επειδή το κύτταρο στερείται θρεπτικών ουσιών.

Ο χρόνος που μεσολαβεί ανάμεσα στη σύνδεση του αγωνιστή με τον υποδοχέα και στην απόκριση του κυττάρου ισοδυναμεί με μερικά χιλιοστά του δευτερολέπτου - όσος χρόνος περίπου απαιτείται και για την απενεργοποίηση του υποδοχέα. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα ο μηχανισμός συμβάλλει στη μάθηση και στη μνήμη.

Το δεύτερο είδος διαύλων κινητοποιείται από τις μεταβολές στο διαμεμβρανικό δυναμικό και όχι από την ενεργοποίηση κάποιου προσδέματος. Εδώ κατατάσσονται τα κανάλια Na^+ , K^+ και Ca^{2+} , των οποίων η διάνοιξη είναι πολλές φορές βραχυχρόνια, ακόμα και αν η εκπόλωση συνεχίζεται. Αυτό παρατηρείται, διότι η αρχική ενεργοποίηση ακολουθείται από μία πιο αργή διαδικασία

απενεργοποίησης. Σε αυτούς τους υποδοχείς επενεργούν φάρμακα αρκετών κατηγοριών, μεταξύ των οποίων και τα τοπικά αναισθητικά.

➤ Διαμεμβρανικοί υποδοχείς με ενζυμική δραστικότητα

Η οδός μεταγωγής σήματος που αναλύεται σε αυτή την ενότητα, βασίζεται σε μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη υποδοχέα, της οποίας η ενδοκυτταρική ενζυμική δραστικότητα ρυθμίζεται αλλοστερικά από ένα πρόσδεμα, που συνδέεται με μία θέση στο εξωκυτταρικό τμήμα της πρωτεΐνης. Εδώ ανήκουν οι υποδοχείς της ινσουλίνης και άλλων ορμονών.

Για την περιγραφή του μηχανισμού θα δανειστούμε το παράδειγμα του υποδοχέα τυροσινικής κινάσης: Δύο υδατοδιαλυτά προσδέματα, που λειτουργούν ως συναγωνιστικοί ή μη ανταγωνιστές ή ως ψευδοϋποστρώματα, συνδέονται με δύο υποδοχείς αυτού του είδους από την εξωτερική πλευρά της μεμβράνης. Η αλληλεπίδραση των υποδοχέων με τα προσδέματά τους επάγει την μεταβολή της στερεοχημικής διαμόρφωσης των πρώτων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός διμερούς, την ενεργοποίηση της ενζυμικής μονάδας και τελικά τη διασταυρούμενη φωσφορυλίωση των εν λόγω τμημάτων. Το φωσφορυλιωμένο σύμπλοκο υποδοχέων προσθέτει, με τη σειρά του, φωσφορικές ομάδες σε μόρια στόχους, πεπτιδικά υποστρώματα του ινσουλινικού υποδοχέα, τα οποία στη συνέχεια ενεργοποιούν άλλους σημαντικούς ενδοκυτταρίους διαβιβαστές, όπως η IP3 ή το σύστημα πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από μιτογόνους παράγοντες. Αυτός ο καταρράκτης ενεργοποιήσεων έχει ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό του αρχικού σήματος, ανάλογα με αυτό που συμβαίνει και με τους υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες.

Η διάρκεια των αποκρίσεων στη διέγερση αυτών των υποδοχέων είναι στην τάξη μεγέθους λεπτών έως ωρών. Φάρμακα ειδικά για αυτούς τους υποδοχείς, μετατρέπονται ενζυμικά από την αρχική μορφή τους (προφάρμακο) στην τελική δραστική μορφή τους, με μόνο μειονέκτημα την παράλληλη σύνθεση τοξικών μεταβολιτών. Κορυφαίο παράδειγμα αποτελεί η ακεταμινοφαΐνη (Deron), της οποίας η δράση επιβαρύνει το ήπαρ των ασθενών.

➤ Πρωτεΐνες μεταφοράς

Σε πολλές περιπτώσεις, η υδρόλυση της ATP παρέχει την ενέργεια, που απαιτείται για τη μεταφορά ουσιών αντίθετα προς την ηλεκτροχημική βαθμίδωσή τους. Αυτές οι μεταφορικές πρωτεΐνες μεταφοράς (αντλίες εκροής) διαθέτουν μία ξεχωριστή θέση δέσμησης της ATP και ονομάζονται "μεταφορείς ABC" (ATP - binding cassette: κασέτα δέσμησης της ATP). Η MDR1 (Multi Drug Resistance Protein), γνωστή και ως P γλυκοπρωτεΐνη (Permeability glycoprotein, P-gp), είναι μια μία από τις πρώτες πρωτεΐνες μεταφοράς που μελετήθηκαν και ελέγχει τη βιοδιαθεσιμότητα ενός μεγάλου αριθμού φαρμάκων.

3.4 Αρχές Φαρμακογενωμικής ^{17,11,30}

Η ανταπόκριση σε ορισμένους θεραπευτικούς παράγοντες -όπως τα εμβόλια, τα αντισυλληπτικά χάπια- είναι προβλέψιμη και επιτρέπει την υιοθέτηση τυπικών δοσολογικών σχημάτων. Υπάρχουν όμως και φάρμακα, των οποίων η δόση εξειδικεύεται και η συχνότητα χορήγησής τους ρυθμίζεται βάσει της παρακολούθησης των επιπέδων των φαρμάκων (Π.Ε.Φ) στον ορό του ασθενούς. Η ηλικία, το φύλο, το μέγεθος και η λειτουργία του ήπατος, ο κερκάρδιος ρυθμός, η θερμοκρασία του σώματος, η διατροφή και το περιβάλλον παίζουν σαφώς σημαντικό ρόλο στις φαρμακοκινητικές ιδιότητες μίας ουσίας. Όμως, είναι το γενετικό υπόβαθρο η συνθήκη που θα καθορίσει το αποτέλεσμα της χορηγούμενης στον ασθενή αγωγής.

Ο Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (U.S. Food and Drug Administration - FDA), έχοντας γνώση των καταγεγραμμένων περιστατικών τοξικότητας και αναποτελεσματικότητας φαρμάκων με στενό θεραπευτικό παράθυρο και ασθενών με ιδιαίτερα γενετικά χαρακτηριστικά, έχει δημοσιεύσει έναν πίνακα με περισσότερα από 50 φάρμακα που ενδείκνυνται για φαρμακογενετικό και φαρμακογενωμικό έλεγχο.

Η **φαρμακογενετική** προκύπτει από την ανάγκη ερμηνείας των διακυμάνσεων της βιολογικής απόκρισης απέναντι σε ένα φάρμακο και σε ένα συγκεκριμένο νόσημα. Έχει αποδειχθεί ότι κάθε πληθυσμός διαθέτει το δικό του γενετικό προφίλ. Άρα, φάρμακα αποτελεσματικά σε έναν πληθυσμό μπορεί να εμφανίζουν μειωμένη έως και μηδενική δραστηριότητα σε έναν άλλο. Το πρόβλημα λύνεται με τη μελέτη του

φαρμακολογικού φαινοτύπου κάθε ομάδας ασθενών με κοινά φαρμακογενετικά χαρακτηριστικά.

Η φαρμακογενετική μπορεί να διακριθεί σε δύο κατηγορίες: στην **κλασική ή μεταβολική** και στην **αιτιολογική ή κλινική**. Το πρώτο είδος περιλαμβάνει τις βιολογικές ποικιλότητες που δε σχετίζονται με την ασθένεια, αλλά με τα γονίδια που ελέγχουν τη φαρμακοκινητική και τη φαρμακοδυναμική συμπεριφορά ενός φαρμάκου και γίνονται αντιληπτές μετά τη χορήγηση του φαρμάκου. Στο δεύτερο είδος, ωστόσο, η ίδια η ασθένεια συνδέεται άμεσα με τη βιολογική μεταβλητότητα. Συμβάλλει στην κατανόηση της φύσης του νοσήματος, στην εξατομίκευση της αντιμετώπισης και στην πρόγνυσή του.

Συγγενής όρος της φαρμακογενετικής και αντιθετικό συμπλήρωμά της αποτελεί η **φαρμακογενωμική**. Εδώ πλέον βρισκόμαστε στο πεδίο της έρευνας που ασχολείται με τη δράση μίας ποικιλίας φαρμάκων, έχοντας για φόντο το γονιδίωμα ενός και μόνο οργανισμού. Το ενδιαφέρον στρέφεται στην έκφραση, την επαγωγή ή την καταστολή των γονιδίων, ενώ η εξάλειψη των ανεπιθύμητων ενεργειών (Adverse Drug Reactions - ADR) και η επίτευξη του μέγιστου φαρμακολογικού αποτελέσματος ορίζεται ως τελικός στόχος.

Στατιστικά στοιχεία αποκαλύπτουν ότι οι παρενέργειες των φαρμάκων συνιστούν την τέταρτη συχνότερη αιτία θανάτου στις ΗΠΑ (100.000 νεκροί/έτος).³¹ Επίσης σε ετήσια βάση από το σύνολο των 3,5 δισεκατομμυρίων συνταγογραφήσεων περίπου 3 εκατομμύρια είναι αναποτελεσματικές ή περιέχουν σφάλματα.³² Υπάρχει υποψία από την πλευρά των γιατρών, ότι οι πάσχοντες από κάποιο νόσημα δεν αναφέρουν όλες τις ανεπιθύμητες ενέργειες, που μπορεί να συνδέονται με μία αγωγή. Οι αναφερόμενες παρενέργειες των φαρμάκων κατατάσσονται σε έξι κατηγορίες (A-F) και αποτελούν πολυγονιδιακό και πολυπαραγοντικό φαινόμενο.

ΤΥΠΟΣ ΓΙΑΡΕΝΕΡΓΕΙΑΣ	
ΤΥΠΟΣ Α (augmented)	Σχετίζονται με ημερήσια δόση και επιλύονται με την κατάλληλη ρύθμισή τους.
ΤΥΠΟΣ Β (bizarre)	Σπάνιες, ιδιοσυγκρασιακού τύπου, παρενέργειες
ΤΥΠΟΣ Γ (chronic)	Οφείλονται στη μακροχρόνια λήψη ενός φαρμάκου
ΤΥΠΟΣ Δ (delayed)	Παρατηρούνται σε φάρμακα για χρόνιες παθήσεις
ΤΥΠΟΣ Ε (end)	Παρατηρούνται όταν διακόπτεται η χορήγηση ενός φαρμάκου
ΤΥΠΟΣ Φ (failure)	Αποτυχία αγωγής. Ακολουθεί αλλαγή φαρμάκων

Πίνακας 3: Παρενέργειες φαρμάκων

Οι φαρμακογενωμικές εξετάσεις που διατίθενται σήμερα για κλινική χρήση, είναι οι αναλύσεις ποικιλομορφίας:

- i. των γονιδίων των ανθρώπινων λευκοκυτταρικών αντιγόνων (Human Leukocyte Antigen - HLA), που σχετίζονται με την εκδήλωση ανεπιθύμητων αντιδράσεων σε ασθενείς που λαμβάνουν φάρμακα όπως αμπακαβίρη, αντιεπιληπτικά και κλοζαπίνη.
- ii. των γονιδίων που επηρεάζουν το μεταβολισμό των φαρμάκων όπως η θειοπουρινική S-μεθυλοτρανσφεράση, η (TPMP) διυδροπυριμιδινική αφυδρογονάση (DPYD), τα ισοένζυμα κυτοχρωμάτων CYP (όπως τα CYP2D6 & CYP2C9)
- iii. των γονιδίων που κωδικοποιούν στόχους φαρμάκων όπως ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα HER2, ο αναστολέας τυροσινικής κινάσης, η αναγωγή του εποξειδίου της βιταμίνης K (VKOR), που αποτελεί τον κύριο στόχο της βαρφαρίνης.

Σήμερα οι φαρμακογενωμικές αναλύσεις γίνονται αποσπασματικά και με βραδείς ρυθμούς. Το μεσοπρόθεσμο μέλλον, όμως, επιφυλάσσει την ελπίδα της εξατομικευμένης ιατρικής. Σε μία τέτοια κατάσταση, η προεπιλογή ενός ασφαλούς και αποτελεσματικού φαρμάκου δε θα γίνεται βάσει της μεθόδου "δοκιμής και σφάλματος". Αντιθέτως, θα βασίζεται στη βελτιωμένη αντίληψη του επιστημονικού

κόσμου για το ανθρώπινο γονιδίωμα και στην εισαγωγή απλούστερων μεθόδων για την αναγνώριση των γενετικών διαφορών ανάμεσα στα άτομα.

Πληροφορίες Γενετικής^{14,16}

Ποσοστό υψηλότερο του 98% της γενετικής πληροφορίας των 23 ζευγών χρωμοσωμάτων του ανθρώπινου οργανισμού, δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνες. Το γεγονός αυτό, έρχεται σε πλήρη αντίθεση με το γονιδίωμα ενός προκαρυωτικού οργανισμού που είναι πλήρως αξιοποιήσιμο, χωρίς περιττές αλληλουχίες (Junk DNA). Το μικρό ποσοστό του γενετικού υλικού που περιέχει λειτουργική πληροφορία περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό ζευγών γουανίνης-κυτοσίνης. Μετά τη χρήση ειδικών χρωστικών, οι διαφορές αυτές στην πυκνότητα των χρωμοσωμάτων είναι ορατές ως φωτεινές και σκοτεινές ζώνες. Σήμερα με τη βοήθεια πειραμάτων ανασυνδυασμένου DNA και υβριδοποίησης, γνωρίζουμε ότι οι σκοτεινές περιοχές του DNA είναι πλούσιες σε γονίδια (gene dense centers).

Κάθε γονίδιο αποτελεί τη στοιχειώδη μονάδα της κληρονομικότητας. Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως ο άνθρωπος, εμφανίζονται ως ένα μωσαϊκό παρεμβαλλόμενων κωδικοποιούμενων (*εξόνια* - *exons*) και μη κωδικοποιούμενων (*εσώνια* - *introns*) αλληλουχιών. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των εσωνίων είναι πως μεταγράφονται προς mRNA, όμως, η αντίστοιχη περιοχή αποκόπτεται από το μήνυμα και δε μεταφράζεται τελικά σε πρωτεΐνη.

Η **μετάλλαξη (mutation)** είναι μία μόνιμη αλλαγή στη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός γονιδίου, που προκύπτει αυθόρμητα ως αποτέλεσμα φυσιολογικών κυτταρικών λειτουργιών ή συμπτωματικών περιβαλλοντικών επιδράσεων. Πρόκειται για ένα σπάνιο φαινόμενο που λαμβάνει χώρα κατά την αντιγραφή του DNA σε ποσοστό $\leq 1\%$ και συμβάλλει στη γενετική βιοποικιλότητα των πληθυσμών. Εξαιρεση αποτελεί η περίπτωση των μεταλλάξεων που επάγονται υπό την παρουσία ισχυρών μεταλλαξογόνων παραγόντων. Η ραδιενέργεια, οι ακτίνες X και η υπεριώδης ακτινοβολία, διάφορες χημικές ενώσεις είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα παραγόντων, που αυξάνουν τη συχνότητα των σημειακών μεταλλάξεων (Single Nucleotide Polymorphism - SNP) σε ένα γονίδιο οδηγώντας πιθανώς στην εμφάνιση ενός νέου φαινοτύπου. Λέμε "πιθανώς", διότι ο οργανισμός διαθέτει μηχανισμούς προστασίας απέναντι σε γενετικές αλλοιώσεις.

Υπάρχει ένας SNP ανά 100 - 300 βάσεις στις 3 δισεκατομμύρια βάσεις του ανθρώπινου γονιδιώματος. Τα 2/3 περίπου των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών είναι αντικαταστάσεις κυτοσίνης C από θυμίνη T. Οι υπόλοιποι σχετίζονται με την αφαίρεση (απαλοιφή) ή προσθήκη (ένθεση) ενός νουκλεοτιδίου. Οι ενθέσεις και οι απαλοιφές προκαλούν μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου κατά τη μετάφραση. Μετά από μια ένθεση, για παράδειγμα, το πρώτο νουκλεοτίδιο της επόμενης τριάδας γίνεται το δεύτερο και όλες οι επόμενες βάσεις μετατοπίζονται κατά μία θέση "προς τα δεξιά". Το αποτέλεσμα μπορεί να είναι ανάλογα με τη θέση που εντοπίζονται οι SNP σε κωδικοποιούμενες ή μη κωδικοποιούμενες περιοχές του DNA, η σύνθεση μίας δομικά διαφορετικής και συνεπώς στερεοχημικά διαφορετικής πρωτεΐνης ή ακόμη και η διακοπή της πρωτεϊνοσύνθεσης, αν από το SNP προκύψει κωδικόνιο λήξης. Εάν οι αλλαγές είναι μη λειτουργικές, τότε οι μεταλλάξεις συνήθως σταθεροποιούνται στο γονιδίωμα. Εάν έχουν επιβλαβή δράση, εξαφανίζονται σταδιακά στις επόμενες γενιές λόγω της φυσικής επιλογής. Εάν, τέλος, οι επικρατέστερες πιέσεις της επιλογής στο περιβάλλον είναι ευνοϊκές, με συνέπεια να υπάρχει πλεονέκτημα επιλογής, η συχνότητα του φαινότυπου μπορεί να αυξηθεί στις επόμενες γενιές, αυξάνοντας με τη σειρά της τη γενετική *ποικιλομορφία* του πληθυσμού.

Ανάλυση γονιδίων HLA¹⁷

➤ Αμπακαβίρη και HLAB*5701

Η αμπακαβίρη είναι ένας αναστολέας της ανάστροφης μεταγραφάσης, ιδιαίτερα αποτελεσματικός στην αντιμετώπιση της λοίμωξης HIV. Η χρήση της περιορίζεται από την πρόκληση σοβαρού εξανθήματος, που συνδέεται στενά με το αλληλόμορφο HLAB*5701 του ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου (HLA).

➤ Αντιεπιληπτικά και HLAB*1502

Η καρβαμαζεπίνη μπορεί επίσης να προκαλέσει δερματικές εκδηλώσεις υπερευαισθησίας που συνδέονται με ένα ορισμένο αλληλόμορφο HLA, το HLAB*1502. Οι εκδηλώσεις συνδέονται με ένα ορισμένο αλληλόμορφο HLA, το HLAB*1502, που απαντά μόνο σε άτομα ασιατικής καταγωγής.

Αναλύσεις σχετικές με γονίδια μεταβολισμού των φαρμάκων^{17,30}

➤ Θειοπουρίνες και TPMT:

Οι θειοπουρινικοί αντιμεταβολίτες 6-μερκαπτοπουρίνη (6-MP) και 6-θειογουανίνη (6-TG) αποτελούν πουρινικά ανάλογα, τα οποία προκύπτουν με αντικατάσταση του οξυγόνου στη θέση C-6 της υποξανθίνης ή της γουανίνης, αντίστοιχα, με ένα άτομο θείου. Η θειοπουρινική S-μεθυλοτρανσφεράση (TMPT) και η οξειδάση της ξανθίνης μεταβολίζουν την 6-MP και την 6-TG σε νουκλεοτίδια της θειογουανίνης (TGN), που ενσωματώνονται στο DNA ασθενών με λευχαιμία, με φλεγμονώδη ή αυτοάνοσα νοσήματα ή μεταμοσχευμένων. Ένας στους 300 ασθενείς είναι ομοζυγώτες σε πολυμορφισμούς με μικρή ή μηδενική ενζυμική δραστικότητα της TMPT και πλήττονται από παρενέργειες που σχετίζεται με υψηλές συγκεντρώσεις TGNs. Αντίθετα, άλλοι ασθενείς με υψηλή δραστικότητα TMPT έχουν στο αίμα υποθεραπευτικές συγκεντρώσεις των δραστικών TGN και συνεπώς αναποτελεσματική αγωγή.

➤ 5-Φθοριοουρακίλη (5-FU) και DPYD:

Το αντινεοπλασματικό 5-FU παρουσιάζει μεταβαλλόμενη αποτελεσματικότητα και απρόβλεπτη βλεννοδερματική τοξικότητα. Ποσοστό 3-4% του πληθυσμού φέρει ένα φυσιολογικό και ένα μεταλλαγμένο χαμηλής δραστικότητας αλληλόμορφο για το γονίδιο της διυδροπυριμιδικής αφυδρογονάσης (DPYD), που απομακρύνει από τον οργανισμό τις φθοριοπυριμιδίνες. Επίσης το θεραπευτικό παράθυρο της 5-FU είναι στενό, με αποτέλεσμα την εκδήλωση παρενεργειών που αναγκαστικά προκαλούν τη διακοπή της θεραπείας.

➤ Ταμοξιφαίνη και CYP2D6:

Η ταμοξιφαίνη πρόκειται για ένα αντιστορογόνο, για την φάρμακο αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού. Μεταβολίζεται από το κυτόχρωμα CYP2D6, το οποίο παρουσιάζει αξιοσημείωτη πολυμορφικότητα, προς την ενδοξιφαίνη.

➤ Ιρινοτεκάνη και UGT1A1*28

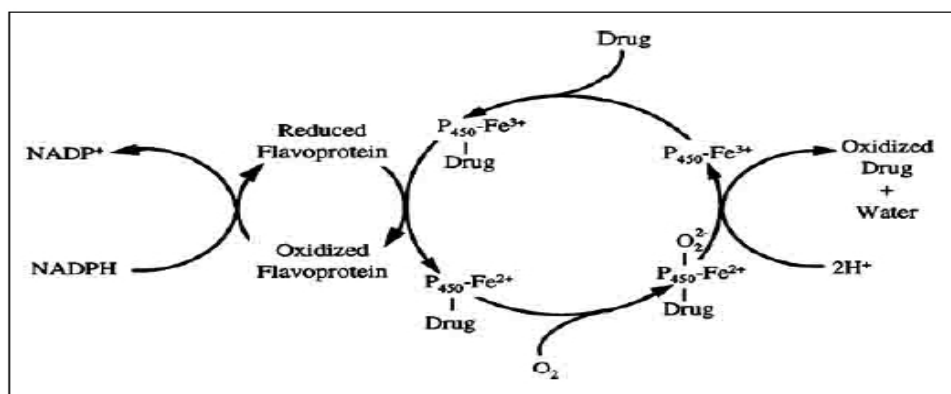
Σε ένα μικρό ποσοστό ογκολογικών ασθενών χορηγείται ιρινοτεκάνη. Ο δραστικός μεταβολίτης του φαρμάκου, ο SN-38 (7-αιθυλ-10-υδροξυκαμπτοθεσίνη), σχηματίζεται

με γλυκουρονίδωση από τη UDP-γλυκουρονυλοτρανσφεράση (UGT), η δραστικότητα της οποίας, μπορεί να διαφέρει μέχρι και 17 φορές μεταξύ των ασθενών, με αποτέλεσμα μεγάλες διαφορές του φαρμακολογικού αποτελέσματος.

3.4.1 Κυτόχρωμα P450

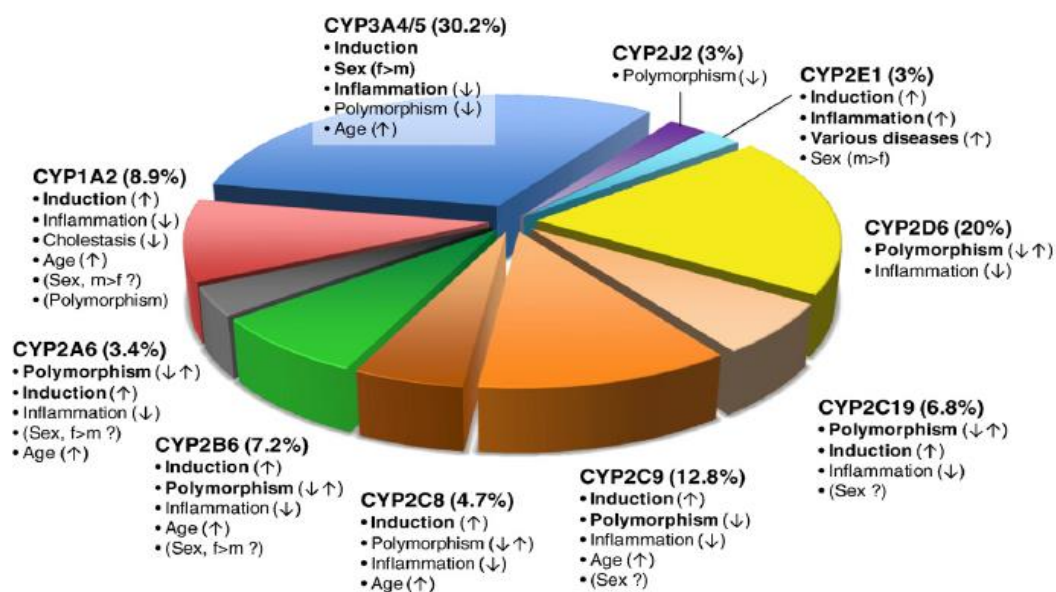
Τα κυτοχρώματα ανήκουν στην υπεροικογένεια των ενζύμων, που καλούνται μονοξυγενάσες και ο ρόλος τους είναι να ενεργοποιούν το μοριακό οξυγόνο (O_2) ώστε να πραγματοποιηθούν οι αντιδράσεις οξείδωσης, που συμβαίνουν κατά το μεταβολισμό.¹⁴ Αποτελούν σημεία κλειδιά στη φαρμακολογία, διότι με τη δράση τους εξηγούν το διαφορετικό ρυθμό μεταβολισμού ενός φαρμάκου μεταξύ διαφορετικών ατόμων και τα ποικίλα αποτελέσματα, που προκύπτουν με τη χορήγησή του. Αν και υπάρχουν και άλλα ένζυμα που επιτελούν τις λειτουργίες των κυτοχρωμάτων, τα τελευταία είναι τα μοναδικά που παρέχουν πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις των χορηγούμενων φαρμάκων κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού.³³

Το κυτόχρωμα P450 είναι μια ομάδα πρωτεϊνών, που αποτελεί έκφραση της υπεροικογένειας των κυτοχρωμάτων και είναι ο χαρακτηριστικότερος εκπρόσωπος της ενζυμικής φάσης I του μεταβολισμού των φαρμάκων, καθώς έχει βρεθεί ότι το 50% των φαρμάκων μεταβολίζεται από αυτό. Δομικά, το κυτόχρωμα P450 είναι μια αιμοπρωτεΐνη, συνδεδεμένη στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου των κυττάρων του ήπατος και του λεπτού εντέρου, και ονομάστηκε έτσι επειδή στην αναχθείσα της μορφή ενώνεται με μονοξείδιο του άνθρακα (CO) και δίνει ένα προϊόν, που στο φάσμα του απορροφά φως στα 450nm.



Εικόνα 15 . Μηχανισμός κυτοχρωμάτων: τα ένζυμα αυτά προσδένουν O_2 και χρησιμοποιούν ένα μόριο οξυγόνου, για να υδροξυλιώσουν τα υποστρώματά τους.

Το κυτόχρωμα P450 κατηγοριοποιείται σε οικογένειες και υπο-οικογένειες βασιζόμενο στην αρχή: " πρωτεΐνες με αλληλουχία αμινοξέων που έχουν <40% ομοιότητα ορίζονται ως οικογένειες, ενώ με <60% κοινή αλληλουχία αμινοξέων ορίζονται ως υπο-οικογένειες". Κάθε οικογένεια ισοενζύμων του κυτοχρώματος P450, έχει ειδικότητα για ένα μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων, ώστε να υπάρχει δυνατότητα μεταβολισμού για τις περισσότερες ενώσεις. Ωστόσο, κάθε οικογένεια έχει διαφορετικό μηχανισμό δράσης και οι παράγοντες που αναστέλλουν ή επάγουν τη λειτουργία τους διαφέρει.³⁴



Εικόνα 16: Τα ισοένζυμα του κυτόχρωματος P450 και η αναλογία των φαρμάκων που μεταβολίζουν.

Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί 55 ισοένζυμα του P450. Παρόλα αυτά, στον άνθρωπο, τα περισσότερα φάρμακα μεταβολίζονται μέσω τριών οικογενειών του κυτοχρώματος P450 (CYP1, CYP2 και CYP3). Τα εν λόγω ισοένζυμα έχουν διαφορετική μοριακή εικόνα, γενετική επίδραση, ειδικότητα, υπόστρωμα και ευαισθησία στην αναστολή ή την επαγωγή τους.

Πολλά από τα ισοένζυμα του κυτοχρώματος P450 παρουσιάζουν γενετικό πολυμορφισμό. Η συχνότητα των πολυμορφισμών διαφέρει ανάλογα με το γενετικό προφίλ των ατόμων, με αποτέλεσμα άλλοι άνθρωποι μπορεί να έχουν μεγάλη δραστηριότητα σε ένα ένζυμο, ενώ άλλοι να εμφανίζουν μειωμένη ή μηδενική δραστηριότητα στο ίδιο ένζυμο. Με αυτό τον τρόπο ο γενετικός πολυμορφισμός εξηγεί, μερικώς, τις διαφορές στο μεταβολισμό των φαρμάκων μεταξύ των ατόμων.

Ανάλογα με τον γονότυπο του κυτοχρώματος P450 οι ασθενείς κατατάσσονται ως προς την δυνατότητα μεταβολισμού των φαρμάκων σε:

- Ταχείς μεταβολιστές (Extensive metabolizers-EM) = 2 φυσικά αντίγραφα
- Ενδιάμεσοι μεταβολιστές (Intermediate metabolizers-IM) = 1 φυσικό + 1 μεταλλαγμένο
- Βραδείς μεταβολιστές (Poor metabolizers-PM) = 2 μεταλλαγμένα αντίγραφα
- Υπερταχείς μεταβολιστές (Ultra-rapid metabolizers-URM) = 3 + φυσικά αντίγραφα

Οι ταχείς μεταβολιστές φέρουν δύο φυσικά αντίγραφα του γονιδίου της ισομορφής του ενζύμου που μεταβολίζει το συγκεκριμένο φάρμακο και αποτελούν το "φυσιολογικό" φαινότυπο που εμφανίζεται στη μεγάλη πλειοψηφία του πληθυσμού. Οι ενδιάμεσοι μεταβολιστές έχουν ένα φυσικό ή λειτουργικά ελαττωματικό αλληλόμορφο, που προκαλεί μειωμένη ικανότητα οξειδωσης των φαρμάκων. Οι βραδείς μεταβολιστές, φέρουν δύο μεταλλαγμένα αλληλόμορφα με αποτέλεσμα να έχουν παντελή έλλειψη λειτουργικότητας. Τέλος οι υπερταχείς μεταβολιστές, με πολλαπλά λειτουργικά αλληλόμορφα έχουν φαινότυπο που προέρχεται από παραλλαγές των φυσιολογικών φαινοτύπων.

Οι κλινικές συνέπειες των πολυμορφισμών πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στο φαρμακολογικό προφίλ κάθε φαρμάκου. Η απώλεια ενός φυσιολογικού αλληλόμορφου (περίπτωση ενδιάμεσων μεταβολιστών), οδηγεί σε μειωμένη κάθαρση και αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα, ενώ η αύξηση των αλληλόμορφων (περίπτωση υπερταχέων μεταβολιστών), οδηγεί σε αυξημένη κάθαρση και χαμηλές συγκεντρώσεις φαρμάκου στο πλάσμα.³⁵

3.4.2 P γλυκοπρωτεΐνη (Permeability glycoprotein, P-gp) ή Πρωτεΐνη πολλαπλής αντίστασης (Multi Drug Resistance Protein, MDR1)^{36,37}

Η MDR1 (Multi Drug Resistance Protein), γνωστή και ως P γλυκοπρωτεΐνη (Permeability glycoprotein, P-gp), είναι μια ATP - εξαρτώμενη πρωτεΐνη μεταφοράς (αντλία εκροής) ξενοβιοτικών με ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος. Η P-gp είναι ένα από τα 49 μέλη της υπεροικογένειας των πρωτεϊνών, που συνδέονται με ATP (ABC, ATP Binding Cassete). Ως υπόστρωμα της MDR1 χρησιμοποιούνται κατιόντα

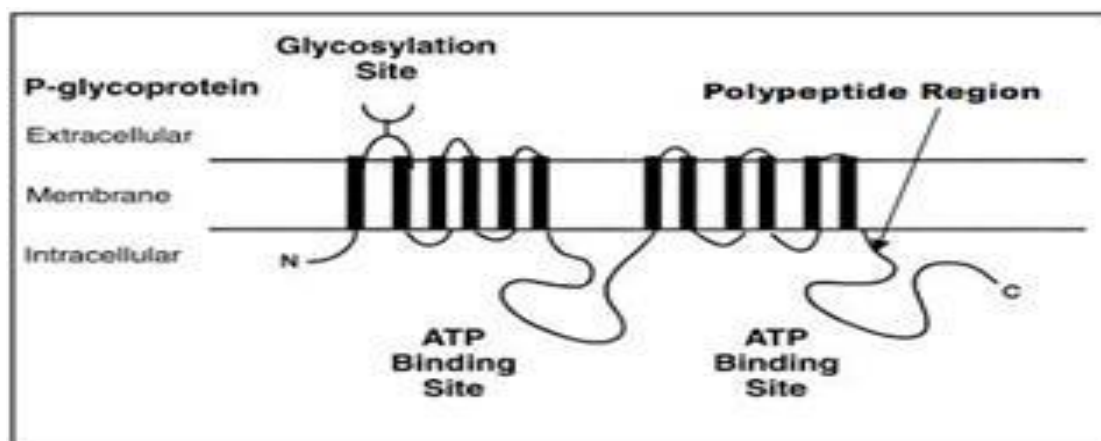
οργανικών οξέων, ασθενείς οργανικές βάσεις με υδρόφοβες περιοχές, πολυπεπτίδια και τα μισά από τα συνήθως συνταγογραφούμενα φάρμακα. Είναι μία από τις πρώτες πρωτεΐνες μεταφοράς που ανακαλύφθηκαν (1970).

Η MDR1 βρίσκεται στη κυτταρική μεμβράνη μιας πληθώρας ιστών υπεύθυνων για την απορρόφηση και την απέκκριση ουσιών από το σώμα και είναι έτσι σε θέση να ελέγχει τη βιοδιαθεσιμότητα ενός μεγάλου αριθμού φαρμάκων. Υπάρχει σε ζώα, μύκητες και βακτήρια. Η MDR1 κωδικοποιείται από το γονίδιο ABCB1 και εκφράζεται με ιστοειδικό τρόπο. Εκφράζεται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα του ήπατος, του λεπτού και του παχέος εντέρου, της νήσιδας, του παγκρέατος, των νεφρών, των επινεφριδίων, των νεφρικών σωληναρίων, στους όρχεις καθώς και στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη υψηλών επιπέδων της πρωτεΐνης MDR1 στον πλακούντα και το ενδομήτριο των εγκύων. Το πρότυπο έκφρασης της MDR1 υποδεικνύει, ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες, η κύρια λειτουργία της είναι η προστασία των ζωτικών οργάνων στα οποία εντοπίζεται από ξενοβιοτικά. Ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα της P-γλυκοπρωτεΐνης εκφράζονται σε ανθεκτικά στην χημειοθεραπεία καρκινικά κύτταρα. Είναι υπεύθυνη για τη μειωμένη συγκέντρωση ενός φαρμάκου σε πολυανθεκτικά κύτταρα, ενώ η ενεργή κυτταρική μεταφορά των αντινεοπλασματικών φαρμάκων οδηγεί τελικά σε πολυανθεκτική αντίσταση σε αυτά τα φάρμακα.

Όπως όλα τα ABC γονίδια, έτσι και το ABCB1 (MDR1) κωδικοποιεί πρωτεΐνες μεταφοράς και διαύλων, που διέρχονται πολλές φορές από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και σχηματίζουν έναν πόρο. Διαθέτει 29 εξώνια σε μία γενωμική περιοχή που εκτείνεται σε μήκος 209.6 Kb και παρέχει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες για τη δημιουργία ενός αγγελιοφόρου RNA (mRNA) με 4872 ζεύγη βάσεων και μίας πρωτεΐνης 1280 αμινοξέων, που είναι γνωστή ως P-γλυκοπρωτεΐνη (P-gp). Το ABCB1 εδράζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 7 και συγκεκριμένα στην περιοχή 21- 21.1.

Η P-gp έχει μοριακό βάρος 170 kDa. Η δευτεροταγής δομή της αποκαλύπτει, ότι η P-gp αποτελείται από δυο όμοια μέρη, καθένα εκ των οποίων έχει έξι υδρόφοβες διαμεμβρανικές περιοχές (TM 1-6 και TM 7-12) και μια περιοχή νουκλεοτιδικής δέσμευσης, ειδική για το ATP. Οι δυο θέσεις πρόσδεσης του ATP είναι δομικά όμοιες. Οι 12 διαμεμβρανικές ελικάσες διατάσσονται σπειροειδώς γύρω από έναν υδάτινο πόρο, με τις δύο νουκλεοτιδικές θέσεις δέσμευσης να κοιτούν προς την

πλευρά του κυτταροπλάσματος. Το εξωτερικό τμήμα του πόρου περιλαμβάνει υδρόφοβα και αρωματικά αμινοξέα, ενώ το αντίστοιχο στο εσωτερικό του περιέχει πολικά, υδρόφιλα αμινοξέα. Η μεταμεταφραστική ρύθμιση της MDR1 περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση και την N-γλυκοζυλίωσή της, οπότε το μόριο παίρνει την τελική μορφή του και αποκτά την επιθυμητή λειτουργικότητα. Έχουν αναγνωρισθεί τρεις θέσεις γλυκοσυλίωσης στο αμινοτελικό άκρο, στον πρώτο εξωκυττάριο βρόγχο. Η περιοχή πρόσδεσης των φαρμάκων απαρτίζεται από τις διαμεμβρανικές περιοχές TM 4, TM 5, TM11 και TM12.



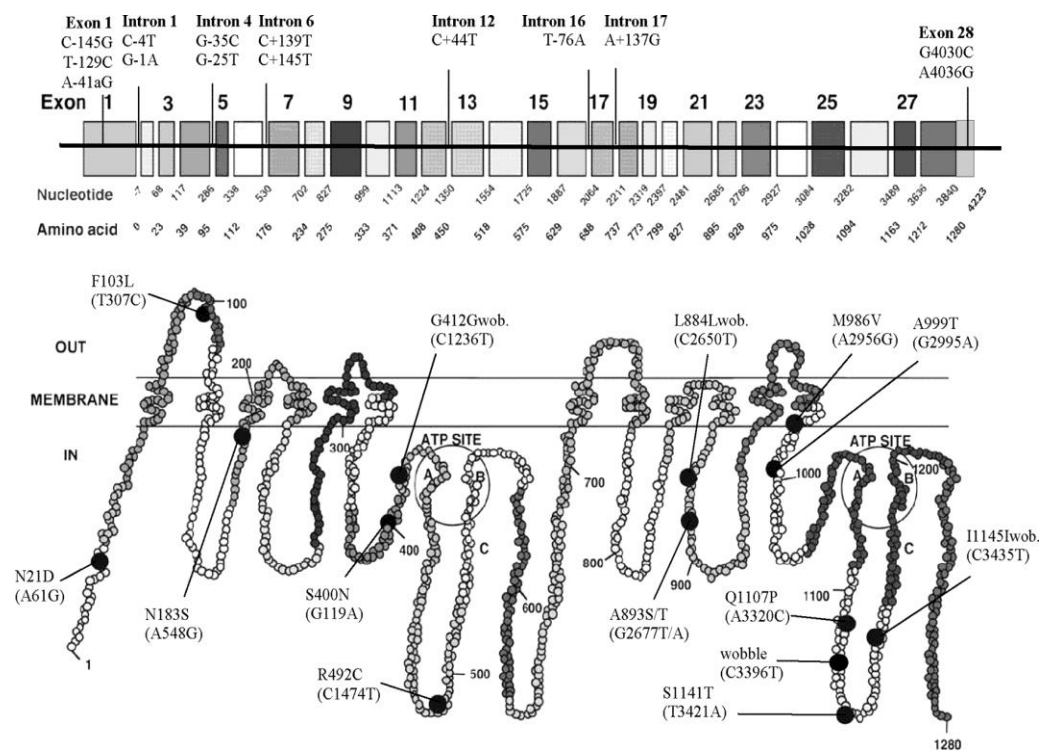
Εικόνα 17: Η δομή της P-gr

Ως εύκαμπτη, πρωτεϊνική δομή, η P-gr διευκολύνει τη σύνδεση μεταξύ υποστρωμάτων, που έχουν προσδεθεί πάνω στις ειδικές θέσεις δέσμευσης (drug binding pocket), και την εκροή τους μέσω παθητικής διάχυσης. Η ενέργεια παρέχεται από τις νουκλεοτιδικές θέσεις δέσμευσης, που λειτουργούν σαν ATPάσες και καταλύουν την υδρόλυση του ATP προς ADP. Το εντυπωσιακό στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι η ικανότητά της, να διακρίνει στερεοϊσομερή και ταυτόχρονα να δεσμεύει πολλά υποστρώματα, το ένα δίπλα στο άλλο.

Οι αναστολείς της P-gr συμπεριλαμβάνουν αντινεοπλασματικά, ενδοτοξίνες, κοβαλαμίνη, ατορβαστατίνη και διαφοροποιούν τη δράση των υποστρωμάτων. Η ριφαμπικίνη και σήματα κυτταρικού stress δημιουργούν αντίσταση σε φάρμακα που μεταφέρονται από την P-gr. Η συγχορήγηση φαρμάκων, που δρουν ως υποστρώματα της P-gr, μπορεί να μεταβάλει τα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά τους. Δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις αλληλεπιδράσεων, που μειώνουν την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια σε φάρμακα με σημαντικά κλινικά

αποτελέσματα, αλλά στενό θεραπευτικό δείκτη, όπως λίγες δεν είναι και οι αναφορές για αλληλεπιδράσεις, που επηρεάζουν θετικά.

Το MDR1 είναι εξαιρετικά πολυμορφικό γονίδιο και έχουν καταγραφεί περισσότερες από 50 SNPs στην κωδικεύουσα περιοχή του γονιδίου MDR1. Βρέθηκαν συνώνυμες και μη συνώνυμες μεταλλάξεις, δεν παρατηρήθηκε όμως κανένας πολυμορφισμός, που να οδήγησε σε κωδικόνιο λήξης και επομένως σε πρόωρο τερματισμό του γονιδιακού προϊόντος. Έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις που επηρεάζουν την αμινοξική ακολουθία και τη στερεοδομή της πρωτεΐνης. Η πλειοψηφία των πολυμορφισμών εντοπίζεται στις ενδοκυττάρειες περιοχές. Σε γενικές γραμμές έχει διατηρηθεί η δομική ακεραιότητα του γονιδίου στη διάρκεια της εξέλιξης. Περιοχές που παίζουν σημαντικό ρόλο για τη λειτουργία της αντλίας, όπως είναι οι περιοχές που είναι υπεύθυνες για την αγκυροβόληση της πρωτεΐνης στην κυτταρική μεμβράνη και της σύνδεσης των φαρμάκων, φαίνεται να έχουν υψηλό βαθμό συντήρησης.



Εικόνα 18: Οι κυριότερες σημειακές μεταλλάξεις (SNPs) της P-gp.

Έχουν εντοπιστεί τουλάχιστον δύο σημειακές μεταλλάξεις (SNPs) G2677T και C3435T, που φαίνεται να επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης της P-gp και την ανταπόκριση σε φάρμακα. Ο πολυμορφισμός που βρίσκεται στην θέση 3435, περίπου στο κέντρο του εξονίου 26 έχει μελετηθεί ιδιαίτερα. Πρόκειται για έναν κοινό

πολυμορφισμό αντικατάστασης μιας θυμίνης από μια κυτοσίνη. Αυτή η αλλαγή δεν έχει κάποια επίπτωση στην αμινοξική ακολουθία, καθώς είναι μια συνώνυμη μετάλλαξη. Εν τούτοις προκαλούνται για ήπιες αλλαγές στην λειτουργία της αντλίας. Οι φορείς του αλληλόμορφου T έχουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης της P γλυκοπρωτεΐνης σε σχέση με τους φορείς του αλληλόμορφου C. Μάλιστα, οι ομοζυγώτες για το T αλληλόμορφο φαίνεται να έχουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης της αντλίας στο εντερικό επιθήλιο και έτσι κινδυνεύουν να εμφανίσουν αυξημένα επίπεδα του φαρμάκου διγοξίνη στο αίμα τους. Αντίθετα, οι ομοζυγώτες για το C αλληλόμορφο του συγκεκριμένου πολυμορφισμού, έχουν συσχετιστεί με υψηλότερες πιθανότητες για πλήρη ύφεση της οξείας μυελοβλαστικής λευχαιμίας καθώς και με μια μορφή επιληψίας που είναι ανθεκτική στην φαρμακευτική αγωγή. Ακόμη ο πολυμορφισμός 2677 έχει κινήσει το ενδιαφέρον των ερευνητών. Ο πολυμορφισμός αυτός βρίσκεται στο εξόνιο 21, οφείλεται στην αντικατάσταση μιας γουανίνης από μια θυμίνη και προκαλεί την αντικατάσταση της αλανίνης στην θέση 893, από μια σερίνη. Η αλλαγή αυτή στην θέση A893 επηρεάζει την δραστικότητα ATPάσης και επηρεάζει τη μεταφορά φαρμάκων.

Κεφάλαιο 4: Παρακολούθηση Επιπέδων Φαρμάκων στο αίμα (Π.Ε.Φ.)

(Therapeutic Drug Monitoring-TDM) ³⁸

4.1 Εισαγωγή

Για να είναι αποτελεσματικό ένα φάρμακο, είναι απαραίτητο να μπορεί να δεσμευθεί στους υποδοχείς των ιστών που προορίζεται να δράσει. Για τα περισσότερα φάρμακα, η ένταση και η διάρκεια του αποτελέσματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του φαρμάκου που βρίσκεται δεσμευμένο στον υποδοχέα. Το φάρμακο, για να φτάσει στο σημείο που βρίσκεται ο υποδοχέας, πρέπει να διανύσει μια πολύπλοκη οδό η οποία αρχίζει από το σημείο εισόδου του στον οργανισμό. Κατά την πορεία του, μέρος του φαρμάκου κατανέμεται στον οργανισμό ή μεταβολίζεται ή απεκκρίνεται οπότε τελικά, μικρή μόνο ποσότητα φθάνει στον υποδοχέα.

Παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο καθώς και η συμμόρφωση του ασθενή στην προτεινόμενη δόση αλλά και άλλοι ιδιοσυστασιακοί παράγοντες (χαρακτηριστικοί για κάθε άτομο) συμβάλλουν, ώστε η ποσότητα του φαρμάκου που φθάνει στον υποδοχέα να είναι διαφορετική από άτομο σε άτομο, ακόμη και όταν η χορηγούμενη δόση είναι η ίδια. Αυτός είναι ο λόγος, που όταν δοθεί η ίδια δόση ενός φαρμάκου σε ένα σύνολο ατόμων και μετρηθεί η συγκέντρωση του φαρμάκου στον ορό, ανευρίσκεται μια μεγάλη ποικιλία τιμών. Αντίθετα όμως, όταν το ίδιο άτομο λαμβάνει συγκεκριμένη δόση φαρμάκου, τότε οι τιμές που ανευρίσκονται στον ορό είναι σχετικά σταθερές, γιατί οι παράγοντες που επηρεάζουν την κατανομή του φαρμάκου είναι λίγο πολύ σταθεροί.²²

Οι παραπάνω λόγοι ήταν εκείνοι που οδήγησαν στην ανάγκη δημιουργίας ενός τρόπου παρακολούθησης της συγκέντρωσης των φαρμάκων στο αίμα, ώστε να ρυθμιστεί η δόση του φαρμάκου για κάθε ασθενή και να εξατομικευθεί η χορηγούμενη αγωγή με σκοπό το βέλτιστο φαρμακολογικό αποτέλεσμα, χωρίς να υπάρχουν παρενέργειες λόγω τοξικότητας.

4.2 Ορισμός

Η **Παρακολούθηση των Επιπέδων Φαρμάκων (Π.Ε.Φ.)** (Therapeutic Drug Monitoring – TDM) αφορά τον προσδιορισμό των επιπέδων θεραπευτικών φαρμάκων σε διάφορα βιολογικά υγρά, με σκοπό την εξατομίκευση της δοσολογίας ούτως ώστε η συγκέντρωση (επίπεδο) του φαρμάκου να διατηρείται εντός ενός συγκεκριμένου εύρους (θεραπευτικού) με τελικό αποτέλεσμα την μεγιστοποίηση της θεραπευτικής και ελαχιστοποίηση της τοξικής δράσης του.

Οι διατομικές διακυμάνσεις στην απόκριση οφείλονται σε διεργασίες, οι οποίες ξεκινούν από τη χορήγηση του φαρμάκου και καταλήγουν στο θεραπευτικό αποτέλεσμα. Αυτές έχουν να κάνουν με μεταβολές στη σχέση μεταξύ:

- της δόσης και της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα (διακυμάνσεις στη φαρμακοκινητική)
- της συγκέντρωσης του φαρμάκου στον υποδοχέα και της δράσης αυτού (διακυμάνσεις στη φαρμακοδυναμική)

Η ρύθμιση του δοσολογικού σχήματος έχει στόχο να διατηρήσει τα επίπεδα του φαρμάκου εντός του θεραπευτικού εύρους. Για τον καθορισμό ή την τροποποίηση του δοσολογικού σχήματος ενός φαρμάκου είναι σημαντική η γνώση τόσο της κλινικής εικόνας του ασθενούς, όσο και των φαρμακοκινητικών παραμέτρων του εν λόγω φαρμάκου. Διάφοροι φυσιολογικοί, παθολογικοί και φαρμακολογικοί παράγοντες συμβάλλουν στη φαρμακοκινητική διακύμανση.³⁹

Οι κυριότερες πηγές φαρμακοκινητικής διακύμανσης είναι οι εξής:

- Συμμόρφωση
- Ηλικία (νεογνά, παιδιά, ηλικιωμένοι)
- Φυσιολογία (φύλο, φυλή, εγκυμοσύνη)
- Τρόπος ζωής (διατροφή, αλκοόλ, κάπνισμα).
- Ασθένεια (ηπατική, νεφρική, καρδιαγγειακή, αναπνευστική, ορμονικές διαταραχές)
- Φαρμακευτικές αλληλεπιδράσεις
- Γενετικό προφίλ

4.3 Κατηγορίες φαρμάκων στις οποίες κρίνεται απαραίτητη η Π.Ε.Φ.

Ένα φάρμακο είναι κατάλληλο για παρακολούθηση των επιπέδων του όταν :

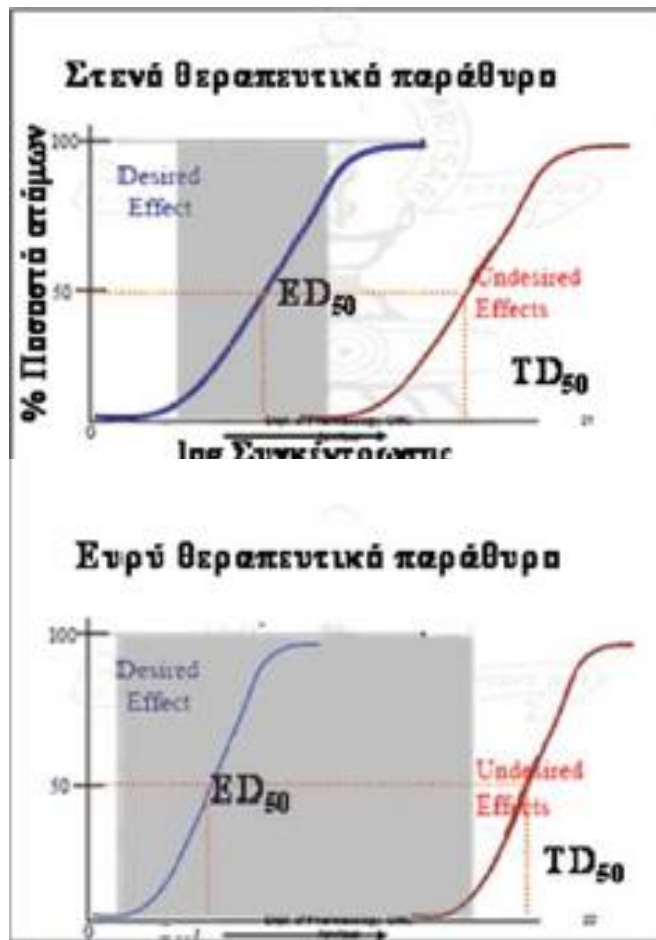
- Είναι γνωστά τα φαρμακοκινητικά δεδομένα του (π.χ. βιοδιαθεσιμότητα, όγκος κατανομής, κ.α.).
- Εμφανίζει υψηλή φαρμακοκινητική διακύμανση (δηλαδή κακή συσχέτιση μεταξύ της δόσης και της συγκέντρωσης του στο πλάσμα).
- Εμφανίζει χαμηλή φαρμακοδυναμική διακύμανση (δηλαδή καλή συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης στο πλάσμα και της απόκρισης).
- Έχει χαμηλό θεραπευτικό δείκτη (στενό θεραπευτικό παράθυρο).
- Υπάρχει δυσκολία διαφοροδιάγνωσης μεταξύ μη θεραπευτικού αποτελέσματος και τοξικότητας.
- Δεν είναι διαθέσιμοι κλινικοί δείκτες του φαρμακευτικού αποτελέσματος.
- Υπάρχουν αξιόπιστες αναλυτικές μέθοδοι μέτρησής του.

Ο προσδιορισμός της σχέσης μεταξύ επιθυμητού και ανεπιθύμητου φαρμακευτικού αποτελέσματος δίνεται από 2 δείκτες: τον θεραπευτικό δείκτη και τον κλινικό θεραπευτικό δείκτη.

Ο **θεραπευτικός δείκτης** είναι ο λόγος της τοξικής δόσης προς την θεραπευτική δόση: TD_{50}/ED_{50} . Ο όρος ED_{50} (Effective Dose) εκφράζει τη δόση του φαρμάκου, που απαιτείται για συγκεκριμένη δράση στο 50% των ατόμων στα οποία χορηγήθηκε. Ο όρος TD_{50} (Toxic Dose) εκφράζει τη δόση του φαρμάκου, που προκαλεί τοξικότητα στο 50% των πειραματοζώων στα οποία χορηγήθηκε. Όσο αυξάνει ο θεραπευτικός δείκτης, δηλαδή μεγαλώνει η απόσταση μεταξύ TD_{50} και ED_{50} , τόσο ασφαλέστερο είναι το φάρμακο.

Ο **κλινικός θεραπευτικός δείκτης ή σχετικός δείκτης ασφάλειας** (TD_1/ED_{99}) είναι ο λόγος της τοξικής δόσης για ένα θεραπευόμενο (TD_1) προς την θεραπευτική για 99 άτομα (ED_{99}). Όσο μεγαλύτερος ο δείκτης ασφάλειας τόσο περισσότερο μπορεί να αυξηθεί η θεραπευτική δόση χωρίς εμφάνιση τοξικότητας.

Το **θεραπευτικό παράθυρο** εκφράζει το εύρος μεταξύ 2 ορίων: της ελάχιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης και της μέγιστης ασφαλούς αποτελεσματικής συγκέντρωσης.



Εικόνα 19: Σχέση δόσης/αποτελέσματος - θεραπευτικό παράθυρο

4.4 Προϋποθέσεις για να εφαρμοσθεί η Π.Ε.Φ.

Για να είναι δυνατή και αξιόπιστη η παρακολούθηση των επιπέδων ενός φαρμάκου, δηλαδή για να μπορούν να συσχετισθούν τα επίπεδα του φαρμάκου με την απόκριση, πρέπει να ισχύουν οι παρακάτω προϋποθέσεις:

α) Η συγκέντρωση του φαρμάκου μετράται σε συνθήκες σταθερής κατάστασης ισορροπίας (steady state), όπου η συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου στον υποδοχέα του να είναι ανάλογη και να αντανακλά τη συγκέντρωση του στο πλάσμα. Όταν ένα φάρμακο χορηγείται σε συγκεκριμένη δόση ανά τακτά χρονικά διαστήματα, η συγκέντρωσή του αυξάνει, μέχρι να επιτευχθεί σταθερή κατάσταση ισορροπίας. Στην σταθερή κατάσταση ισορροπίας, η ταχύτητα απομάκρυνσης του φαρμάκου

ισούται με την ταχύτητα χορήγησης του, με αποτέλεσμα η μέση συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα να παραμένει πρακτικά σταθερή.

β) Η φαρμακολογική απόκριση πρέπει να είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ελεύθερου φαρμάκου στον υποδοχέα του (σχέση δόσης-αποτελέσματος). Σε περιπτώσεις υψηλής φαρμακοδυναμικής διακύμανσης, δηλαδή όταν δε μπορεί να συσχετιστεί η συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου στον υποδοχέα του με την φαρμακολογική απόκριση, η αξιοπιστία και χρησιμότητα της Π.Ε.Φ. περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό.

γ) Ο βαθμός σύνδεσης του φαρμάκου τόσο με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, όσο και με τους ιστούς, να παραμένει σχετικά σταθερός. Το κλάσμα του ελεύθερου φαρμάκου βρίσκεται σε ισορροπία με το δεσμευμένο, έτσι ώστε μεταβολές της συγκέντρωσης του συνδεδεμένου με πρωτεΐνες φαρμάκου, θα έχουν ως αποτέλεσμα και μεταβολές στο κλάσμα του ελεύθερου φαρμάκου. Αυτό είναι πολύ σημαντικό σε περίπτωση π.χ. μεταβολής της συγκέντρωσης της αλβουμίνης στο πλάσμα (υποαλβουμιναιμία), όπου αλλάζει το κλάσμα του ελεύθερου φαρμάκου και κατά συνέπεια η φαρμακολογική απόκριση.

4.5 Χρησιμότητα παρακολούθησης των επιπέδων φαρμάκων

Η Π.Ε.Φ. είναι χρήσιμη στις ακόλουθες περιπτώσεις:

1. Εκτίμηση συμμόρφωσης: Όταν ο ασθενής δεν παίρνει το φάρμακο του (παντελής έλλειψη συμμόρφωσης), μπορεί εύκολα να ανιχνευθεί με τιμή επιπέδου ίσον με μηδέν. Σε περιπτώσεις όμως κυμαινόμενης (ευκαιριακής) συμμόρφωσης δεν μπορεί να ανιχνευθεί εύκολα και μάλιστα, απροσδόκητα χαμηλά επίπεδα δεν οφείλονται αναγκαστικά σε μη συμμόρφωση.

2. Εξατομίκευση της θεραπείας με σκοπό την επίτευξη θεραπευτικού εύρους:

- Όταν η σχέση δόσης-απόκρισης είναι μη ενδεικτική (δηλαδή όταν η δόση δεν μπορεί να συσχετισθεί με την απόκριση).
- Όταν μεταβολές στην κατάσταση της υγείας δύνανται να αλλάξουν την σχέση δόσης-απόκρισης (π.χ. μεταβολές στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους λόγω νεφρικής ή ηπατικής δυσλειτουργίας).

- Όταν η συγχορήγηση άλλων φαρμάκων επηρεάζει την σχέση δόσης-συγκέντρωσης στο αίμα (π.χ. με πρόκληση επαγωγής ή αναστολής των ενζύμων μεταβολισμού φαρμάκων).
- Σε ειδικές συνθήκες όπως εγκυμοσύνη, νεογνά, κλπ

3. Διάγνωση υπερδοσολογίας ή τοξικότητας

4. Προσδιορισμός προέλευσης των συμπτωμάτων του ασθενούς. Δηλαδή υποδηλώνει αν τα συμπτώματα του ασθενούς προέρχονται από την ασθένεια του ή αν αποτελούν παρενέργειες του φαρμάκου, προσφέροντας έτσι προστασία ενάντια τοξικών ενεργειών.

5. Περιορισμός της χρήσης ακριβών φαρμάκων δαπανών στα Νοσηλευτικά Ιδρύματα.²⁸

4.6 Φάρμακα μη κατάλληλα για την παρακολούθηση επιπέδων

Ένα φάρμακο είναι ακατάλληλο για Π.Ε.Φ. όταν:

- Το θεραπευτικό αποτέλεσμα είναι μετρήσιμο
- Έχει ευρύ θεραπευτικό παράθυρο
- Εμφανίζει κακή συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης στο πλάσμα και της φαρμακολογικής απόκρισης. Για να είναι δυνατή η συσχέτιση μεταξύ συγκέντρωσης και απόκρισης, πρέπει η ένταση και η διάρκεια της φαρμακοδυναμικής απόκρισης στο φάρμακο να σχετίζονται με την συγκέντρωση του στον υποδοχέα του. Αυτό όμως είναι μόνον δυνατό, όταν το φάρμακο επιδεικνύει αντιστρεπτή αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα του.

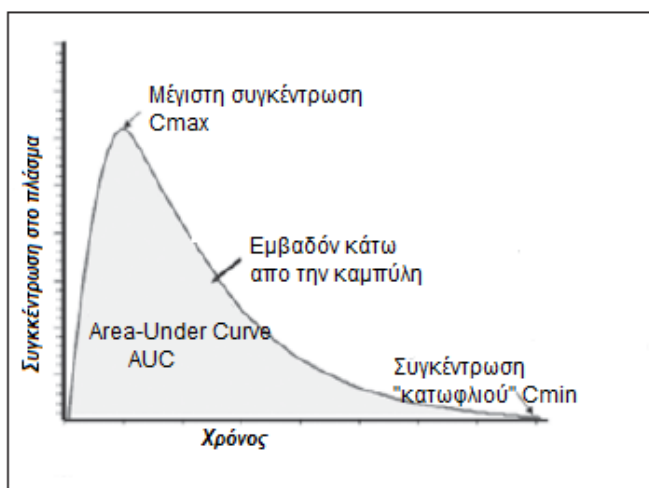
4.7 Σημεία προσοχής στις συνθήκες συλλογής και προσδιορισμού δειγμάτων για Π.Ε.Φ.

Το κατάλληλο δείγμα είναι η βασική παράμετρος για την αποτελεσματικότητα της Π.Ε.Φ. Συνήθως χρησιμοποιούνται δείγματα από ορό ή πλάσμα, αν και για τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα χρησιμοποιείται το ολικό αίμα, γιατί έχει αποδειχθεί, ότι τα εν λόγω φάρμακα προσδένονται στις πρωτεΐνες των ερυθροκυττάρων.

Η ώρα της αιμοληψίας είναι μια εξίσου σημαντική παράμετρος. Το προς μέτρηση φάρμακο πρέπει να βρίσκεται σε συνθήκες σταθερής κατάστασης ισορροπίας (εκτός της περίπτωσης που διερευνάται η περίπτωση τοξικότητας). Επιπλέον, η αιμοληψία θα πρέπει να γίνεται μετά την απορρόφηση και κατανομή του φαρμάκου στους ιστούς.

Τα επίπεδα φαρμάκων, τα οποία κυρίως χρησιμοποιούνται στην TDM, είναι τα επίπεδα "κατωφλίου" (C_{min} , trough concentration). Τα επίπεδα "κατωφλίου" αντιπροσωπεύουν την πιο χαμηλή συγκέντρωση του φαρμάκου στην κυκλοφορία κατά το διάστημα μεταξύ δύο δόσεων. Επομένως τα δείγματα "κατωφλίου" πρέπει να συλλέγονται λίγο πριν την χορήγηση της επόμενης δόσης.

Για ορισμένα φάρμακα η απόκριση συσχετίζεται καλύτερα με την συνολική έκθεση του ασθενούς στο φάρμακο (Area Under Curve–AUC). Η συνολική έκθεση του ασθενούς στο φάρμακο κατά το διάστημα μεταξύ 2 δόσεων, δίνεται από το εμβαδόν της καμπύλης που προκύπτει από την μεταβολή της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα συναρτήσει του χρόνου. Στο διάστημα αυτό η μεταβολή της συγκέντρωσης ορίζεται από την μέγιστη τιμή της (C_{max}) και από τα επίπεδα "κατωφλίου" (C_{min})



Εικόνα 20: Καμπύλη μεταβολής της συγκέντρωσης φαρμάκου στο πλάσμα συναρτήσει του χρόνου

Για τα φάρμακα εκείνα για τα οποία η απόκριση συσχετίζεται καλύτερα με την AUC, θα πρέπει να συλλέγονται τουλάχιστον δύο δείγματα: "κατωφλίου" (C_{min}) και μέγιστης στάθμης (C_{max} –peak concentration). Ο χρόνος δειγματοληψίας που αντιστοιχεί στην C_{max} είναι πιο δύσκολο να προσδιορισθεί, διότι εξαρτάται από

πολλούς παράγοντες, όπως η οδός χορήγησης του φαρμάκου, η φαρμακοκινητική του, η λήψη τροφής, η παθολογία του ασθενούς. Γενικά, για φάρμακα χορηγούμενα από το στόμα η C_{max} παρατηρείται 2–4 ώρες μετά την λήψη του φαρμάκου, 15–30min μετά από ενδοφλέβια χορήγηση και περίπου 1 ώρα μετά από ενδομυϊκή.

4.8 Πληροφορίες απαραίτητες για την ερμηνεία της Π.Ε.Φ.

Πληροφορίες που απαιτούνται για τη σωστή ερμηνεία της Π.Ε.Φ. είναι:

- Η γνώση της κατανομής του φαρμάκου
- Ο χρόνος δειγματοληψίας σε σχέση με την τελευταία δόση
- Το δοσολογικό σχήμα
- Η ηλικία και το φύλο του ασθενούς
- Η συγχορήγηση άλλων φαρμάκων - Αλληλεπιδράσεις των φαρμάκων
- Ηπατική ή νεφρική δυσλειτουργία
- Έλλειψη αποτελεσματικότητας, έλεγχος ρουτίνας, υποψία για τοξικότητα.

Υπάρχουν δύο σημαντικοί παράγοντες οι οποίοι δυσχεραίνουν την ερμηνεία της Π.Ε.Φ. Αυτοί είναι οι αλλαγές στην πρωτεϊνική σύνδεση και οι ενεργοί μεταβολίτες.

Σε κάθε περίπτωση, η δυσκολία στην Π.Ε.Φ. έγκειται στην κρίση του κλινικού γιατρού αφού πάρει τα αποτελέσματα ενός ασθενή για να τα αξιολογήσει. Όπως έγραψαν οι Koch-Weser σε πρόσφατη δημοσίευσή τους: "Οι αποφάσεις που αφορούν τη θεραπεία δε πρέπει να βασίζονται αποκλειστικά στη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα". Η θεμελιώδης αρχή που συχνά επαναλαμβάνεται αλλά λησμονείται, είναι να θεραπεύεται ο ασθενής και όχι η συγκέντρωση του φαρμάκου.⁴⁰

Κεφάλαιο 5: Αρχές Μεθόδων – Αυτόματοι Αναλυτές

5.1 Ανοσοπροσδιορισμοί (immunoassays) ^{41,42}

Οι ανοσοπροσδιορισμοί είναι αναλυτικές τεχνικές, που χρησιμοποιούν αντισώματα ως εκλεκτικά αντιδραστήρια για τον προσδιορισμό ουσιών, που δεσμεύονται από αυτά. Πιο συγκεκριμένα, οι ανοσοπροσδιορισμοί εκμεταλλεύονται την υψηλή συγγένεια και την ειδικότητα ενός αντισώματος για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο, με σκοπό να προσδιοριστεί μια ουσία (αναλύτης).

Τα μεγάλα πλεονεκτήματα των ανοσοπροσδιορισμών είναι η εξαιρετική ευαισθησία και εξειδίκευση. Τα χαρακτηριστικά αυτά έχουν ιδιαίτερη σημασία για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων (ορός αίματος, πλάσμα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ούρα, πτύελα, σίελος, κλπ), η οποία είναι εξαιρετικά δύσκολη λόγω της πολυπλοκότητας και της περιορισμένης ποσότητας των δειγμάτων, καθώς και λόγω των πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων των προσδιοριζόμενων ουσιών [$\mu\text{g/mL}$ (ppm), ng/mL (ppb)]. Ένας μεγάλος αριθμός πεπτιδικών, θυρεοειδικών και στεροειδών ορμόνων προσδιορίζονται καθημερινά με ανοσοχημικές αναλυτικές τεχνικές, είτε για διαγνωστικούς σκοπούς, είτε για την παρακολούθηση της θεραπευτικής δόσης των ασθενών. Άλλες ουσίες που προσδιορίζονται σήμερα με ανοσοχημικές τεχνικές περιλαμβάνουν φάρμακα, βιταμίνες, ένζυμα, ισοένζυμα, αντιγόνα ιών, καρκινοεμβρυικά αντιγόνα, τοξίνες μικροβίων, ειδικές πρωτεΐνες του ορού, κλπ.

Ορισμοί:

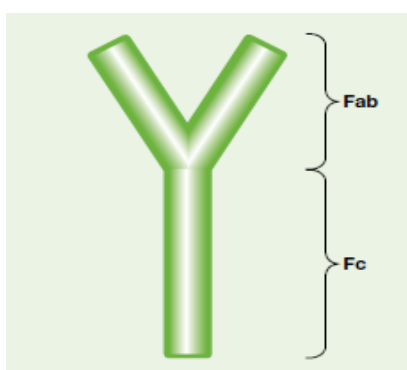
Όπως προαναφέρθηκε, οι ανοσοπροσδιορισμοί βασίζονται στην εξειδικευμένη αντίδραση μεταξύ αντιγόνου (Ag) και αντισώματος (Ab).

Ως **αντιγόνο (antigen)** ορίζεται κάθε ουσία, που έχει τη δυνατότητα να αναγνωριστεί από τα B- ή/και τα T- λεμφοκύτταρα. Ανοσογόνο αντιγόνο ονομάζεται κάθε ουσία, που όταν εισέλθει στον οργανισμό, έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων από τα B- λεμφοκύτταρα και να αντιδράσει στη συνέχεια με αυτά. Στην περίπτωση αυτή, η αντιγονικότητα μιας ουσίας, δηλαδή η ικανότητα αντίδρασής της με το ειδικό αντίσωμα, συνδέεται με την ανοσογονικότητά της,

δηλαδή την ικανότητα να προκαλεί παραγωγή αντισωμάτων ή/και ευαισθητοποιημένων λεμφοκυττάρων. Στην ομάδα των αντιγόνων ανήκουν και τα απτένια (haptens), ουσίες μικρού μοριακού βάρους, που δεν είναι ανοσογόνες, αλλά γίνονται όταν προσδεθούν σε μεγάλα μοριακού βάρους ανοσογόνα μόρια, όπως οι πρωτεΐνες.

Επίτοπος ή αντιγονικός καθοριστής (epitope–antigenic determinant) ενός αντιγόνου ονομάζεται το τμήμα-περιοχή του μορίου, που αναγνωρίζει το ειδικό αντίσωμα και κατόπιν συνδέεται με αυτό. Οι επίτοποι βρίσκονται κυρίως στην εξωτερική επιφάνεια του αντιγονικού μορίου. Ένα αντιγόνο μπορεί να έχει πολλούς ίδιους ή διαφορετικούς επαναλαμβανόμενους επίτοπους στην επιφάνειά του. Ο επικρατών επίτοπος είναι εκείνος που διεγείρει ισχυρότερα το ανοσολογικό σύστημα και κατέχει την κύρια θέση στη σύνδεση με το αντίσωμα.

Αντίσωμα (antibody, Ab) ονομάζεται το πρωτεϊνικό μόριο, που παράγεται από τα ώριμα B- λεμφοκύτταρα και έχει την ιδιότητα να αντιδρά εκλεκτικά με το αντιγόνο. Τα αντισώματα είναι γλυκοπρωτεΐνες και βρίσκονται στο κλάσμα των γ-σφαιρινών (στο κλάσμα των πρωτεϊνών του ορού που κατά την ηλεκτροφόρηση κινείται βραδύτερα προς την άνοδο). Τα αντισώματα ονομάζονται και ανοσοσφαιρίνες. Το μόριο της ανοσοσφαιρίνης περιλαμβάνει δύο περιοχές δομών: την σταθερή (Fc) που αποτελείται από δύο βαριές αλυσίδες και την μεταβλητή δομή (Fab) που αποτελείται από δύο ελαφριές αλυσίδες, ένα μέρος της αμινοξικής αλληλουχίας των οποίων μεταβάλλεται.



Fab: Περιλαμβάνει το σημείο σύνδεσης του αντιγόνου, διαφορετικό για κάθε αντίσωμα.
Fc: Δομικό τμήμα του αντισώματος, που είναι κοινό για όλα τα αντισώματα.⁴³

Εικόνα 21: Δομή αντισώματος και λειτουργικά μέρη

Παράτοπος (paratope) είναι το τμήμα της μεταβλητής περιοχής του αντισώματος (Fab), που αναγνωρίζει ειδικά τον επίτοπο του αντιγόνου, που προκάλεσε την παραγωγή του. Το τμήμα αυτό διαμορφώνεται κατάλληλα, έτσι ώστε να συνδέεται τέλεια με την συμπληρωματική δομή της επιφάνειας του αντιγόνου (επίτοπο).

Η παραγωγή αντισωμάτων για χρήση σε ανοσοχημικούς προσδιορισμούς γίνεται είτε με παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων από κατάλληλα ανοσοποιημένα ζώα, είτε με τη μέθοδο μονοκλωνικών αντισωμάτων.

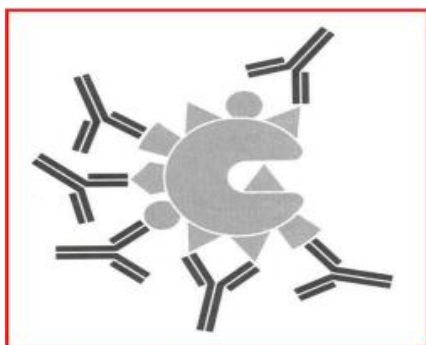
Πολυκλωνικά αντισώματα (polyclonal antibodies):

Τα πολυκλωνικά αντισώματα παράγονται σε ζώα, συνήθως αιγοπρόβατα και κουνέλια. Τα ζώα, όπως και ο άνθρωπος, όταν εκτίθενται σε ένα αντιγόνο, παράγουν αντισώματα από τα Β- λεμφοκύτταρα. Τα Β- λεμφοκύτταρα φέρουν στην κυτταρική τους μεμβράνη μόρια ανοσοσφαιρίνης, όμοια με εκείνα που εκκρίνουν κατά τη διέγερσή τους από το αντιγόνο. Συγκεκριμένα, όταν ένα αντιγόνο εισέρχεται στον οργανισμό, τα μακροφάγα κύτταρα το παραλαμβάνουν, το τροποποιούν και το παρουσιάζουν στα βοηθητικά Τ- λεμφοκύτταρα. Τα βοηθητικά Τ- λεμφοκύτταρα ενεργοποιούν τα Β- λεμφοκύτταρα, τα οποία εκκρίνουν μόρια IgG, όμοια με αυτά που βρίσκονται στην επιφάνειά τους.

Η ανοσοποίηση ενός ζώου για την παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων γίνεται με ένεση του ανοσογόνου σε δόσεις κατά διαστήματα. Η πρώτη χορήγηση του ανοσογόνου προκαλεί την πρωτογενή ανοσολογική απόκριση, κατά την οποία παράγονται μικρά ποσά ανοσοσφαιρινών της τάξης των IgM. Η δεύτερη και οι επόμενες χορηγήσεις του ανοσογόνου προκαλούν τη δευτερογενή απόκριση, όπου παράγονται μεγάλες ποσότητες IgG. Για την παραλαβή των αντισωμάτων από το ανοσοποιημένο ζώο γίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα αιμοληψίες και από το αίμα παραλαμβάνεται ο ορός. Ο ορός αυτός ονομάζεται *αντιορός (antisera)* και περιέχει τα αντισώματα έναντι του αντιγόνου μαζί με μη ειδικές πρωτεΐνες. Ο αντιορός είτε χρησιμοποιείται ως έχει, είτε υπόκειται σε διαδικασία απομόνωσης ειδικών αντισωμάτων από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του ορού. Ο αντιορός περιέχει συνήθως πολλά διαφορετικά αντισώματα, που διαφέρουν μεταξύ τους, τόσο στην εξειδίκευση, όσο και στη σταθερά σύνδεσής τους με το αντιγόνο.

Η ανοσολογική απάντηση ενός οργανισμού στην είσοδο του ανοσογόνου είναι όμως απρόβλεπτη. Διαφορετικοί οργανισμοί ή και ο ίδιος οργανισμός σε κυμαινόμενες

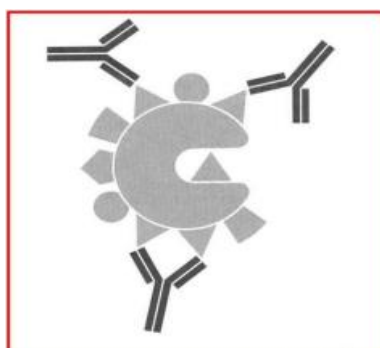
χρονικές στιγμές είναι δυνατόν να παράγουν διαφορετικά μίγματα πολυκλωνικών αντισωμάτων. Επομένως, η παραγωγή μεγάλης ποσότητας ομοιογενούς αντισώματος είναι πρακτικά αδύνατη.



Εικόνα 22: Το πολυκλωνικό αντίσωμα αναγνωρίζει πολλούς και διαφορετικούς επίτοπους.

Μονοκλωνικά αντισώματα (monoclonal antibodies):

Σε αντίθεση με τα πολυκλωνικά αντισώματα, τα μονοκλωνικά αντισώματα χαρακτηρίζονται από απόλυτη ομοιογένεια ως προς τη δομή και την ειδικότητά τους. Παράγονται από μια μόνο κυτταρική σειρά, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία υβριδισμού και τις σειρές μυελωματικών κυττάρων ποντικών. Τα υβριδώματα (ή υβρίδια) είναι καρκινικά κύτταρα, παραγόμενα αντισωματικά, τα οποία στη συνέχεια παράγουν πολλά αντίγραφα του ίδιου αντισώματος και μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στην εργαστηριακή κυτταροκαλλιέργεια.



Εικόνα 23: Το μονοκλωνικό αντίσωμα αναγνωρίζει ένα και μοναδικό επίτοπο.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι διαθέσιμα για μεγάλο χρονικό διάστημα και σε ποικίλες ποσότητες χωρίς διαφοροποίηση στη δραστηρότητά τους και σε αυτό

πλεονεκτούν έναντι των πολυκλωνικών αντισωμάτων. Είναι, επίσης, δυνατόν να επιλεγούν εκείνα τα αντισώματα που παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση και σταθερά σύνδεσης με το αντιγόνο. Μειονέκτημα, ωστόσο, αποτελεί το αυξημένο κόστος παραγωγής τους σε σχέση με το κόστος παραγωγής των πολυκλωνικών αντισωμάτων, καθώς και η κατώτερη απόδοσή τους από αυτή των πολυκλωνικών αντισωμάτων (τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν τη δυνατότητα διάκρισης μόνο μικρού ποσοστού της συνολικής αντιγονικότητας του ανοσογόνου).

Τα αντισώματα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν ως αντιδραστήρια σε ανοσοχημικούς προσδιορισμούς επιλέγονται κυρίως με κριτήρια τη σταθερά σύνδεσής τους με το αντιγόνο και την εξειδίκευσή τους. Η εξειδίκευση του αντισώματος καθορίζεται από την ικανότητά του να αναγνωρίζει την προσδιοριζόμενη ουσία και μόνο αυτήν. Μέτρο της εξειδίκευσης αποτελεί η διασταυρούμενη δραστηριότητα (cross-reactivity) του αντισώματος με ουσίες παρεμφερούς δομής με την προσδιοριζόμενη ουσία.

Αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος:

Η σύνδεση του αντιγόνου με το αντίσωμα γίνεται μέσω μη ομοιοπολικών διαμοριακών δυνάμεων. Οι δυνάμεις αυτές μπορεί να είναι:

- Ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ αντίθετα φορτισμένων ομάδων (κυρίως NH_3^+ και COO^-) της επιφάνειας του αντιγόνου και του αντισώματος. Οι δυνάμεις αυτές επηρεάζονται από τη διηλεκτρική σταθερά του διαλύματος της αντίδρασης.
- Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ομάδων των αμινοξέων του αντιγόνου και του αντισώματος.
- Υδρόφοβοι δεσμοί, που προκύπτουν όταν υδρόφοβες ομάδες κοντά στη θέση δέσμευσης αντιγόνου-αντισώματος έρχονται σε επαφή μεταξύ τους, οπότε απωθούν τα μόρια του νερού και η σύνδεση ισχυροποιείται και σταθεροποιείται.
- Δυνάμεις Van der Waals μεταξύ μη φορτισμένων ομάδων της επιφάνειας του αντιγόνου και του αντισώματος, που έχουν τη δυνατότητα να πολώνονται.

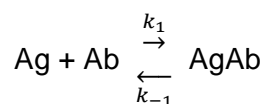
Παρά το γεγονός ότι η σύνδεση μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος επιτυγχάνεται μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών, ο μεγάλος αριθμός τους εξασφαλίζει υψηλή ενέργεια σύνδεσης.

Τρία μεγέθη χαρακτηρίζουν την αντίδραση μεταξύ αντιγόνου-αντισώματος: η συγγένεια, η συνάφεια και η ειδικότητα.

Η **συγγένεια (affinity)** σχετίζεται με την ισχύ του δεσμού μεταξύ ενός παράτοπου του αντισώματος με τον αντίστοιχο αντιγονικό του επίτοπο. Εκφράζεται ποσοτικά από την σταθερά συγγένειας K του ανοσοσυμπλόκου κατά την ισορροπία της ανοσοαντίδρασης: Η ανάπτυξη ενός μαθηματικού μοντέλου για τη μελέτη της αντιστρεπτής αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος απαιτεί τις παρακάτω θεωρήσεις:

- i. Το αντιγόνο είναι μία μόνο χημική ουσία σε ομοιογενή μορφή.
- ii. Το αντίσωμα έχει και αυτό ομοιογενή χημική μορφή.
- iii. Ένα μόριο αντισώματος δεσμεύει ένα μόνο μόριο αντιγόνου.
- iv. Για την αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος ισχύει ο νόμος δράσεως των μαζών και δεν εμφανίζονται αλλοστερικά ή συνεργιστικά φαινόμενα.
- v. Η αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος φτάνει σε ισορροπία.
- vi. Ο διαχωρισμός της ελεύθερης από τη δεσμευμένη μορφή του αντιγόνου είναι πλήρης και δε διαταράσσει τη χημική ισορροπία.
- vii. Ο λόγος του δεσμευμένου προς το ελεύθερο αντιγόνο, καθώς και ο λόγος του δεσμευμένου προς το ολικό αντιγόνο μπορεί να μετρηθεί.

Το αντίσωμα έχει την ιδιότητα να δεσμεύει το αντιγόνο, που προκάλεσε τη δημιουργία του, σχηματίζοντας σταθερό σύμπλοκο. Η αντίδραση συνδέσεως του αντιγόνου (Ag) με το εξειδικευμένο αντίσωμά του (Ab) προς δημιουργία του πολύ σταθερού συμπλόκου ($AgAb$) είναι αμφίδρομη και παρουσιάζεται σχηματικά ως εξής:



όπου Ag είναι το αντιγόνο, Ab το αντίσωμα, $AgAb$ το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος, k_1 η σταθερά ταχύτητας σύνδεσης και k_{-1} η σταθερά ταχύτητας αποσύνδεσης του αντισώματος με το αντιγόνο.

Στην κατάσταση χημικής ισορροπίας, η σταθερά ισορροπίας K , η οποία συμπίπτει με τη σταθερά σύνδεσης του αντισώματος με το αντιγόνο δίνεται από την παρακάτω εξίσωση όπου οι αγκύλες παριστάνουν μοριακές συγκεντρώσεις.

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[AgAb]}{[Ag][Ab]}$$

Η μη ομοιοπολική σύνδεση του αντιγόνου με το αντίσωμα είναι εξαιρετικά εξειδικευμένη και αμφίδρομη με σταθερά ισορροπίας πολύ μεγάλη ($k_1 \gg k_{-1}$).

Η **συνάφεια (avidity)** σχετίζεται με την συνολική ισχύ σύνδεσης $Ab - Ag$ και είναι ευθέως ανάλογη με το πλήθος και την συγγένεια των παράτοπων προς τους επίτοπους.

Η **ειδικότητα (specificity)** εκφράζει την συμπληρωματικότητα της στερεοδομής μεταξύ επιτόπου και παρατόπου και είναι το μέτρο της εκλεκτικότητας με την οποία το αντίσωμα συνδέεται με το αντίστοιχο αντιγόνο του.

5.2 Ταξινόμηση ανοσοπροσδιορισμών

5.2.1 Ανάλογα με την παρουσία ιχνηθέτη

Οι **μη ιχνηθετημένοι** ανοσοπροσδιορισμοί βασίζονται κυρίως σε δευτερογενείς ανοσοαντιδράσεις όπως η κατακρήμνηση και η συγκόλληση σε υγρά μέσα και πηκτώματα π.χ. οι νεφελομετρικοί και θολοσιμετρικοί προσδιορισμοί. Μπορεί να είναι ποιοτικές ή ποσοτικές δοκιμασίες.

Οι **ιχνηθετημένοι** ανοσοπροσδιορισμοί βασίζονται στην πρωτογενή ανοσοαντίδραση αντιγόνου αντισώματος και είναι ποσοτικές δοκιμασίες. Ως ιχνηθέτης χαρακτηρίζεται μία ένωση, η οποία συνδέεται με το αντιγόνο ή το αντίσωμα, έτσι ώστε αυτά να είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα με κάποιο φορέα αναλυτικού σήματος (ραδιοϊσότοπο, ένζυμο, φθορίζουσα ουσία κλπ). Η χρησιμοποίηση ιχνηθετών στους ανοσοπροσδιορισμούς συμβάλλει στη βελτίωση της ευαισθησίας και της επαναληψιμότητας του προσδιορισμού, με την προϋπόθεση ότι τα χαρακτηριστικά του ιχνηθέτη είναι επιλεγμένα και προσδιορισμένα με προσοχή.

Τα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένας ιχνηθέτης είναι τα ακόλουθα:

α) **Ευαισθησία ανίχνευσης:** Η ευαισθησία ανίχνευσης συνεπάγεται την ακριβή μέτρηση του αναλυτικού σήματος του ιχνηθέτη σε μικρές ποσότητες και δεν πρέπει να επηρεάζεται από τη σύνδεση του φορέα του σήματος με το αντιγόνο ή το αντίσωμα.. Όταν ο φορέας αναλυτικού σήματος είναι ένζυμο, τότε η ευαισθησία ανίχνευσης του ιχνηθέτη επηρεάζεται επίσης από τις συνθήκες του ανοσοχημικού προσδιορισμού (θερμοκρασία, pH).

β) **Δραστικότητα:** Η δραστικότητα και η ικανότητα σύνδεσης των αντισωμάτων ή των αντιγόνων που επισημαίνονται πρέπει να μεταβάλλεται όσο το δυνατόν λιγότερο κατά την επισήμανση.

γ) **Μη ειδική δέσμευση (non specific binding - NSB):** Η μη ειδική δέσμευση είναι το σήμα, που δεν οφείλεται στην ειδική αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Ειδικά στους ετερογενείς ανοσοπροσδιορισμούς μη ανταγωνιστικού τύπου, η μη ειδική δέσμευση των επισημασμένων αντιγόνων ή αντισωμάτων συμβάλλει καθοριστικά στη μείωση της ευαισθησίας των προσδιορισμών και πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη.

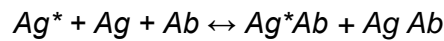
δ) **Σταθερότητα:** Η σταθερότητα των ιχνηθετών κατά τη φύλαξη είναι κρίσιμος παράγοντας για τη διασφάλιση της αναπαραγωγιμότητας και της αξιοπιστίας ενός ανοσοπροσδιορισμού. Είναι αναγκαίο να καθορίζονται τόσο η διάρκεια, όσο και οι συνθήκες φύλαξης κάτω από τις οποίες ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός.

Ανάλογα με την φύση του ιχνηθέτη, οι ανοσοπροσδιορισμοί διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες. Ο ιχνηθέτης μπορεί να είναι ουσία ραδιενεργή ή φθορίζουσα ή χημειοφωταυγής ή ένζυμο συνδυαζόμενο με υπόστρωμα χρωμογόνο, φθορισμογόνο ή χημειοφωταυγειογόνο.

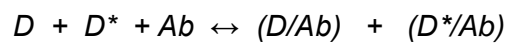
5.2.2 Ανάλογα με τον τύπο της αντίδρασης

Οι **ιχνηθετημένοι** ανοσοπροσδιορισμοί διακρίνονται ανάλογα με τον τύπο της αντίδρασης σε **ανταγωνιστικού** και **μη ανταγωνιστικού** τύπου.

Η παρατήρηση ότι ένα ελαφρά τροποποιημένο με κάποιο φορέα αναλυτικού σήματος (επισημασμένο αντιγόνο, Ag*) αντιγόνο, μπορεί να αντικαταστήσει ανταγωνιστικά το μη επισημασμένο αντιγόνο (Ag) στο σύμπλοκό του με το ειδικό αντίσωμα, ως εξής:



βρήκε αναλυτική εφαρμογή για τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών σε βιολογικά και άλλα δείγματα. Αναπτύχθηκαν έτσι οι **ανταγωνιστικού τύπου ανοσοπροσδιορισμοί (competitive immunoassays)**, οι οποίοι εφαρμόστηκαν σε μεγάλο βαθμό στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης φαρμάκων σε βιολογικά υγρά. Από το πρώτο αντίσωμα που παρασκευάστηκε έναντι της δακτυλίτιδας, σήμερα διαθέτουμε πολύ εξειδικευμένα (ακόμη και μονοκλωνικά) αντισώματα έναντι πολλών θεραπευτικών φαρμάκων. Οι κυριότεροι ανοσοπροσδιορισμοί φαρμάκων βασίζονται στην ακόλουθη αρχή ανταγωνιστικής δέσμησης:

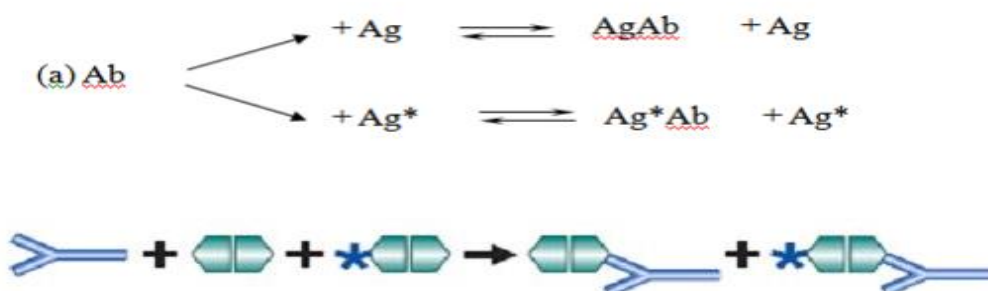


Όπου: D = το φάρμακο στο δείγμα

D^* = φάρμακο επισημασμένο με ιχνηθέτη

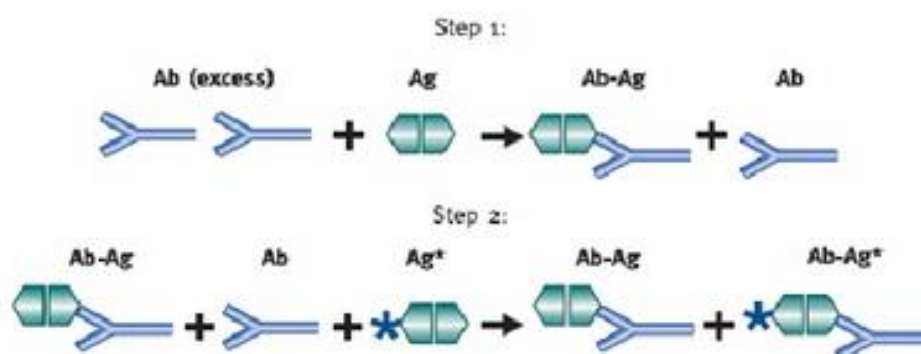
Ab = αντίσωμα ως προς το φάρμακο

Με το ανταγωνιστικό σχήμα ενός σταδίου, το μη επισημασμένο φάρμακο ανταγωνίζεται το επισημασμένο, για την κατάληψη περιορισμένου αριθμού θέσεων σύνδεσης του ειδικού αντισώματος με το φάρμακο. Στην ισορροπία της ανοσολογικής αντίδρασης, το ποσό του επισημασμένου φαρμάκου, είτε στην ελεύθερη είτε στην δεσμευμένη μορφή του, εξαρτάται από την συγκέντρωση του φαρμάκου στο δείγμα, μετράται δε με την χρήση ενός κατάλληλου ανιχνευτή. **(Μέθοδοι περιορισμένου αντιδραστηρίου-ενός σταδίου).**



Εικόνα 24: Ανταγωνιστικός προσδιορισμός ενός σταδίου

Η δυνατότητα της επισήμανσης αντισωμάτων οδήγησε στην ανάπτυξη ανοσοαναλυτικών μεθόδων, στις οποίες το αντίσωμα χρησιμοποιείται σε περίσσεια ως προς το αντιγόνο (φάρμακο). Λόγω ακριβώς της περίσσειας αυτής, ελαττώνεται ο χρόνος επώασης και αυξάνει η ευαισθησία της ανάλυσης. (**Μέθοδοι περίσσειας αντιδραστηρίου-δύο σταδίων**). Με το ανταγωνιστικό σχήμα δύο σταδίων, η συγκέντρωση των αντισωμάτων του διαλύματος της αντίδρασης είναι σε περίσσεια σε σύγκριση με τη συγκέντρωση του αντιγόνου. Τα αντισώματα του αντιδραστηρίου επωάζονται αρχικά με το δείγμα που περιέχει τα αντιγόνα και κατόπιν σε δεύτερη φάση, προστίθεται το επισημασμένο αντιγόνο. Ωστόσο επειδή είναι πιο εύκολη η επισήμανση μικρού μεγέθους μορίων (φαρμάκων), οι μέθοδοι επιλογής στους προσδιορισμούς φαρμάκων είναι κυρίως οι μέθοδοι του περιορισμένου αντιδραστηρίου.

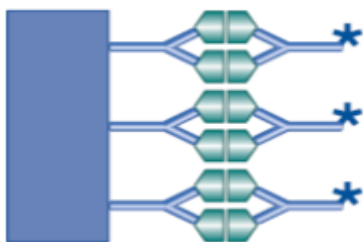
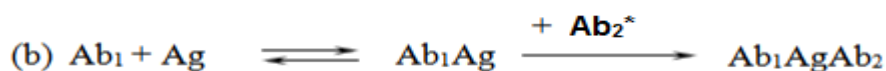


Εικόνα 25: Ανταγωνιστικός προσδιορισμός δύο σταδίων

Να ληφθεί υπόψη, ότι στις ανταγωνιστικές τεχνικές, λιγότερο συνδεδεμένο επισημασμένο αντιγόνο, δείχνει περισσότερο αντιγόνο δείγματος. Επομένως, η ποσότητα (συγκέντρωση) του αντιγόνου (φαρμάκου) στο προς εξέταση δείγμα συσχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με την ποσότητα του επισημασμένου που μετρείται, σύμφωνα με το ανταγωνιστικό σχήμα.

Εκτός από τους ανταγωνιστικούς ανοσοχημικούς προσδιορισμούς, αναπτύχθηκαν και οι **μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοπροσδιορισμοί (non competitive immunoassays)**, οι οποίοι αναφέρονται και ως ανοσοεξέταση "σάντουιτς" επειδή ο αναλύτης είναι συνδεδεμένος με δύο ιδιαίτερως εξειδικευμένα αντισώματα του αντιδραστηρίου. Βασίζονται στην ποσοτική δέσμευση της προσδιοριζόμενης ουσίας (Ag) από αντίσωμα (Ab₁) που βρίσκεται σε περίσσεια ως προς αυτήν. Το σύμπλεγμα AgAb₁ προσδένεται, στη συνέχεια, με επισημασμένο αντίσωμα (Ab₂*), το οποίο

αναγνωρίζει διαφορετικό επίτοπο της προσδιοριζόμενης ουσίας από αυτόν που αναγνωρίζει το Ab₁.



Εικόνα 26: Μη ανταγωνιστικοί προσδιορισμοί

Στους μη ανταγωνιστικούς προσδιορισμούς, η μέτρηση του επισημασμένου αναλύτη, συνήθως αντίσωμα, είναι ευθέως ανάλογη προς την ποσότητα του αντιγόνου στο δείγμα. Κατά συνέπεια, όσο περισσότερο αντιγόνο βρίσκεται στο δείγμα, τόσο περισσότερο επισημασμένο αντίσωμα θα δεσμεύσει.

5.2.3 Ανάλογα με τον τρόπο διαχωρισμού του ιχνηθέτη

Οι **ιχνηθετημένοι** ανοσοπροσδιορισμοί φαρμάκων χωρίζονται επίσης σε δύο βασικές κατηγορίες: **ομογενείς** και **ετερογενείς**. Η διάκριση αυτή βασίζεται στη διαφοροποίηση ή όχι των ιδιοτήτων του ιχνηθέτη στο επισημασμένο φάρμακο, μετά την σύνδεση του με το αντίσωμα.

Έτσι, εάν οι ιδιότητες του ιχνηθέτη δεν διαφοροποιούνται μετά την σύνδεση του επισημασμένου φαρμάκου με το αντίσωμα, τότε χρειάζεται ένα επιπλέον στάδιο, το οποίο να διαχωρίζει την ελεύθερη από την δεσμευμένη μορφή του επισημασμένου φαρμάκου (ετερογενείς ανοσοπροσδιορισμοί). Εάν αντιθέτως, η σύνδεση του επισημασμένου φαρμάκου με το αντίσωμα διαφοροποιεί κατά κάποιο τρόπο τις ιδιότητες του ιχνηθέτη, τότε δεν απαιτείται το επιπλέον στάδιο διαχωρισμού (ομογενείς ανοσοπροσδιορισμοί).

Οι ομογενείς προσδιορισμοί είναι τεχνικά πιο απλοί με μεγαλύτερες δυνατότητες αυτοματοποίησης. Ωστόσο, με την χρήση ετερογενών προσδιορισμών μπορούν να

μετρηθούν χαμηλότερες συγκεντρώσεις φαρμάκων, επειδή απομακρύνονται με το επιπλέον στάδιο καθαρισμού πολλές παρεμβαίνουσες ουσίες. Εντούτοις, για αρκετά θεραπευτικά φάρμακα αυτή η αυξημένη ευαισθησία δεν είναι απαραίτητη, διότι το θεραπευτικό εύρος τιμών τους ευρίσκεται πάνω από το όριο ευαισθησίας των ομογενών προσδιορισμών. Σήμερα δε, με την εξέλιξη της τεχνολογίας οι ομογενείς μέθοδοι τείνουν να επιτύχουν την ευαισθησία των ετερογενών.

5.3 Αξιολόγηση ανοσοπροσδιορισμών

Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά ενός ανοσοπροσδιορισμού, τα οποία καθορίζουν και τη διαγνωστική του αξία, είναι η ευαισθησία και η ανιχνευσιμότητα, η εξειδίκευση, η ακρίβεια και η ορθότητα.

Η **ευαισθησία (*sensitivity*)** ενός ανοσοπροσδιορισμού αναφέρεται στη μεταβολή του αναλυτικού σήματος, σε σχέση με τη μεταβολή της συγκέντρωσης της προς προσδιορισμό ουσίας (κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης). Η ευαισθησία συνδέεται άμεσα με την ανιχνευσιμότητα της μεθόδου, που εκφράζεται με το όριο ανίχνευσης.

Η **εξειδίκευση (*specificity*)** ενός ανοσοπροσδιορισμού αναφέρεται στην ικανότητα του να αποκρίνεται μόνο στην ουσία για την οποία σχεδιάστηκε και να μην επηρεάζεται από την παρουσία άλλων ουσιών στο αναλυόμενο δείγμα. Μέτρο της εξειδίκευσης είναι η διασταυρούμενη δραστικότητα. Οι ουσίες που ελέγχονται για διασταυρούμενη δραστικότητα, μπορεί να υπάρχουν στο προς ανάλυση δείγμα και συνήθως έχουν παρεμφερή χημική δομή με την προσδιοριζόμενη ουσία. Για κάθε ανοσοπροσδιορισμό τα αποδεκτά επίπεδα διασταυρούμενης δραστικότητας καθορίζονται κάθε φορά από τις απαιτήσεις της συγκεκριμένης εφαρμογής και συνδέονται με τις αναμενόμενες τιμές του παρεμποδιστή. Η διασταυρούμενη δραστικότητα εξαρτάται αποκλειστικά από το αντίσωμα της ανάλυσης και την εξειδίκευσή του. Για το λόγο αυτό, αν υπάρχει πρόβλημα διασταυρούμενης δραστικότητας αυτό, συνήθως επιλύεται με τη χρήση ενός άλλου αντισώματος.

Η **ακρίβεια (*precision*)** ενός ανοσοχημικού προσδιορισμού είναι το μέτρο της διασποράς μιας σειράς μετρήσεων από μέτρηση σε μέτρηση και μέσα στην ίδια σειρά μετρήσεων και εκφράζεται με κάποιο στατιστικό μέτρο της διασποράς, π.χ. με την τυπική απόκλιση SD ή με το συντελεστή διακύμανσης CV ($\%CV = [SD / X] \times 100$,

όπου \bar{X} ο μέσος όρος των τιμών). Όροι που σχετίζονται με την ακρίβεια είναι η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα.

Γενικά, η **επαναληψιμότητα (repeatability)** αποτελεί μέτρο της διασποράς ομοειδών μετρήσεων που εκτελούνται στο ίδιο εργαστήριο και από το ίδιο προσωπικό, ενώ η **αναπαραγωγιμότητα (reproducibility)** αποτελεί ανάλογο μέτρο της διασποράς ομοειδών μετρήσεων που έχουν ληφθεί σε διαφορετικά εργαστήρια. Η κακή ακρίβεια μιας μεθόδου είναι το άθροισμα τυχαίων σφαλμάτων, που οφείλονται στην ατομική ιδιοσυγκρασία, στη περιβαλλοντική διακύμανση, στη διακύμανση των αντιδραστηρίων καθώς και στη διακύμανση της βιοχημικής αντίδρασης.

Για να αξιολογηθεί η ακρίβεια ενός ανοσοπροσδιορισμού είναι απαραίτητοι οι πολλαπλοί επαναλαμβανόμενοι προσδιορισμοί ορισμένων ορών ελέγχου, τόσο εντός της ίδιας σειράς αναλύσεων (ενδοαναλυτική διακύμανση, intrassay precision), όσο και μεταξύ επαναλαμβανόμενων αναλύσεων (διαναλυτική διακύμανση, interassay precision). Οι οροί ελέγχου είναι βιολογικά δείγματα γνωστής συγκέντρωσης ως προς την προσδιοριζόμενη ουσία. Η γραφική παράσταση του %CV συναρτήσει της συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ουσίας στους ορούς ελέγχου αποτελεί το **διάγραμμα κατατομής ακρίβειας (precision profile diagram)**.

Η **ορθότητα (accuracy)** ενός ανοσοπροσδιορισμού εκφράζει την εγγύτητα της μετρούμενης τιμής προς την πραγματική και αποδίδεται από το σφάλμα ή τη μέση τιμή των απολύτων τιμών του σφάλματος σε περίπτωση γενικής αξιολόγησης πολλών μετρήσεων σε πολλά δείγματα. Η καλή ορθότητα προϋποθέτει καλή εξειδίκευση, όσο και καλή ακρίβεια. Επομένως η ορθότητα ενός ανοσοπροσδιορισμού επηρεάζεται επίσης από τους παράγοντες εκείνους από τους οποίους εξαρτάται η εξειδίκευση και η ακρίβεια. Πειραματικά, η ορθότητα ενός ανοσοπροσδιορισμού ελέγχεται με τις μελέτες ανάκτησης και παραλληλισμού.

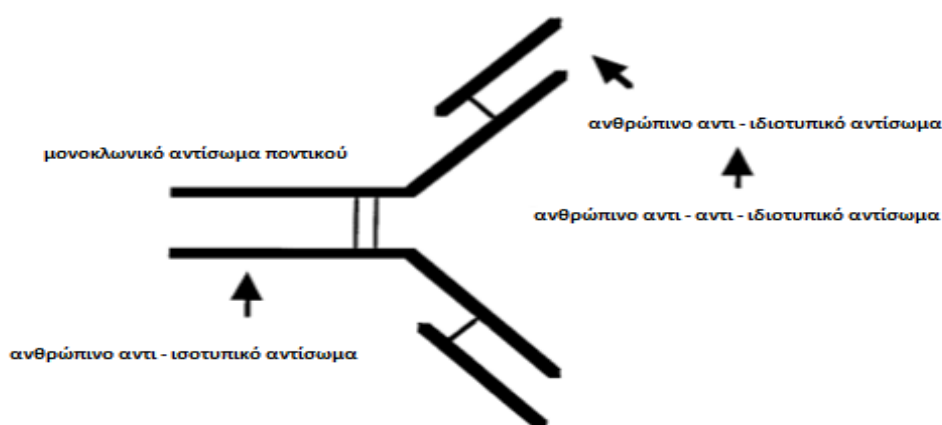
Η μελέτη της ανάκτησης συνίσταται στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ουσίας που μας ενδιαφέρει σε δείγματα ορών πριν και μετά την προσθήκη γνωστών ποσοτήτων της ουσίας αυτής. Η διαφορά στις τιμές των ορών που προσδιορίζονται πριν και μετά την προσθήκη, συσχετίζεται με την προστιθέμενη ποσότητα της προσδιοριζόμενης ουσίας. Η ανάκτηση εκφράζεται ως εκατοστιαίο ποσοστό της προστεθείσας ποσότητας, και οι τιμές δεν πρέπει να αποκλίνουν σημαντικά από το 100 %.

5.4 Ουσίες που παρεμβαίνουν στους ανοσοπροσδιορισμούς

Στους ανοσοπροσδιορισμούς ενός σταδίου υπάρχουν παρεμβαίνουσες ουσίες, με επιπτώσεις τόσο στην ευαισθησία, όσο και στη ειδικότητα της μεθόδου. Οι παρεμποδίσσεις που δημιουργούνται, οφείλονται σε συστατικά, που παρεμποδίζουν τη σύνδεση των αντισωμάτων στα αντιγόνα για ποικίλους λόγους. Δύο από αυτούς είναι τα ανθρώπινα anti-mouse αντισώματα (HAMA) και τα ετεροφυλικά αντισώματα. Αντιθέτως, οι ανοσοπροσδιορισμοί δύο σταδίων παράγουν πιο ακριβή αποτελέσματα, επειδή με το πρόσθετο βήμα έκπλυσης αποδεσμεύονται από τις πρωτεΐνες και τις ενδογενείς παρεμβαίνουσες ουσίες.⁴⁴

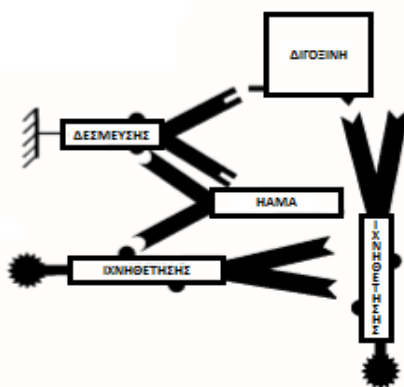
5.4.1 Human anti-mouse Antibodies (HAMA) ⁴⁵

Τα ανθρώπινα αντισώματα κατά της ανοσοσφαιρίνης του επίμουσ (Human Anti - Mouse Antibodies - **HAMA**)⁴⁶ εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στο αίμα ασθενών, που λαμβάνουν μονοκλωνικά αντισώματα για διαγνωστικούς ή θεραπευτικούς σκοπούς. Είναι, δηλαδή, προϊόντα ανοσολογικής απόκρισης, που μερικές φορές προκαλούν αλλεργικές αντιδράσεις ή αντιδράσεις υπερευαισθησίας. Σημασία έχει η παρεμπόδιση που προκαλούν στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς, όπως η ανοσοδιάχυση και η ανοσοφθορισμομετρία. Ακόμη και δοκιμασίες τύπου sandwich, που παραδοσιακά εμφανίζουν τις λιγότερες δυνατές παρεμποδίσσεις, δείχνουν να επηρεάζονται από την παρουσία των HAMA σε δείγματα ορού.

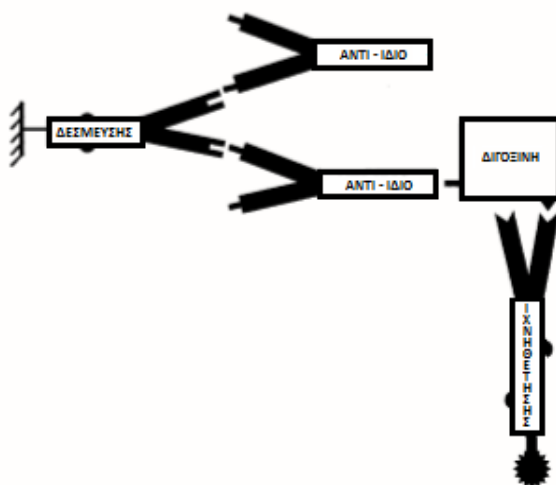


Εικόνα 1: Η δομή ενός μορίου ανοσοσφαιρίνης IgG και η ειδικότητα των HAMA ως προς αυτήν.

Σε επίπεδο δομής, τα HAMA μπορεί να ανήκουν στην τάξη των ανοσοσφαιρινών IgG, IgA, IgM ή πιο σπάνια στην IgE. Διακρίνονται, επίσης, σε αντι-ισοτυπικά, αντι-ιδιοτυπικά και αντι-αντι-ιδιοτυπικά αντισώματα ανάλογα με την κατεύθυνση της απόκρισης και την ειδικότητα που παρουσιάζει για συγκεκριμένους ανοσολογικούς στόχους. Τα αντι-ισοτυπικά αντισώματα έχουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης σε σχέση με τα αντι-ιδιοτυπικά αντισώματα. Ο πρώτος τύπος των HAMA, τα αντι-ισοτυπικά αντισώματα, αναγνωρίζουν το σταθερό τμήμα (Fc) των βαρέων ή ελαφρών αλυσίδων στις ανοσοσφαιρίνες των ποντικών. Αντίθετα, το υπερμεταβλητό τμήμα κάθε βραχίονα, βρίσκεται στη διάθεση αντι-ιδιοτυπικών αντισωμάτων. Τέλος, τα αντι-αντι-ιδιοτυπικά αντισώματα συνδέονται εκλεκτικά με HAMA του δεύτερου τύπου, καθώς και με το αντιγόνο που προκάλεσε την παραγωγή τους.^{47,48}

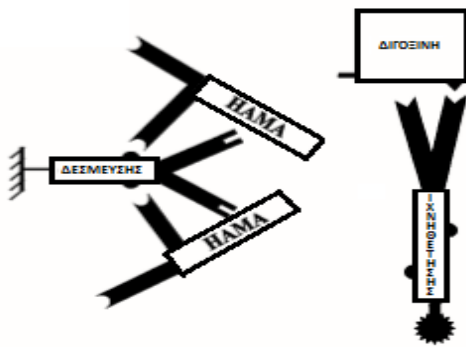


Εικόνα 2: Η γεφύρωση των αντισωμάτων δέσμευσης και σήμανσης από αντι-ισοτυπικά HAMA οδηγεί σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

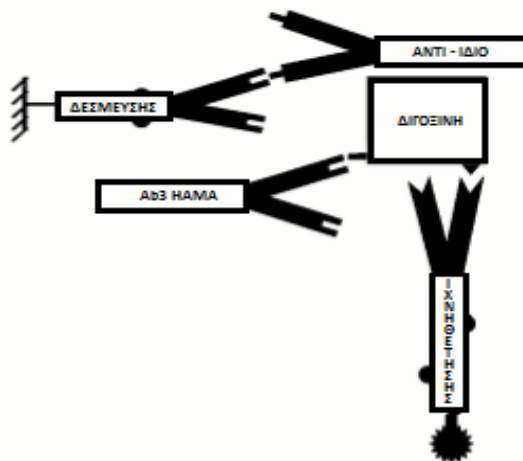


Εικόνα 3: Αντι-ιδιοτυπικά αντισώματα συνδέονται με την υπερμεταβλητή περιοχή του αντιδραστήριου δέσμευσης, μειώνοντας την αποτελεσματικότητά του απέναντι στα θεραπευτικά μονοκλωνικά αντισώματα. Η μέθοδος παρέχει ψευδώς αρνητικές μετρήσεις.

Ψευδώς θετικά αποτελέσματα λαμβάνονται, όταν τα ΗΑΜΑ παρεμβαίνουν στους ανοσοπροσδιορισμούς τύπου sandwich, γεφυρώνοντας τα αντισώματα δέσμησης και ιχνηθέτησης, που είναι εκλεκτικά για τα μονοκλωνικά αντισώματα ποντικών. Από την άλλη πλευρά, ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα προκύπτουν κατά τις αντιδράσεις των ΗΑΜΑ με κάποιο από τα διαγνωστικά αντισώματα. Η στερεοχημική παρεμπόδιση των τελευταίων μειώνει τον αριθμό των διαθέσιμων αντιγόνων-στόχων. Εναλλακτικός τρόπος παρεμπόδισης των ΗΑΜΑ στην ίδια μέθοδο αποτελεί η αναλογία αντι-αντι-ιδιοτυπικών και διαγνωστικών αντισωμάτων, με τα πρώτα να ανταγωνίζονται τα δεύτερα ως προς τη σύνδεση τους με τα αντιγόνα στόχους.^{47,48}



Εικόνα 4: Αντι-ισοτυπική σύνδεση των ΗΑΜΑ με τα αντισώματα δέσμησης. Η στερεοχημική παρεμπόδιση, που προκαλείται, εμποδίζει την αντίδραση του αντισώματος δέσμησης με το σύμπλεγμα αντιγόνου (εδώ διγοξίνη) - ιχνηθετημένου αντισώματος. Έτσι, λαμβάνουμε ψευδώς αρνητικές τιμές.



Εικόνα 5: Αντι-αντι-ιδιοτυπικά ΗΑΜΑ μιμούνται τη δράση των αντισωμάτων δέσμησης οδηγώντας σε ψευδώς αρνητικές μετρήσεις.

Η ποσοτικοποίηση των ΗΑΜΑ είναι προβληματική για δύο κυρίως λόγους: ο πρώτος έγκειται στις διαφορές μεταξύ των μεθόδων, που δεν επιτρέπουν την εξαγωγή συμπερασμάτων από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων τους. Ο δεύτερος εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά των ίδιων των αντισωμάτων, όπως η συγκέντρωση και η χημική συγγένεια τους. Επομένως, μια χαμηλή συγκέντρωση από ΗΑΜΑ υψηλής συγγένειας, μπορεί να δώσει το ίδιο αποτέλεσμα με μια υψηλότερη συγκέντρωση αντισώματος χαμηλής συγγένειας.

Για όλους τους παραπάνω λόγους, η δράση των ΗΑΜΑ είναι αναγκαίο να εξουδετερώνεται πριν από κάθε αναλυτική διαδικασία. Ο πιο άμεσος και εύκολος τρόπος για την απομάκρυνση των ουσιών, που παρεμποδίζουν, περιλαμβάνει τη θέρμανση του δείγματος και έπειτα φυγοκέντρωσή του. Προϋπόθεση, όμως, αποτελεί η θερμική σταθερότητα της ουσίας που θέλουμε να προσδιορίσουμε. Διαφορετικά, τα ΗΑΜΑ μπορούν να εκχυλιστούν από το δείγμα μέσω της σύνδεσής τους με πρωτεΐνη Α ή G, οι οποίες εμφανίζουν υψηλή ειδικότητα για τις ανοσοσφαιρίνες. Η εξουδετέρωση των αντι-ισοτυπικών ΗΑΜΑ μη ειδικής σύνδεσης επιτυγχάνεται με τη χρήση αδρανοποιημένων IgG αντισωμάτων από ποντικούς. Η ποσότητα του αντιδραστηρίου που θα χρησιμοποιηθεί, καθορίζεται από την συγκέντρωση και την εκλεκτικότητα των ΗΑΜΑ.⁴⁷

5.4.2 Ετεροφυλικά αντισώματα ^{43,44}

Ετεροφυλικά αντισώματα παράγονται έναντι των αντιγόνων από άλλα είδη, όπως εκείνα από ζωικά ερυθροκύτταρα ή το ζωικό ορό. Οι ασθενείς μπορούν να εκτεθούν στα ζωικά αντιγόνα με ποικίλους τρόπους, όπως:

- i. μέσω του εμβολιασμού με ένα εμβόλιο βασισμένο σε ζωικό ορό
- ii. με το χειρισμό των ζώων
- iii. με την έκθεσή τους σε αυτά (π.χ. τρίχες)

Τα ετεροφυλικά αντισώματα συναντώνται σε διάφορες ασθένειες, όπως μονονουκλέωση (αντισώματα μη-Eipstein-Barr) και σπανιότερα στη λευχαιμία, μόλυνση από κυτταρομεγαλοϊό, το λέμφωμα Berkitt, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και την ιογενή ηπατίτιδα. Τα ετεροφυλικά αντισώματα μπορούν να παρεμποδίσουν τους ανοσοπροσδιορισμούς με τον ίδιο τρόπο που δρουν τα ΗΑΜΑ, που δεσμευόμενα

στα αντισώματα που χρησιμοποιούνται από τις εξετάσεις προκαλούν είτε ψευδώς θετικά, είτε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Δεν υπάρχει ένας πρακτικός τρόπος πρόβλεψης της παρουσίας αυτών των αντισωμάτων στους ασθενείς, δεδομένου ότι είναι άγνωστο εάν ένα άτομο έχει εκτεθεί στους παράγοντες που δημιουργούν μια ετεροφυλική ανοσοαπάντηση. Επιπλέον, οι μεμονωμένες ανοσοαπαντήσεις ποικίλλουν. Όπως με τα ΗΑΜΑ, οι ανοσοπροσδιορισμοί μπορούν να αποφύγουν, ή τουλάχιστον να ελαχιστοποιήσουν την παρεμπόδιση από τα ετεροφυλικά αντισώματα, είτε με τη χρησιμοποίηση δύο σταδίων (έκπλυση πριν προλάβουν τα ετεροφυλικά αντισώματα να δεσμευθούν στα αντισώματα αντιδραστηρίων), ή με τη προσθήκη των "φραχτών" (blockers), στους οποίους δεσμεύονται τα ετεροφυλικά αντισώματα.

5.5 Αυτοματοποίηση ανοσοπροσδιορισμών ⁴⁹

Σήμερα, με την ανάπτυξη της τεχνολογίας και με την χρήση των αυτόματων αναλυτών, στο εργαστήριο Κλινικής Χημείας, το τμήμα Παρακολούθησης των Επιπέδων Φαρμάκων (Π.Ε.Φ., Therapeutic Drug Monitoring - TDM) είναι σε θέση να προσδιορίζει μία μεγάλη λίστα φαρμάκων σε σχετικά μικρό όγκο δείγματος (5-500 μl ορού κυρίως) με αναλυτικές μεθόδους απλές, γρήγορες, ακριβείς, ευαίσθητες και κυρίως εξειδικευμένες ως προς το ανάλυση φάρμακο. Η αυτοματοποίηση των ιχνηθετημένων ανοσοπροσδιορισμών έδωσε μεγάλη ώθηση στην ανάπτυξη της Π.Ε.Φ. Το 80% περίπου των προσδιορισμών επιπέδων φαρμάκων του τμήματος Παρακολούθησης των Επιπέδων Φαρμάκων ενός εργαστηρίου Κλινικής Χημείας πραγματοποιείται σε αυτόματους ανοσοχημικούς αναλυτές.

5.6 Ανοσοχημικοί αναλυτές τυχαίας προσπέλασης κλειστού τύπου

Οι αναλυτές τυχαίας προσπέλασης (**random access**), σε αντίθεση με τους αναλυτές «φουρνιάς» (**batch**) έχουν την δυνατότητα πραγματοποίησης πολλών διαφορετικών εξετάσεων ανά δείγμα σχεδόν την ίδια χρονική στιγμή. Ο όρος κλειστού τύπου σημαίνει, ότι οι αναλυτές αυτοί δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν άλλα αντιδραστήρια εκτός από αυτά που παράγει η εταιρεία που κατασκευάζει τον αναλυτή.

Το τμήμα Παρακολούθησης των Επιπέδων Φαρμάκων του Βιοχημικού Εργαστηρίου του Ευαγγελισμού διαθέτει δύο ανοσοχημικούς αναλυτές τυχαίας προσπέλασης κλειστού τύπου της εταιρείας Abbott. Παρακάτω περιγράφονται οι δύο αυτοί αναλυτές καθώς και οι μέθοδοι προσδιορισμού της διγοξίνης στον ορό των ασθενών, που εφαρμόζονται σε αυτούς τους αναλυτές:

- AxSYM System – μέθοδος MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay - Μικροσωματιδιακή Ανοσοενζυμική Ανάλυση)
- Architect i2000_{SR} – μέθοδος CMLA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay - Μικροσωματιδιακός Χημιοφωταυγής Ανοσοπροσδιορισμός)

5.7 AxSYM System

Η μέθοδος προσδιορισμού της διγοξίνης στον αναλυτή AxSYM ανήκει στην κατηγορία των ενζυμοανοδοπροσδιορισμών.

Ενζυμοανοδοπροσδιορισμοί:

Στις ανοσοενζυμικές τεχνικές, ο ιχνηθέτης είναι ένζυμο. Τα ένζυμα είναι οι πιο ευαίσθητοι και εύχρηστοι μη ισοτοπικοί δείκτες, καθώς η χρήση τους προσφέρει το πλεονέκτημα της ενίσχυσης σήματος, λόγω της καταλυτικής δράσης επί των υποστρωμάτων τους. Η σύζευξη των αντισωμάτων με τα ένζυμα γίνεται είτε με άμεση σύνδεση αντισώματος-ενζύμου με ομοιοπολικό δεσμό, είτε με έμμεση σύνδεση αντισώματος-ενζύμου, είτε με σύνδεση μέσω γέφυρας βιοτίνης-στρεπταβιδίνης. Ο προσδιορισμός της προς εξέταση ουσίας στο δείγμα βασίζεται στη μέτρηση του προϊόντος της ενζυμικής δράσης, με κατάλληλο ανιχνευτή (κυρίως φωτόμετρο UV-VIS ή φθορισμόμετρο). Ενζυμα που χρησιμοποιούνται σαν δείκτες είναι π.χ. οξειδάση, υπεροξειδάση, αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD), αλκαλική φωσφατάση και άλλα.

Ενζυμα –ιχνηθέτες

Οι ιδιότητες που πρέπει να έχει ένα ένζυμο προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για την επισήμανση αντιγόνων ή αντισωμάτων είναι οι εξής:

- Υψηλή ειδική δραστικότητα, τόσο στην ελεύθερη μορφή του, όσο και συζευγμένο.
- Διαθέσιμες ποσότητες διαλυτού καθαρού ενζύμου σε χαμηλό κόστος και σε αναπαραγώγιμη ποιότητα.
- Μεγάλη σταθερότητα και της ελεύθερης και της συζευγμένης μορφής, τόσο σε συνθήκες φύλαξης, όσο και σε συνθήκες ανάλυσης.
- Παρουσία ομάδων κατάλληλων για ομοιοπολική σύνδεση.
- Απλές και εύκολες μέθοδοι σύζευξης.
- Σταθερά, μη τοξικά και χαμηλού κόστους υποστρώματα, που να σχηματίζουν σταθερά έγχρωμα ή φθορίζοντα προϊόντα.

Το επισημασμένο με ένζυμο αντιγόνο ή αντίσωμα συμμετέχει τόσο στην αντίδραση μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος, όσο και στην ενζυμική αντίδραση παραγωγής αναλυτικού σήματος.

Οι ενζυμοανασολογικοί προσδιορισμοί είναι δυνατόν να είναι ομογενείς ή ετερογενείς. Στους ομογενείς ενζυμοανασολογικούς προσδιορισμούς ανήκουν οι EMIT (Enzyme Multiplied Immunotechnique) και CEDIA (Cloned Enzyme Donor Immunoassay). Στους ετερογενείς ενζυμοανασολογικούς προσδιορισμούς υπάγονται οι τεχνικές ELISA και MEIA. Ως γνωστόν, στο εμπόριο, κυκλοφορούν πολλές τεχνικές ELISA ανταγωνιστικού ή μη τύπου, με επισήμανση στο αντιγόνο ή με επισήμανση στο αντίσωμα. Λόγω όμως της μέτριας δυνατότητας αυτοματοποίησής τους χρησιμοποιούνται ελάχιστα στην Π.Ε.Φ.

Αντιθέτως η MEIA τεχνική (Μικροσωματιδιακή Ανοσοενζυμική Ανάλυση, Microparticle Enzyme Immunoassay) έχει αυτοματοποιηθεί πλήρως στον αναλυτή AxSYM της εταιρείας Abbott.

5.7.1 MEIA (Μικροσωματιδιακή Ανοσοενζυμική Ανάλυση - Microparticle Enzyme Immunoassay) ⁴⁴

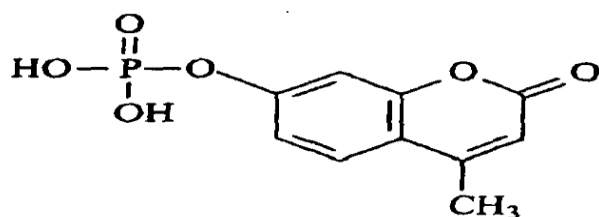
Η μέθοδος μικροσωματιδιακής ανοσοενζυμικής ανάλυσης MEIA ανήκει στους ετερογενείς μη ανταγωνιστικούς ανοσοπροσδιορισμούς με φθορισμογόνο υπόστρωμα. Οι ανοσοπροσδιορισμοί με φθορισμογόνο υπόστρωμα του ενζύμου ιχνηθέτη, συνδυάζουν την υψηλή εξειδίκευση των ανοσοπροσδιορισμών με την

υψηλή ευαισθησία της φθορισμομετρικής ανίχνευσης. Η ευαισθησία της φθορισμομετρικής ανάλυσης επιτυγχάνει όρια ανίχνευσης της τάξης έως 10^{-13} M.

Ιδιαίτερο γνώρισμα της ΜΕΙΑ είναι η χρήση ως στερεάς φάσης, μικροσωματιδίων latex με διάμετρο 0,47 μ m. Το προτέρημα αυτών των μικροσωματιδίων είναι ο αποτελεσματικός διαχωρισμός συνδεδεμένου και μη αντιδραστήριου, επειδή τα μικροσωματίδια συνδέονται μη αντιστρεπτά στο δίκτυο των υαλονημάτων. Τα μικροσωματίδια φέρουν ομοιοπολικά συνδεδεμένο αντίσωμα και επωαζόμενα με το προς μέτρηση δείγμα δημιουργείται ανοσοσύμπλεγμα με το προσδιοριζόμενο αντιγόνο του δείγματος. Όταν χρησιμοποιούνται μικροσωματίδια αυξάνει και μάλιστα πενταπλασιάζεται η αποτελεσματική επιφάνεια του προσκολλημένου αντισώματος, σε σχέση με τα επικαλυμμένα με πολυστυρένιο σωληνάκια. Ακόμη η απόσταση διάχυσης μεταξύ της ένωσης που προσδιορίζουμε και της επιφάνειας των μικροσωματιδίων μειώνεται στο ένα εκατοστό σε σχέση με τα επικαλυμμένα με πολυστυρένιο σωληνάκια. Το αποτέλεσμα της αύξησης της αποτελεσματικής επιφάνειας και της μείωσης της απόστασης διάχυσης μειώνει το χρόνο επώασης της αντίδρασης και η ανάλυση ολοκληρώνεται ταχύτερα.

Η υψηλή συγγένεια του υαλογενούς πλέγματος προς τα μικροσωματίδια και την πρόσδεσή τους σε αυτό, επιτρέπει τον αποτελεσματικό διαχωρισμό τους από το μίγμα της αντίδρασης. Το μη ειδικά προσδεδεμένο υλικό απομακρύνεται με την έκπλυση του υαλογενούς πλέγματος, γι' αυτό και ο προσδιορισμός είναι ετερογενής.

Το επισημασμένο με αλκαλική φωσφατάση δεύτερο αντίσωμα επωάζεται με τα μικροσωματίδια, ώστε να δημιουργηθεί το δεύτερο μισό του sandwich. Βέβαια εννοείται ότι τα δύο αντισώματα πρέπει να κατευθύνονται προς δυο διαφορετικούς αντιγονικούς επίτοπους. Τα μη προσδεδεμένα ιχνηθετημένα αντισώματα απομακρύνονται με έκπλυση.

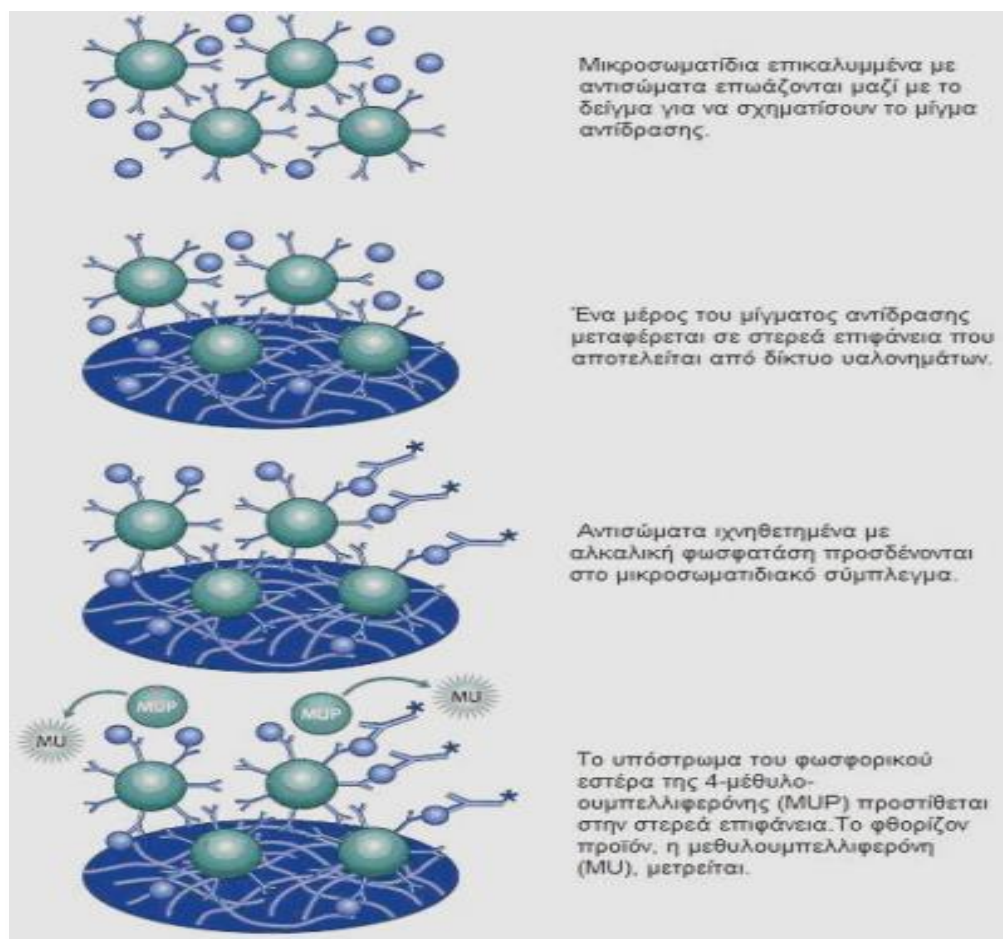


4-methylumbelliferyl phosphate

Εικόνα 27: Δομή MUP

Το ανοσοσύμπλοκο και μέσω αυτού το αντιγόνο μετρώνται βάσει της αντίδρασης του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση με το υπόστρωμα φωσφορικός εστέρας της 4-μεθυλο-ουμπελλιφερόνης MUP, που προστίθεται μετά. Ο ίδιος ο εστέρας δεν φθορίζει, όμως το προϊόν της αντίδρασης η 4-μεθυλο-ουμπελλιφερόνη MU εκπέμπει ισχυρό φθορισμό. Ο ρυθμός αύξησης του φθορισμού είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση της ένωσης που προσδιορίζουμε.

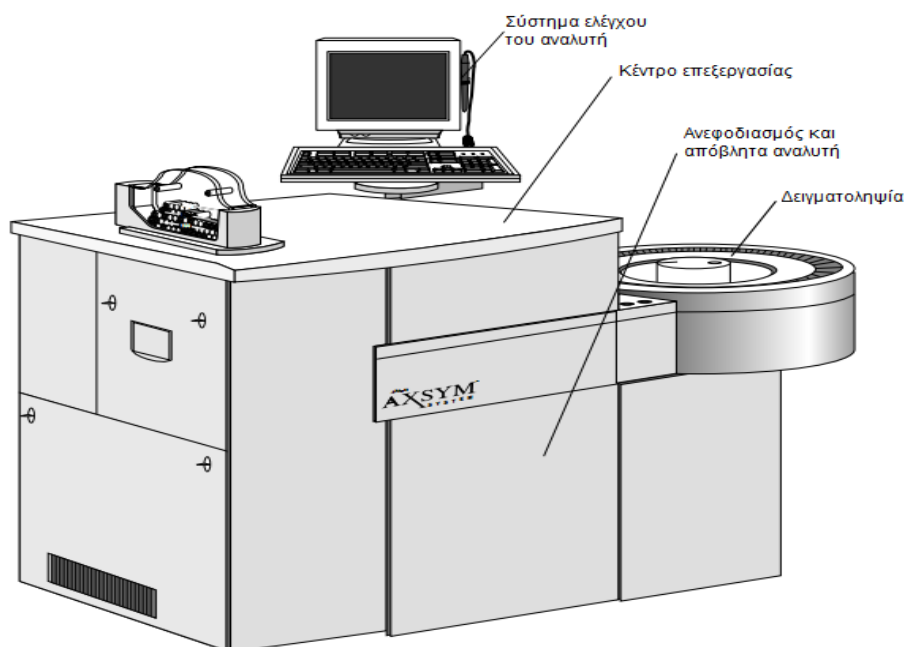
Το υπόστρωμα της αλκαλικής φωσφατάσης, ο φωσφορικός εστέρας της 4-μεθυλο-ουμπελλιφερόνης MUP, μεταφέρεται στο υαλογενές πλέγμα και μετατρέπεται σε φθορίζουσα μεθυλο-ουμπελλιφερόνη, που εκπέμπει ακτινοβολία στα 448nm. Ένα σύστημα διπλού φίλτρου επιτρέπει τη διέλευση ενός μόνον μήκους κύματος της ακτινοβολίας εκπομπής και η ένταση αυτού του εκπεμπόμενου φωτός, που κατευθύνεται στο φωτοπολλαπλασιαστή ενισχύεται και μετράται.



Εικόνα 28: Αρχή μεθόδου ΜΕΙΑ

5.7.2 AxSYM ⁵⁰

Ο ανοσοχημικός αναλυτής AxSYM είναι κλειστού τύπου και πλήρως αυτοματοποιημένος. Παρέχει τη δυνατότητα τυχαίας και συνεχούς προσπέλασης, καθώς και τη δυνατότητα ανάλυσης επειγόντων δειγμάτων (stat) και αυτοματοποιημένης επανάληψης μιας εξέτασης (run). Έχει 20 θέσεις αντιδραστηρίων και μπορεί να μετρά ταυτόχρονα μέχρι και 20 διαφορετικές παραμέτρους, όπως επίπεδα φαρμάκων, καρκινικούς καρδιακούς δείκτες, δείκτες ηπατίτιδας ή HIV, ορμόνες κλπ. Ο ανοσοχημικός αναλυτής AxSYM μπορεί να χρησιμοποιεί συγχρόνως δύο ανοσοχημικές μεθόδους: την πολωσιμετρία ανοσοφθορισμού (Fluorescence Polarization ImmunoAssay - FPIA) και την Μικροσωματιδιακή Ανοσοενζυμική Ανάλυση (Microparticle Enzyme ImmunoAssay - MEIA). Η μέτρηση της διγοξίνης την οποία μελετήσαμε, στηρίζεται στη μέθοδο MEIA. Η αντίδραση MEIA περιλαμβάνει μια σειρά των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του αναλύτη, που υπάρχει στο προς μέτρηση δείγμα και των αντιδρώντων. Η αλληλουχία είναι ειδική σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ανάλυσης.



Εικόνα 29: Κύρια τμήματα του AxSYM

Αποτελείται από 3 κύρια συστήματα:

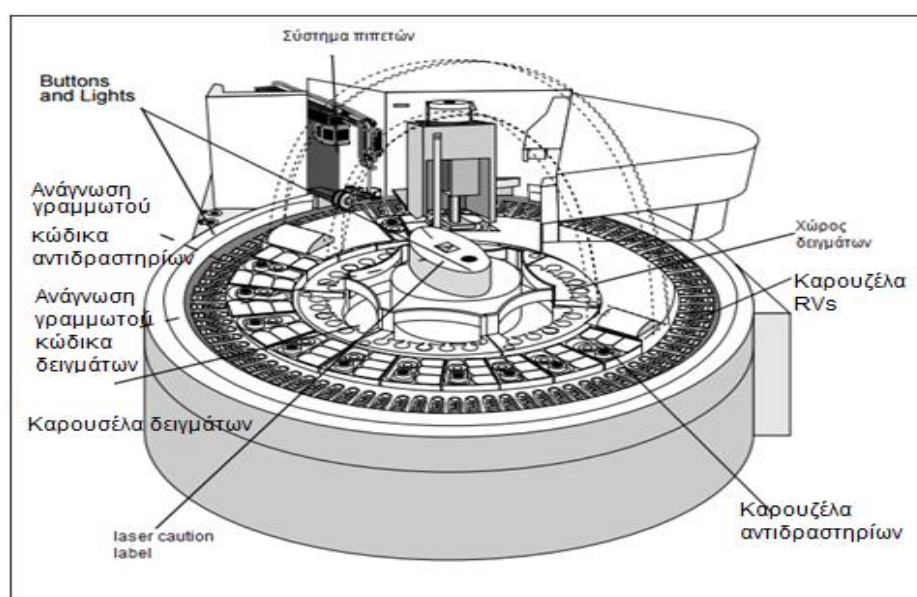
1. Κέντρο επεξεργασίας, όπου υπάρχουν πιπέτες αντιδραστηρίων, που εκτελούν αναρρόφηση κ έγχυση αντιδραστηρίων. Εδώ γίνεται η επεξεργασία των δειγμάτων -

ανάμιξη δείγματος και αντιδραστηρίου, διαδικασίες επώασης, έκπλυσης και μέτρησης - με βάση τη μέθοδο της Μικροσωματιδιακής Ανοσοενζυμικής Ανάλυσης (ΜΕΙΑ).

2. Κέντρο δειγματοληψίας, όπου τοποθετούνται τα αντιδραστήρια, τα δείγματα προς ανάλυση ή και επανεξέταση. Το κέντρο δειγματοληψίας AxSYM έχει περιστρεφόμενο φορέα δειγμάτων και αντιδραστηρίων, πιπέτες δειγματοληψίας που εκτελούν αναρρόφηση κ έγχυση δειγμάτων, ενώ παρέχει και δυνατότητα STAT εξέτασης (εξέταση επειγόντων δειγμάτων). Ο θάλαμος αντιδραστηρίων έχει θέσεις για 20 διαφορετικά αντιδραστήρια, δεν ψύχεται και βρίσκεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Όταν τα δείγματα φορτωθούν στον αναλυτή, μια συσκευή αναγνώρισης γραμμωδών κώδικα (barcode) αναγνωρίζει τα αντιδραστήρια και τα δείγματα. Στη συνέχεια δείγματα και αντιδραστήρια μεταφέρονται με αναρρόφηση από το δειγματολήπτη στις διάφορες θέσεις ενός υποδοχέα αντίδρασης RV.

3. Σύστημα ελέγχου του αναλυτή, το οποίο περιλαμβάνει ηλεκτρονικό υπολογιστή με οθόνη αφής, που παρέχει στο χειριστή έλεγχο της μονάδας επεξεργασίας και ενημέρωση για την γενική πορεία των αναλύσεων.

4. Κέντρο ανεφοδιασμού του αναλυτή με υγρό έκπλυσης των σωληνώσεων (line diluent), ρυθμιστικό έκπλυσης των πλεγμάτων υάλονήματος (matrix cell wash) και διάλυμα φωσφορικής της 4- μεθυλο-ουμπελλιφερόνης (MUP). Δίπλα υπάρχουν τα υγρά και στερεά απόβλητα του μηχανήματος (RVs και matrix cells).



Εικόνα 30:Μηχανικά εξαρτήματα κέντρου επεξεργασίας δειγμάτων

Γενικές προδιαγραφές αναλυτή:

Ο ανοσοχημικός αναλυτής AxSYM εκτελεί έως 120 αναλύσεις/ώρα και ο χρόνος που απαιτείται από τη στιγμή, που το δείγμα (εξαιρουμένου του χρόνου προεργασίας) τοποθετηθεί στον αναλυτή είναι 15-20 λεπτά. Ο χρόνος για τις επείγουσες αναλύσεις είναι 15 λεπτά.

5.8 Architect i2000_{SR} System

Η μέθοδος προσδιορισμού της διγοξίνης στον αναλυτή Architect i2000_{SR} ανήκει στην κατηγορία των ανοσοπροσδιορισμών με χημιοφωταύγεια.

Φωταύγεια

Ο όρος φωταύγεια εκφράζει το φυσικό φαινόμενο της εκπομπής δευτερεύουσας φωτεινής ακτινοβολίας από ένα μόριο το οποίο έχει διεγερθεί από κάποια μορφή ενέργειας.

Χημιοφωταύγεια (Chemiluminescence)

Είναι το φαινόμενο φωταύγειας όπου η ενέργεια διεγέρσεως του μορίου προκαλείται μέσω χημικών αντιδράσεων. Κατά την χημιοφωταύγεια, ένα μόριο μεταπίπτει από μια διεγερμένη κατάσταση στη θεμελιώδη με ταυτόχρονη εκπομπή ορατού φωτός (ενδεικτικά αναφέρεται ότι για εκπομπή κυανού φωτός παράγεται ενέργεια ίση με 300kJ/mol, ενώ για εκπομπή ερυθρού φωτός, παράγεται ενέργεια ίση με 150.300kJ/mol). Η ενέργεια που παράγεται είναι αποτέλεσμα χημικής αντίδρασης, συνήθως οξειδωσης, και είναι μια εξώθερμη διαδικασία. Για τις εν λόγω αντιδράσεις οξειδωσης χρησιμοποιούνται διάφορα οξειδωτικά μέσα όπως μοριακό οξυγόνο (O₂) ή υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂).

Τα πλεονεκτήματα των χημιοφωταυγών αντιδράσεων είναι η πολύ υψηλή ευαισθησία, η υψηλή ταχύτητα και η χρήση μη τοξικών αντιδραστηρίων.

Ανοσοχημιοφωταύγεια (Chemiluminescence)

Η Ανοσοχημιοφωταύγεια συνδυάζει την υψηλή εξειδίκευση των ανοσοπροσδιορισμών με την υψηλή ευαισθησία της χημιοφωταυγειομετρίας.

Σήμερα έχουμε 4 διαφορετικές τεχνολογίες χημειοφωταύγειας:

- Έμμεση
- Άμεση
- Ηλεκτροχημειοφωταύγεια
- Τεχνολογία LOCL (Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay)⁵¹

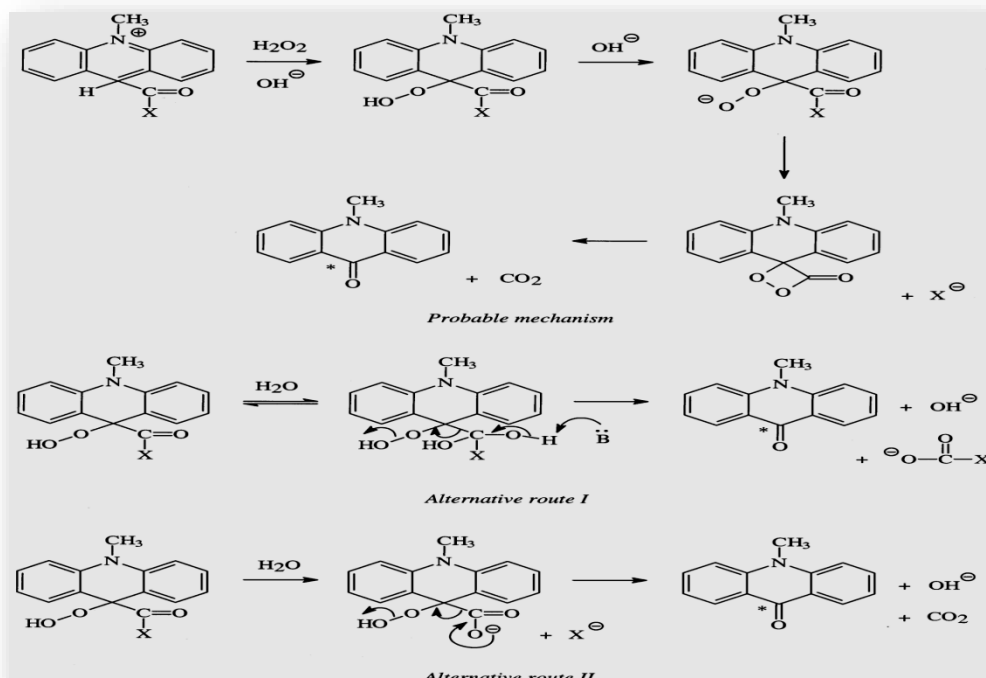
Οι παραπάνω κατηγορίες έχουν να κάνουν με τον τρόπο που θα εφαρμοσθεί η χημειοφωταύγεια. Πιο συγκεκριμένα, η χημειοφωταύγεια είτε θα εφαρμοσθεί απευθείας με ένα επισημασμένο μόριο και θα δώσει αναλυτικό σήμα, είτε θα χρησιμοποιηθεί έμμεσα με μια χημειοφωταυγάζουσα ουσία ως υπόστρωμα για ένα επισημασμένο μόριο.^{52,53}

Για την πραγματοποίηση της μεθόδου χρησιμοποιούνται ως ιχνηθέτες, χημειοφωταυγάζουσες ουσίες, που προσδένονται στους αναλύτες και παράγουν φως, όταν συνδυάζονται με διάλυμα φωτοενεργοποίησης.

Οι ιχνηθέτες που χρησιμοποιούνται στην ανοσοχημειοφωταύγεια, πρέπει να πληρούν τις εξής προϋποθέσεις:

- Να είναι ικανοί να δίνουν αντιδράσεις χημειοφωταύγειας.
- Να έχουν τη δυνατότητα πρόσδεσης με το αντιγόνο ή το αντίσωμα.
- Να μπορούν και να δημιουργούν ένα σταθερό σύμπλοκο μέχρι την πραγματοποίηση της αντίδρασης της χημειοφωταύγειας.
- Να διατηρούν την υψηλή απόδοση και τις ιδιότητές τους μετά την πρόσδεση.
- Να μην αλλοιώνουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες του μορίου που προσδένεται και ιδιαίτερα την ανοσολογική του απόκριση.⁵⁴

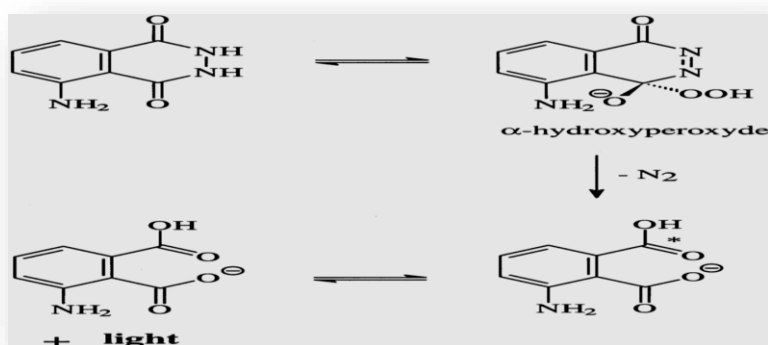
Συνήθως χρησιμοποιούνται εστέρες ακριδινίου και παράγωγα ισολουμινόλης ως ιχνηθέτες. Το ακριδίνιο μπορεί να προσδεθεί είτε στο αντίσωμα, είτε στο αντιγόνο. Στην αντίδραση άμεσης χημειοφωταύγειας, ο εστέρας ακριδίνης οξειδώνεται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και μετατρέπεται σε ένα ασταθές μόριο διοξετάνης, που διασπάται αμέσως και μεταπίπτει στο ενεργειακά σταθερό μόριο η-μεθυλοακριδόνη, εκλύοντας ένα φωτόνιο. Η εκπομπή φωτός γίνεται, όταν το pH του διαλύματος μέτρησης μετατραπεί από όξινο σε βασικό. Τα φωτόνια που εκλύονται, μετρώνται από τον φωτοπολλαπλασιαστή και το φωτεινό σήμα σχετίζεται με τη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας.



Εικόνα 31: Πιθανός μηχανισμός ακριδινίου και παραγώγων του.

Τα πλεονεκτήματα από τη χρήση του εστέρα ακριδίνης προκύπτουν από το μικρό μέγεθος του συγκεκριμένου ιχνηθέτη, εξαιτίας του οποίου βελτιώνεται η ικανότητα προσέγγισης της μετρούμενης ουσίας στις θέσεις δέσμευσης, με αποτέλεσμα να αυξάνει ο ρυθμός διάχυσης και η ευαισθησία του προσδιορισμού.

Αξιοποιώντας παράγωγα ισολουμινόλης, έχουμε ακόμα πιο ευαίσθητες μετρήσεις. Η αντίδραση χημειοφωταύγειας είναι ίδια με αυτή του ακριδινίου αλλά εκτός από υπεροξειδίο προστίθεται και ένας καταλύτης στο μίγμα που περιέχει την επισημασμένη ισολουμινόλη.⁵²



Εικόνα 32: Μηχανισμός ισοουμινόλης

Η Ανοσοχημειοφωταύγεια με τα πολλά πλεονεκτήματα που συγκεντρώνει, είναι πλέον η πιο δημοφιλής μέθοδος, όσον αφορά στον προσδιορισμό επιπέδων φαρμάκων. Πλεονεκτήματα:

1. Χαμηλά όρια ανίχνευσης (της τάξης 10^{-18} - 10^{-21} M)
2. Υψηλή απόδοση
3. Καλή ακρίβεια
4. Χαμηλό σήμα θορύβου
5. Υψηλή ευαισθησία
6. Υψηλή ταχύτητα
7. Εφαρμογή σε πολύπλοκα δείγματα
8. Εύκολος προσδιορισμός χωρίς απαιτήσεις προεπεξεργασίας του δείγματος
9. Απλή και φθηνή οργανολογία
10. Δυνατότητα αυτοματοποιημένης ανίχνευσης (μέσω λέιζερ ή οπτικών ινών)⁵⁵

Παρά το γεγονός ότι η ανοσοχημειοφωταύγεια αποτελεί μια μέθοδο με πάρα πολλά πλεονεκτήματα, δεν παύει να έχει και σοβαρά μειονεκτήματα. Ένα από αυτά είναι η έλλειψη εκλεκτικότητας, καθώς η μέθοδος δίνει αναλυτικό σήμα για οποιαδήποτε μόριο προκαλεί αντίδραση χημειοφωταύγειας. Άλλο ένα σημαντικό ελάττωμα της μεθόδου, είναι η ευαισθησία της σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως pH, θερμοκρασία, ιοντικά φορτία κλπ. Τέλος, η ένταση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας είναι χρονοεξαρτώμενη.

Σήμερα, υπάρχουν διάφορες τεχνικές ανοσοχημειοφωταύγειας, ανήκουν δε στην κατηγορία των ετερογενών ανοσοπροσδιορισμών. Το αντίσωμα (έναντι του προς προσδιορισμό αναλύτη) είναι συνδεδεμένο σε στερεή φάση και η τεχνική μπορεί να είναι ανταγωνιστικού ή μη τύπου.

5.8.1 Μικροσωματιδιακός Χημειοφωταυγής Ανοσοπροσδιορισμός – CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay) ^{51,56}

Ένα πολύ σημαντικό βήμα στην αυτοματοποίηση της ανοσοχημειοφωταύγειας που συμβάλλει στη βέλτιστη αντίδραση μέτρησης, είναι ο τρόπος διαχωρισμού του συμπλόκου μέτρησης από το μίγμα της αντίδρασης. Κατά την CMIA

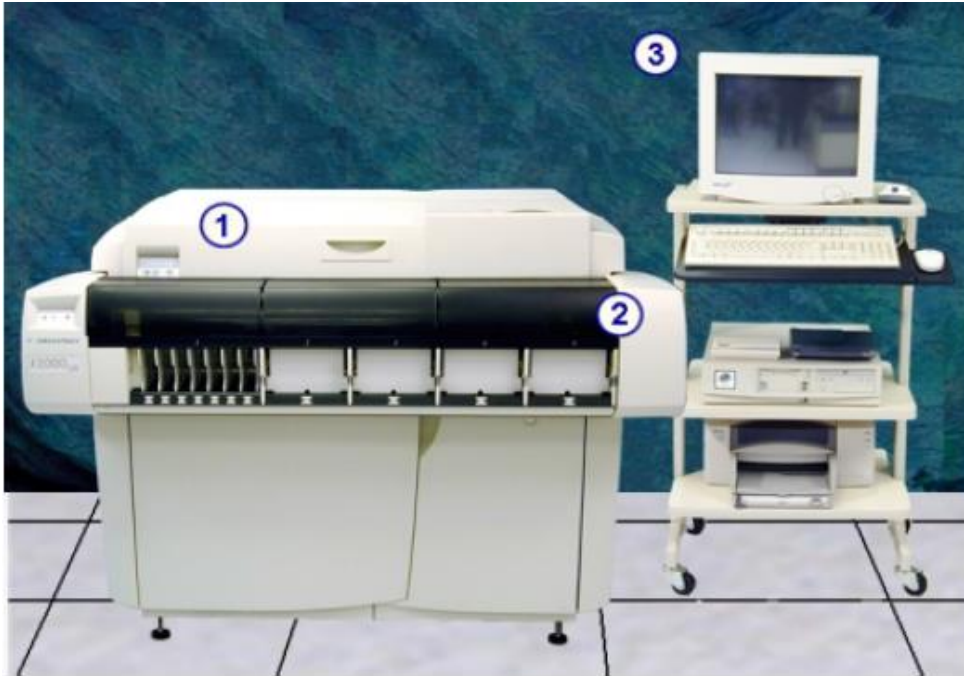
χρησιμοποιούνται παραμαγνητικά σωματίδια επικαλυμμένα με το αντίσωμα, στην επιφάνεια των οποίων προσδένεται το σύμπλοκο μέτρησης.

Τα παραμαγνητικά σωματίδια είναι σφαιρίδια οξειδίου του σιδήρου, με μεγάλη δραστική επιφάνεια ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση μεγάλου αριθμού συμπλόκων μέτρησης.

Το μίγμα της αντίδρασης βρίσκεται μέσα σε κυβέττα, στην οποία εφαρμόζεται μαγνητικό πεδίο, ώστε τα παραμαγνητικά σωματίδια που φέρουν το σύμπλοκο μέτρησης να στοιχηθούν στην πλευρά της κυβέττας, που είναι πλησίον του μαγνήτη. Εν συνεχεία, το υπόλοιπο μίγμα αναρροφάται, η κυβέττα εκπλένεται και το διαχωριζόμενο σύμπλοκο μέτρησης μπορεί να προωθηθεί στο θάλαμο μέτρησης. Ο ιχνηθέτης, που επισημαίνει είτε το αντιγόνο (ανταγωνιστικού τύπου), είτε το δεύτερο αντίσωμα (μη ανταγωνιστικού τύπου), είναι εστέρας ακριδίνης, ο οποίος παρουσία H_2O_2 και $NaOH$ πραγματοποιεί την αντίδραση χημειοφωταύγειας.

5.8.2 Αναλυτής Architect i2000_{SR} ^{57,58}

Ο αναλυτής Architect i2000SR είναι ένας πλήρως αυτοματοποιημένος ανοσοχημικός αναλυτής κλειστού τύπου με δυνατή την τυχαία και συνεχή προσπέλαση, καθώς και την επεξεργασία κατά προτεραιότητα (stat) και την αυτοματοποιημένη επεξεργασία επανεξέτασης (reun). Έχει την δυνατότητα ανίχνευσης αιμόλυσης, θολερότητας και πήγματος σε αντίθεση με τον AxSYM, που δεν έχει αυτή τη δυνατότητα. Έχει ένα μεγάλο εύρος προσδιορισμού εξετάσεων όπως: επιπέδων θεραπευτικών φαρμάκων, καρκινικών δεικτών, καρδιακών δεικτών, ορμονών, δεικτών ηπατίτιδας κ.α. Βασίζεται στην μέθοδο μικροσωματιδιακού χημειοφωταυγούς ανοσοπροσδιορισμού (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay - CMIA). Μια αλληλουχία αντίδρασης CMIA είναι η σειρά των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του αναλύτη, που υπάρχει στο δείγμα και των αντιδρώντων. Η αλληλουχία είναι ειδική ως προς το πρωτόκολλο εξέτασης. Διάφορες τεχνικές CMIA μπορούν να εφαρμοσθούν στον Architect i2000SR όπως: η τύπου «σάντουιτς» δύο σταδίων αλλά και η τεχνική ενός ή δύο σταδίων ανταγωνιστικού τύπου.



Εικόνα 33: Κύρια τμήματα του i2000SR System

Αποτελείται από 3 κύρια συστήματα:

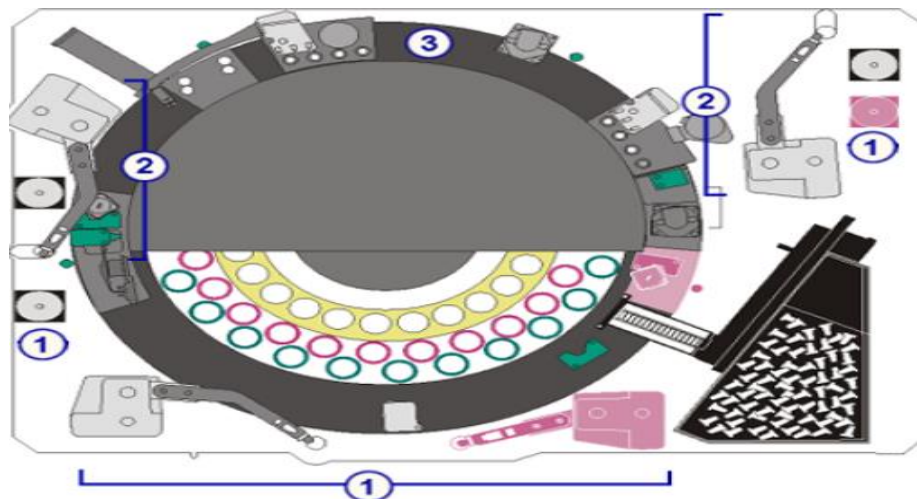
1. Μονάδα επεξεργασίας, η οποία επεξεργάζεται τα δείγματα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο CMIA (μικροσωματιδιακή ανοσοεξέταση χημειοφωταύγειας)
2. Κέντρο δειγματοληψίας, το οποίο περιλαμβάνει τον μηχανισμό φόρτωσης δειγμάτων και τη μονάδα μεταφοράς, η οποία προσάγει τα δείγματα στη μονάδα επεξεργασίας για ανάλυση ή και επανεξέταση.
3. Κέντρο ελέγχου συστήματος, το οποίο περιλαμβάνει σύστημα υπολογιστή που παρέχει στο χειριστή έλεγχο της μονάδας επεξεργασίας και των σχετικών εξαρτημάτων μέσω ενός συγκεντρωτικού περιβάλλοντος εργασίας διασύνδεσης.

I. Μονάδα επεξεργασίας i2000_{SR} :

Η μονάδα επεξεργασίας του i2000_{SR} είναι ένας ανοσοχημικός αναλυτής, ο οποίος επεξεργάζεται έως και 200 εξετάσεις CMIA ανά ώρα το μέγιστο, χρησιμοποιώντας έως 25 διαφορετικά και παραμένοντα στο σύστημα σετ αντιδραστηρίων (100 ή/και 500 εξετάσεων) σε περιστρεφόμενο φορέα αντιδραστηρίων, ο οποίος βρίσκεται σε ψυχόμενο περιβάλλον ελεγχόμενης θερμοκρασίας, ενώ παρέχει και επεξεργασία STAT (εξέταση επείγοντων δειγμάτων).

Κέντρο επεξεργασίας δειγμάτων:

Το κέντρο επεξεργασίας δειγμάτων αποτελεί τον τομέα που διεξάγονται οι κύριες λειτουργίες της μονάδας επεξεργασίας. Τα δείγματα και τα αντιδραστήρια αναμειγνύονται μέσα στους υποδοχείς αντίδρασης (Reaction Vessels-RVs) στο κανάλι επεξεργασίας, όπου διεξάγεται η επεξεργασία της εξέτασης.



Εικόνα 34:Μηχανικά εξαρτήματα κέντρου επεξεργασίας δειγμάτων

1. Μηχανικά εξαρτήματα δειγμάτων (πιπέτες δειγματοληψίας): εκτελούν αναρρόφηση και έγχυση δειγμάτων.
2. Μηχανικά εξαρτήματα αντιδραστηρίων (πιπέτες αντιδραστηρίων): εκτελούν αναρρόφηση και έγχυση αντιδραστηρίων.
3. Μηχανικά εξαρτήματα καναλιού επεξεργασίας: Τοποθετούν τους υποδοχείς αντίδρασης (RVs) για την αναρρόφηση, ανάμιξη και πλύση των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων, καθώς και για την επεξεργασία τύπου CMIA.

II. Κέντρο δειγματοληψίας

RSH- Μηχανικός φορτωτής δειγμάτων:

Ο μηχανικός φορτωτής δειγμάτων είναι ένα σύστημα μεταφοράς, το οποίο χρησιμοποιείται για τη φόρτωση βαθμονομητών, πρότυπων ορών ελέγχου και δειγμάτων ασθενών και την προώθησή τους στη μονάδα επεξεργασίας. Ο σχεδιασμός του RSH καθιστά δυνατή την τυχαία και συνεχή πρόσβαση και την

τοποθέτηση των δειγμάτων σε θέση αυτόματης επανεξέτασης. Τα δείγματα τοποθετούνται σε δύο χώρους φόρτωσης, είτε για συνήθη επεξεργασία, είτε για επεξεργασία κατά προτεραιότητα. Όταν τα δείγματα φορτωθούν στον αναλυτή, μια συσκευή αναγνώρισης γραμμωκώδικα (barcode) αναγνωρίζει τα δείγματα. Ο μηχανισμός μεταφοράς φορέων μετακινεί τους φορείς πίσω στους χώρους φόρτωσης δειγμάτων και στη συνέχεια μετακινεί τους φορείς στην κατάλληλη μονάδα επεξεργασίας για αναρρόφηση δειγμάτων.

Γενικές προδιαγραφές αναλυτή:

<p>Απόδοση I2000ση ως αυτόνομη μονάδα:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Γενικά • Χρόνος έως το πρώτο αποτέλεσμα 	<p>Έως 200 εξετάσεις ανά ώρα 29 λεπτά (εκτός προεπεξεργασίας) 36 έως 43 λεπτά (προεπεξεργασία) 15 λεπτά (πρωτόκολλο STAT)* *18 λεπτά, εκτιμώμενος χρόνος επεξεργασίας συμπεριλαμβανομένης της διαχείρισης δειγμάτων</p>
--	---

Κεφάλαιο 6: Καρδιοτονωτικές Γλυκοσίδες

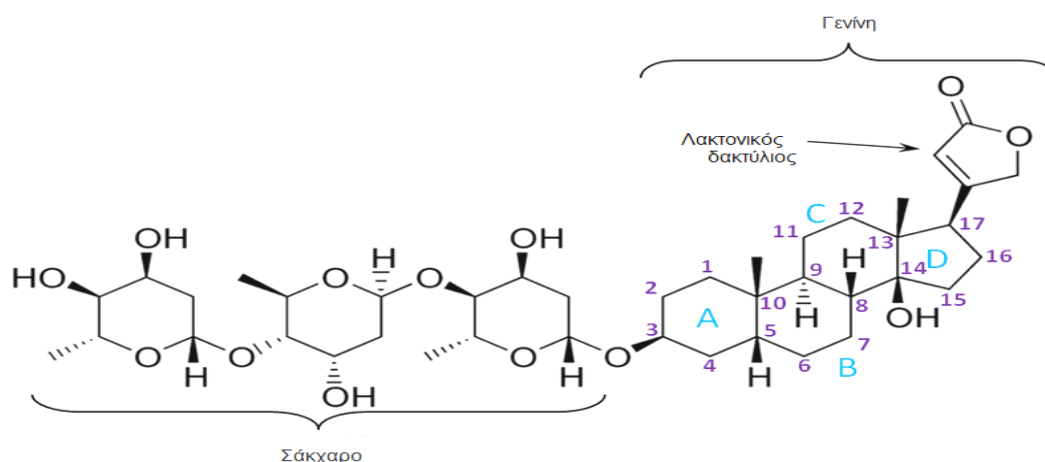
6.1 Εισαγωγή

Στην κατηγορία των καρδιοτονωτικών γλυκοσίδων ανήκουν τα δραστικά συστατικά των φυτών δακτυλίτιδα η ερυθρά (*Digitalis purpurea*), δακτυλίτιδα χνοώδης (*Digitalis lanata*) και στρόφανθος (*Strophanthus gratus* και *kombe*). Από χημικής άποψης, όλες αυτές οι ενώσεις αποτελούνται από στεροειδή πυρήνα ενωμένο με λακτονικό δακτύλιο. Υδρολύονται προς σάκχαρα και προς κλάσματα χωρίς σάκχαρα, το άγλυκο μέρος, που στην περίπτωση των καρδιοτονωτικών γλυκοζιτών ονομάζεται γενίνη ή γενόλη.

Η γενίνη αποτελείται από ένα μόριο στερινοειδούς, ενωμένου στη θέση -17 του πενταμελούς πυρήνα D με ακόρεστο λακτονικό δακτύλιο. Οι θέσεις -3 και -14 φέρουν αλκοολικά υδροξύλια. Τα σάκχαρα βρίσκονται πάντα υπό μορφή αιθέρα ενωμένα με το υδροξύλιο στη θέση -3.

Ο λακτονικός δακτύλιος της θέσης -17 είναι πενταμελής (καρδενολίδιο) ή εξαμελής (μπουφαδιενολίδιο).

Τα σάκχαρα των καρδιοτονωτικών γλυκοζιτών είναι η διγιτοξόζη, η γλυκόζη και η ραμνόζη (στις στροφανθίνες). Οι γλυκοζίτες της χνοώδους περιέχουν και οξικό οξύ.



Εικόνα 35: Χημική δομή καρδιοτονωτικών γλυκοσίδων

Από την αφαίρεση του οξικού οξέος (εφόσον υπάρχει), καθώς και από την υδρολυτική διάσπαση της γλυκόζης, προκύπτουν καθαροί γλυκοζίτες. Στη συνέχεια με υδρολυτική διάσπαση των κεκαθαρμένων γλυκοζιτών προκύπτουν οι γενίνες (καρδενολίδια)

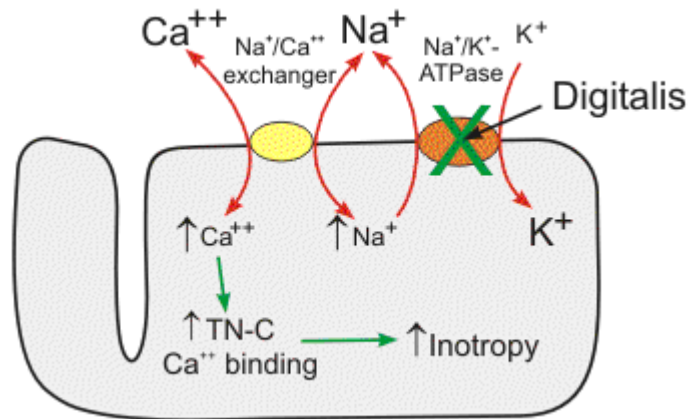
Τα σκευάσματα που χορηγούνται από τα φύλλα δακτυλίτιδας (σκόνη, βάμμα), οι γλυκοζίτες, οι γενίνες και τα ημισυνθετικά παράγωγα της δακτυλίτιδας έχουν δράση διαφορετικής έντασης, αλλά ποιοτικά πάντοτε την ίδια. Οι δραστηριότητές τους τιτλοποιούνται βιολογικά, συγκρινόμενες με μονάδα γνωστής ισχύος, με πειραματική χορήγηση σε πειραματόζωα (βατράχων, περιστεριών και γάλων) και καθορισμό της θανατηφόρας δόσης.

6.2 Μηχανισμός δράσης

Η δακτυλίτιδα ανήκει στα φάρμακα που έχουν θετική ινότροπο δράση, η οποία αφορά την ένταση της συστολής των μυϊκών κυττάρων και επηρεάζεται από τη συγκέντρωση ασβεστίου [Ca^{2+}] που εισέρχεται στα μυοκαρδιακά κύτταρα.

Η δακτυλίτιδα δρα κυρίως μέσω αναστολής των α -υπομονάδων της αντλίας νατρίου-καλίου (Na^+-K^+ ATPase), που βρίσκεται συνδεδεμένη στη μυοκαρδιακή κυτταρική μεμβράνη. Με την αναστολή λειτουργίας της αντλίας, αυξάνει η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του νατρίου [Na^+], η οποία με τη σειρά της, μέσω της αντλίας Na^+-Ca^{2+} , προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου. Η ικανότητα της δακτυλίτιδας να αυξάνει τη διαθεσιμότητα του Ca^{2+} μέσα στα καρδιακά κύτταρα, αυξάνει την ταχύτητα αλλά και την ένταση της συστολής των μυοκαρδιακών ινών, αφού η δύναμη της μυοκαρδιακής συστολής είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του ασβεστίου (εικόνα 37).^{59,60}

Η σύνδεση της δακτυλίτιδας με τη Na^+-K^+ ATPase είναι αναστρέψιμη, ενώ σταθεροποιείται αφού προηγηθεί φωσφορυλίωση μιας β -ασπαρτάμης, που βρίσκεται στην ενδοκυτταροπλασματική περιοχή του ενζύμου. Το εξωκυττάριο K^+ , έχει τη δυνατότητα να προάγει την από-φωσφορυλίωση του ενζύμου, μειώνοντας έτσι τη δραστηριότητα της δακτυλίτιδας. Με αυτό το μηχανισμό το K^+ μπορεί και χρησιμοποιείται για να αναστρέψει φαινόμενα τοξικού δακτυλιδισμού.



Εικόνα 36: Μηχανισμός δράσης της διγοξίνης

Οι φαρμακολογικές συνέπειες αυτών των διαρκών μετακινήσεων των ιόντων εκατέρωθεν της κυτταρικής μεμβράνης έχει ως αποτέλεσμα⁶¹:

- i. Αύξηση της συσταλτικότητας του μυοκαρδίου (θετική ινοτροπική δράση).
- ii. Μείωση του βαθμού ενεργοποίησης του νευρικού συστήματος και του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης.
- iii. Μείωση της ταχύτητας φλεβοκομβο-κολπικής και κολποκοιλιακής αγωγής.
- iv. Μείωση του βαθμού μυοκαρδιακής ίνωσης, που προκαλούν τα αυξημένα επίπεδα αλδοστερόνης, τα οποία αυξάνοντας τη δραστικότητα της αντλίας νατρίου-καλίου προάγουν την εναπόθεση περιαγγειακά ινώδους συνδετικού ιστού.

6.3 Φαρμακοκινητική ⁶²⁻⁶⁴:

Απορρόφηση: Η χορήγηση από του στόματος οδηγεί σε απορρόφηση 60-90% του φαρμάκου, μέσα σε 1-3 ώρες μετά τη λήψη της δακτυλίτιδας. Ο ρυθμός της απορρόφησης μειώνεται, εάν η δακτυλίτιδα χορηγηθεί μετά από κάποιο γεύμα. Εντούτοις, αν το γεύμα αυτό είναι πλούσιο σε φυτικές ίνες, ο ρυθμός απορρόφησης είναι πολύ πιθανό να μειωθεί σημαντικά. Η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου φθάνει στο 75%.

Κατανομή: Η κατανομή στους ιστούς διαρκεί 6-8 ώρες. Η δακτυλίτιδα κατανέμεται μόνο στο μυϊκό ιστό και όχι στο λιπώδη ιστό. Έτσι άτομα με μικρή μυϊκή μάζα, ακόμα και με τη χορήγηση των προκαθορισμένων δόσεων, κινδυνεύουν να εμφανίσουν

τοξικές εκδηλώσεις, λόγω αυξημένης συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα. Ο όγκος κατανομής είναι ίσος με $V_d=7,3L/Kg$ με βάση το ιδανικό βάρος σώματος (Ideal Body Weight-IBW) και υπολογίζεται στα 475-500L περίπου. Σημειώνεται, ότι το φαρμακευτικό αποτέλεσμα δε μπορεί να προσδιοριστεί, αν δεν ολοκληρωθεί η κατανομή του φαρμάκου στους ιστούς. Από το χορηγούμενο φάρμακο το 25% μπορεί να συνδεθεί με πρωτεΐνες του πλάσματος.

Μεταβολισμός: Μόνο το 16% της χορηγούμενης δακτυλίτιδας απορροφάται, ενώ το υπόλοιπο απεκκρίνεται αμετάβλητο από τους νεφρούς. Οι κύριοι μεταβολίτες της δακτυλίτιδας είναι η 3β-διγοξιγενίνη και η 3κέτο-διγοξιγενίνη συζευγμένες με γλυκουρονικές και σουλφονικές ομάδες. Οι παραπάνω μεταβολίτες είναι πολικές ενώσεις και σχηματίζονται στο ήπαρ ή στο γαστρεντερικό σωλήνα με υδρόλυση, οξείδωση ή σύζευξη. Ο μεταβολισμός της δακτυλίτιδας δεν εξαρτάται από το σύστημα P450 και η ίδια η δακτυλίτιδα δεν αναστέλλει, ούτε επάγει το κυτόχρωμα. Η από του στόματος χορηγούμενη διγοξίνη ανάγεται προς αδρανείς μεταβολίτες (πχ. Διυδρόξυ-διγοξίνη) από τη χλωρίδα του παχέος εντέρου. Τουλάχιστον το 40% της απορροφούμενης ποσότητας του φαρμάκου ακολουθεί αυτή την οδό.

Απέκκριση: Η απέκκριση της δακτυλίτιδας γίνεται κυρίως στους νεφρούς, εκθετικά, με χρόνο ημίσειας ζωής ίσο με $t_{1/2}=36-48$ ώρες για ασθενείς με φυσιολογική νεφρική λειτουργία. Σε περιπτώσεις νεφρικής διαταραχής, ο όγκος κατανομής μειώνεται και ο χρόνος ημίσειας ζωής αυξάνει σημαντικά (3,5-5 μέρες). Όπως αναφέρθηκε, η δακτυλίτιδα είναι συνδεδεμένη στους ιστούς και δεν κυκλοφορεί στο αίμα. Για αυτό το λόγο είναι αδύνατη η απέκκρισή της με διάλυση, μετάγγιση ή μέσω καρδιοπνευμονικής παράκαμψης. Η κάθαρση είναι ίση με $CL=0,8mL/Kg/min$ και είναι ανάλογη της κάθαρσης της κρεατινίνης, ανάλογη δηλαδή της νεφρικής λειτουργίας του ασθενούς. Σε περιπτώσεις ασθενών που πάσχουν από υποθυροειδισμό ή που λαμβάνουν ταυτόχρονα φάρμακα, όπως αμιωδαρόνη, κινιδίνη και βεραπαμίλη, η κάθαρση της δακτυλίτιδας μπορεί να μειωθεί.

Χωρίς να δοθεί δόση φόρτισης, σε ασθενείς με φυσιολογική νεφρική λειτουργία χρειάζονται 7-10 μέρες (4-5 $t_{1/2}$) για να επιτευχθεί σταθερή συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα. Η δακτυλίτιδα έχει χαρακτηριστικά στενό θεραπευτικό παράθυρο (0.8-2.0 ng/mL), που καθιστά δύσκολο τον προσδιορισμό κατάλληλης δόσης, που θα μειώσει και τον κίνδυνο τοξικότητας. Εξαιτίας του στενού θεραπευτικού παραθύρου, για να προσδιοριστούν τα επίπεδα συγκέντρωσης

δακτυλίτιδας, η αιμοληψία θα πρέπει να γίνει τουλάχιστον 6 ώρες από τη χορήγηση του φαρμάκου, ώστε η συγκέντρωση διγοξίνης στον ορό, να αντικατοπτρίζει και τη συγκέντρωσή της στο μυοκάρδιο.

6.4 Χρήση δακτυλίτιδας στην κλινική πράξη ⁶⁵

- **Καρδιακή ανεπάρκεια:** στην κατηγορία των ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια, χωρίς όμως συστολική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας, η δακτυλίτιδα φαίνεται πως συμβάλλει στη μη επιδείνωση των συμπτωμάτων, αλλά δεν έχει καμία επίδραση στη θνητότητα.
- **Κολπική μαρμαρυγή:** η ευρύτετη χρήση της δακτυλίτιδας στην αντιμετώπιση της κολπικής μαρμαρυγής οφείλεται στο εύκολο δοσολογικό της σχήμα (μια φορά ημερησίως) και στη μη εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών, όταν τα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα είναι μη τοξικά. Παρόλα αυτά, στην πλειονότητα των περιπτώσεων με τη δακτυλίτιδα επιτυγχάνεται μόνον ο έλεγχος της συχνότητας και όχι η ανάταξη της αρρυθμίας ή η διατήρηση του φλεβοκομβικού ρυθμού στην πλειονότητα των περιπτώσεων.
- **Θεραπεία στηθάγχης:** οι καρδιακές γλυκοσίδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν, ειδικά σε συνδυασμό με β-αδρενεργικούς αποκλειστές, στη θεραπεία της στηθάγχης σε ασθενείς με καρδιομεγαλία και καρδιακή ανεπάρκεια. Ωστόσο, οι καρδιακές γλυκοσίδες δεν είναι από μόνες τους επωφελείς για τη θεραπεία της στηθάγχης σε ασθενείς που δεν πάσχουν από καρδιομεγαλία και συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια.⁶¹

6.5 Δοσολογία και αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα

Συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα <1ng/mL, είναι αρκετή για να επιτευχθούν τα επωφελή κλινικά αποτελέσματα από τη χορήγησή του. Σε άτομα με φυσιολογική νεφρική λειτουργία και χωρίς σύγχρονη λήψη άλλων φαρμάκων που αυξάνουν τα επίπεδα της δακτυλίτιδας, η συγκέντρωση αυτή επιτυγχάνεται με ημερήσια δόση 0,125 mg διγοξίνης από του στόματος. Κάθε δισκίο περιέχει την ποσότητα διγοξίνης, που επισημαίνεται καθώς και μη δραστικά έκδοχα, όπως κολλοειδές διοξείδιο του

πυριτίου, άνυδρη λακτόζη, στεατικό μαγνήσιο, μικροκρυσταλλική κυτταρίνη και στεαρικό οξύ.

ΦΑΡΜΑΚΑ ΠΟΥ ΑΥΞΑΝΟΥΝ ΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΗΣ ΔΙΓΟΞΙΝΗΣ ΣΤΟ ΑΙΜΑ	ΠΙΘΑΝΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ
ΑΝΤΙΑΡΡΥΘΜΙΚΑ	
Αμιωδαρόνη	Ανταγωνισμός για την γλυκοπρωτεΐνη P-gr, γνωστή και ως multidrug resistance protein 1 (MDR1) και έκπτωση νεφρικής λειτουργίας. Μείωση του όγκου κατανομής Vd, εκδίωξη της διγοξίνης από τις θέσεις σύνδεσης με πρωτεΐνες.
Κινιδίνη	Ανταγωνισμός για την γλυκοπρωτεΐνη P-gr και έκπτωση νεφρικής λειτουργίας. Η προηγούμενη χρήση διγοξίνης μειώνει την ευαισθησία του καρδιακού μυός έναντι της κινιδίνης.
Προπafenόνη	Έκπτωση νεφρικής λειτουργίας
Σπιρονολακτόνη	Έκπτωση νεφρικής λειτουργίας.
ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΕΣ ΔΙΑΥΛΩΝ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ	
Βεραπαμίλη	Ανταγωνισμός για την γλυκοπρωτεΐνη P-gr και έκπτωση νεφρικής λειτουργίας.
Νιφεδιπίνη	Έκπτωση νεφρικής λειτουργίας
ΥΠΟΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΑ (για την υπερχοληστερολαιμία)	
Ατορβαστατίνη	Πιθανός μηχανισμός: Ανταγωνισμός για την γλυκοπρωτεΐνη P-gr
ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ	
Κυκλοσπορίνη, Τακρόλιμους, Σιρόλιμους	Ανταγωνισμός για την γλυκοπρωτεΐνη P-gr στο ήπαρ και τους νεφρούς.

ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΑ	
Ιτρακοναζόλη	Έκπτωση νεφρικής λειτουργίας
ΜΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ (ΜΣΑΦ)	
Ινδομεθακίνη	Έκπτωση νεφρικής λειτουργίας
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΜΕΤΑΤΡΕΠΤΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΤΑΣΙΝΗΣ (αΜΕΑ)	
Καπτοπρίλη, Εναλαπρίλη	Έκπτωση νεφρικής λειτουργίας
ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ	
Αμπικιλίνη	Καταστροφή της εντερικής χλωρίδας, που μεταβολίζει τη διγοξίνη προς αδρανείς μεταβολίτες.
ΜΑΚΡΟΛΙΔΙΑ (Ερυθρομυκίνη, Αζιθρομυκίνη, Κλαριθρομυκίνη)	
Κλαριθρομυκίνη	Καταστροφή της εντερικής χλωρίδας, που μεταβολίζει τη διγοξίνη προς αδρανείς μεταβολίτες. Ανταγωνισμός για την γλυκοπρωτεΐνη P-gp, γνωστή και ως multidrug resistance protein 1 (MDR1) και έκπτωση νεφρικής λειτουργίας. Ο κίνδυνος δακτυλιδισμού τετραπλασιάζεται μετά τη χορήγηση κλαριθρομυκίνης.
ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ	Καταστροφή της εντερικής χλωρίδας που μεταβολίζει τη διγοξίνη προς αδρανείς μεταβολίτες.
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΑΝΤΛΙΑΣ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ (PPI)	
Ομεπραζόλη, Λανσοπραζόλη	Αναστέλλουν τη δράση της αντλίας H ⁺ K ⁺ /ATPάση στα τοιχωματικά κύτταρα του στομάχου.

ΔΙΟΥΡΗΤΙΚΑ	
Θειαζίδες, Φουρεσιμίδη	Τα καλιοπροστατευτικά διουρητικά και τα διουρητικά της αγκύλης μπορεί προκαλέσουν λόγω υποκαλιαιμίας ή υπομαγνησαιμίας αύξηση της δραστηριότητας της διγοξίνης.

Πίνακας 4: Φάρμακα που αυξάνουν τη συγκέντρωση της διγοξίνης στο αίμα

ΦΑΡΜΑΚΑ ΠΟΥ ΜΕΙΩΝΟΥΝ ΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΗΣ ΔΙΓΟΞΙΝΗΣ ΣΤΟ ΑΙΜΑ	ΠΙΘΑΝΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ
ΑΝΤΙΟΞΙΝΑ (εξουδετερωτικά της γαστρικής έκκρισης)	
Υδροξείδιο του αργιλίου, Υδροξείδιο του μαγνησίου	Μείωση της βιοδιαθεσιμότητας της διγοξίνης.
ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΕΣ ΟΡΜΟΝΕΣ	Ασθενείς που λαμβάνουν θυρεοειδικές ορμόνες, χρειάζονται τακτικό έλεγχο της συγκέντρωσης της διγοξίνης στο αίμα.

Πίνακας 5: Φάρμακα που μειώνουν τη συγκέντρωση της διγοξίνης στο αίμα

Οι κυριότεροι μηχανισμοί αύξησης της συγκέντρωσης της διγοξίνης στο αίμα λόγω αλληλεπίδρασης με άλλα φάρμακα είναι ο ανταγωνισμός για την γλυκοπρωτεΐνη P-gp και η προκύπτουσα έκπτωση νεφρικής λειτουργίας, καθώς και η καταστροφή της εντερικής χλωρίδας που μεταβολίζει τη διγοξίνη προς αδρανείς μεταβολίτες

Ιονανταλλακτικές ρητίνες όπως η χολυστεραμίνη δεσμεύουν τους καρδιακούς γλυκοζίτες και μειώνουν τη βιοδιαθεσιμότητα της διγοξίνης. Το αντιφυματικό ριφαμπικίνη μέσω του ανταγωνισμού για τη γλυκοπρωτεΐνη P-gp, μερικά κυτταροστατικά, τα φάρμακα που προάγουν την κινητικότητα του εντέρου μειώνουν επίσης τη συγκέντρωση της διγοξίνης στο αίμα. Τροφές πλούσιες σε φυτικές ίνες μειώνουν τη βιοδιαθεσιμότητα της διγοξίνης.

Συμπληρώματα διατροφής που προκαλούν υπερασβεστιαμία, προδιαθέτουν για δακτυλιδισμό, ενώ αντίθετα η υποασβεστιαμία μπορεί να ακυρώσει τη δράση της διγοξίνης. Η υποκαλιαιμία ή η υπομαγνησισαιμία μπορεί να προκαλέσουν δακτυλιδισμό, ακόμη και όταν οι τιμές της διγοξίνης βρίσκονται εντός του θεραπευτικού παραθύρου. Τα βότανα θεωρούνται ακίνδυνα, όμως αυτό δεν ισχύει στην πραγματικότητα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το μελισσόχορτο (St John's wort ή *Hypericum perforatum*), που επάγει την δράση της γλυκοπρωτεΐνης P-gp και μειώνει τη συγκέντρωση της διγοξίνης.^{39,66,67}

6.6 Ανεπιθύμητες παρενέργειες - Τοξικός δακτυλιδισμός

Η δακτυλίτιδα έχει πολύ στενό θεραπευτικό παράθυρο και μικρή αύξηση των επιπέδων της στο αίμα, μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση συγκεκριμένων κλινικών συμπτωμάτων και σημείων, που συνολικά ονομάζονται τοξικός δακτυλιδισμός. Οι εκδηλώσεις του τοξικού δακτυλιδισμού αφορούν το γαστρεντερικό σύστημα (ανορεξία, έμετοι, διάρροιες), το κεντρικό νευρικό σύστημα (διαταραχές της όρασης, όπου παρατηρείται θολή ή κίτρινη όραση, σύγχυση), καθώς και το ίδιο στο μυοκάρδιο με την εμφάνιση κάθε είδους αρρυθμιών, μερικές από τις οποίες είναι χαρακτηριστικές και θέτουν την κλινική υποψία της τοξικής δράσης της δακτυλίτιδας.

Η εμφάνιση του τοξικού δακτυλιδισμού δεν εξαρτάται μόνο από τη χορηγούμενη δόση, αλλά και από τη παράλληλη χορήγηση άλλων φαρμάκων (διουρητικά) ή από τη παρουσία και άλλων παθολογικών καταστάσεων, οι οποίες ευνοούν την εμφάνισή του (νεφρική ανεπάρκεια, ισχαιμία, καρδιακή αμυλοείδωση).

Η επιτυχής θεραπευτική αντιμετώπιση του τοξικού δακτυλιδισμού εξαρτάται από την έγκαιρη διάγνωσή του, που βασίζεται κυρίως στην αναγνώριση των χαρακτηριστικών αρρυθμιών που προκαλεί. Τα επίπεδα δακτυλίτιδας στο πλάσμα βοηθούν περαιτέρω στη διάγνωση. Επίπεδα δακτυλίτιδας >3,0 ng/mL αυξάνουν τον κίνδυνο τοξικού δακτυλιδισμού κατά 12 φορές περίπου. Εντούτοις, η ανεύρεση φυσιολογικών επιπέδων δακτυλίτιδας (<2 ng/mL) δεν αποκλείει τη διάγνωση τοξικού δακτυλιδισμού.⁶⁵

Η αύξηση των επιπέδων της διγοξίνης αντιμετωπίζεται με τη χορήγηση:

1. Των ειδικών κλασμάτων αντισωμάτων της διγοξίνης, τα οποία αναστρέφουν την τοξικότητα της διγοξίνης.
2. Της αμιωδαρόνης, η οποία είναι ένα αντιαρρυθμικό φάρμακο τρίτης τάξης κατά Vaughan-Williams και ελέγχει τις αρρυθμίες, που προκαλεί η υπερβολική δόση διγοξίνης.⁶⁸

Τα ειδικά κλάσματα αντισωμάτων της διγοξίνης είναι αντισώματα διγοξίνης, που προέρχονται από θραύσματα ανοσοσφαιρινών από το ανοσοποιητικό σύστημα των προβάτων. Τα θραύσματα αυτά έχουν παραληφθεί από το αίμα υγιών προβάτων, που έχουν ανοσοποιηθεί με παράγωγο διγοξίνης, την δικαρβόξυμεθυλαμίνη (DDMA), μία ένωση ανάλογη της διγοξίνης που περιέχει το λειτουργικά απαραίτητο κυκλοπενταφαινανθρενικό δακτύλιο. Το τελικό προϊόν προκύπτει απομονώνοντας το θραύσμα ανοσοσφαιρινών από τον ορό των προβάτων, μετά από επεξεργασία με το πρωτεολυτικό ένζυμο παπαΐνη, και στη συνέχεια απομονώνεται το ειδικό κλάσμα αντισωμάτων της διγοξίνης με χρωματογραφία συγγένειας. Τα κλάσματα αυτά έχουν μοριακό βάρος 46.000Da. Το προϊόν δεν περιέχει συντηρητικά και προορίζεται για ενδοφλέβια χορήγηση.

Ο μηχανισμός δράσης των αντισωμάτων αυτών έγκειται στη συγγένειά τους με τη διγοξίνη (10^9 - 10^{10} M^{-1}), η οποία είναι μεγαλύτερη από τη συγγένεια της διγοξίνης με τον υποδοχέα της αντλίας Na^+ - K^+ ATPάσης. Όταν τα ειδικά κλάσματα αντισωμάτων της διγοξίνης χορηγηθούν στον ασθενή που παρουσιάζει τοξικότητα, συνδέονται με τα μόρια διγοξίνης. Η σύνδεση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την απομάκρυνση της διγοξίνης από τα σημεία σύνδεσής της με τους ιστούς και τη μείωση των επιπέδων της ελεύθερης διγοξίνης στην κυκλοφορία. Έτσι η ισορροπία μετατοπίζεται μακριά από το σημείο σύνδεσής της με τους υποδοχείς και παρατηρείται ταχεία μείωση της καρδιοτοξικότητας. Το σύμπλεγμα των κλασμάτων αντισωμάτων της διγοξίνης με τη διγοξίνη απεκκρίνεται από τους νεφρούς.⁶⁹

Μια από τις σοβαρότερες επιπτώσεις της τοξικότητας της διγοξίνης είναι η υπερκαλιαιμία - δηλαδή η συγκέντρωση $[\text{K}^+]$ στο αίμα είναι υψηλότερη από 5meq/L. Με την αύξηση των επιπέδων της διγοξίνης, αναστέλλεται η λειτουργία της αντλίας Na-K ATPάσης, με αποτέλεσμα να μεταφερθεί το ενδοκυττάριο κάλιο από το εσωτερικό στο εξωτερικό του κυττάρου και παράλληλα να αυξηθεί η αποβολή καλίου στα ούρα. Οπότε προκύπτει το παράδοξο αποτέλεσμα, ο ασθενής να πάσχει από

υπερκαλιαιμία, αλλά να έχει γενική έλλειψη καλίου στο οργανισμό του. Έχει δειχθεί ότι η υπερκαλιαιμία αποτελεί έναν προγνωστικό δείκτη για τη δηλητηρίαση λόγω διγοξίνης και εμφανίζεται όταν τα επίπεδα διγοξίνης είναι πολύ υψηλά. Παρόλα αυτά, δεν έχει βρεθεί άμεση σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης καλίου και της συγκέντρωσης διγοξίνης. Τα κλάσματα αντισωμάτων της διγοξίνης μπορούν και επαναφέρουν την ισορροπία απενεργοποιώντας την αντλία, μπορεί όμως να προκαλέσουν σοβαρή υποκαλιαιμία και να απαιτείται χορήγηση καλίου στον ασθενή.⁶⁸ Στα Τ.Ε.Π (Τμήμα Επείγοντων Περιστατικών) των νοσοκομείων, οι καρδιολόγοι ακολουθούν τη συνήθη πρακτική να χορηγούν άμεσα K⁺ στους ασθενείς με τοξικό δακτυλιδισμό.

Η χρήση κλασμάτων αντισωμάτων της διγοξίνης δεν ενδείκνυται για ήπιες περιπτώσεις τοξικότητας διγοξίνης ή σε περιπτώσεις αυξημένης συγκέντρωσης διγοξίνης στον ορό, απουσία όμως συμπτωμάτων τοξικότητας. Στο εμπόριο κυκλοφορούν δύο σκευάσματα, που περιέχουν κλάσματα αντισωμάτων διγοξίνης τα οποία έχουν τις εμπειρικές ονομασίες DigiFab και Digibind και έχουν παρόμοια φαρμακοδυναμικά αποτελέσματα. Παρακάτω αναφέρονται τα φαρμακολογικά χαρακτηριστικά των DigiFab.

Προφυλάξεις στη χρήση των DigiFab:

- αλλεργικές αντιδράσεις στις πρωτεΐνες των αμνών.
- ασθενείς με αλλεργία στην παπάγια, στο χυμό της παπάγιας ή άλλων εκχυλισμάτων της αλλά και στο ένζυμο βρομελίνη που βρίσκεται στον ανανά διατρέχουν κίνδυνο να αναπτύξουν αντίδραση υπερευαισθησίας καθώς η παπάγια χρησιμοποιείται στην διαδικασία παρασκευής των DigiFab.

Δυσμενείς επιδράσεις του DigiFab:

- αντιδράσεις ευαισθησίας (αναφυλαξία, κνησμός, έξαψη, οίδημα στο πρόσωπο)
- υποκαλιαιμία (ανιχνεύονται χαμηλά επίπεδα καλίου τις πρώτες ώρες μετά τη χορήγηση του DigiFab)
- ταχυκαρδία (αν η διγοξίνη χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της κοιλιακής μαρμαρυγής)

- επιδείνωση καρδιακής ανεπάρκειας καθώς χάνεται η θετική ινοτροπική δράση της διγοξίνης
- πυρετός
- φλεβίτιδα κατά τη διάρκεια της έγχυσης

Ανταπόκριση στη θεραπεία:

- οι συγκεντρώσεις καλίου στον ορό επιστρέφουν στα φυσιολογικά επίπεδα 2-6 ώρες μετά τη χορήγηση του DigiFab.
- οι καρδιακές αρρυθμίες ελέγχονται μέσα σε 3 ώρες από τη χορήγηση του DigiFab.⁷⁰

6.7 Ειδικές περιπτώσεις που χρειάζονται προσοχή⁷¹

Εξαιτίας των ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων της δακτυλίτιδας πρέπει να δίνεται προσοχή σε ορισμένες ομάδες, ώστε να μην υπάρχουν ανεπιθύμητα αποτελέσματα.

1. Γυναίκες: στις γυναίκες πρέπει να δίνεται χαμηλότερη δόση διγοξίνης καθώς είναι περισσότερο ευαίσθητες στην τοξική δράση της δακτυλίτιδας.
2. Ηλικιωμένοι: λόγω της μειωμένης μυϊκής μάζας (μικρότερο ποσοστό δακτυλίτιδας δεσμευμένης στους ιστούς και μεγαλύτερο ποσοστό κυκλοφορούσας δακτυλίτιδας) και της μειωμένης νεφρικής λειτουργίας είναι επιρρεπείς σε φαινόμενα τοξικού δακτυλιδισμού.
3. Ασθενείς: η δακτυλίτιδα δε θα πρέπει να χορηγείται σε ασθενείς χωρίς βηματοδότη, που πάσχουν από φλεβοκομβοκολπικό ή δεύτερου και τρίτου βαθμού κολποκοιλιακό αποκλεισμό. Επίσης η χορήγησή της αντενδείκνυται σε ασθενείς με σύνδρομο προδιέγερσης (σύνδρομο Wolff - Parkinson - White), με υπερτροφική αποφρακτική μυοκαρδιοπάθεια. Θα πρέπει να επίσης να χορηγείται με προσοχή σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, διαταραχή της νεφρικής λειτουργίας, ηλεκτρολυτικές διαταραχές καθώς και σε ασθενείς με υπέρ- και υπόθυροειδισμό.
4. Εγκυμοσύνη και θηλασμός: η διγοξίνη έχει την ικανότητα να διαπερνά τον πλακούντα και να φθάνει στο έμβρυο. Αυτή η ιδιότητα μπορεί να φανεί πολύ χρήσιμη σε περιπτώσεις που πρέπει να ρυθμιστούν οι καρδιακοί παλμοί του

εμβρύου στη μήτρα, αλλά αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για το έμβρυο όταν δεν είναι εκείνο που χρειάζεται χορήγηση του φαρμάκου. Κατά το θηλασμό, σημαντική ποσότητα διγοξίνης απεκκρίνεται μέσω του μητρικού γάλακτος, οπότε χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή στα νεογνά.

5. Παιδιά: τα νεογέννητα παρουσιάζουν μεταβλητότητα στην ανθεκτικότητα στη διγοξίνη. Τα πρόωρα βρέφη είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στις επιπτώσεις της διγοξίνης και η δόση που θα τους χορηγηθεί, πρέπει να διαμορφωθεί ανάλογα με το βαθμό ωριμότητας. Τέλος, οι καρδιακοί γλυκοζίτες είναι δηλητηριώδεις σε περιπτώσεις που καταποθούν.

6.8 DLIS ⁷²⁻⁷⁴

Οι ανοσοδραστικές ουσίες που προσομοιάζουν με τη διγοξίνη (Digoxin-Like Immunoreactive Substances, DLIS) εντοπίστηκαν για πρώτη φορά το 1980 σε πειραματόζωα. Αργότερα, επιβεβαιώθηκε η παρουσία τους και σε ασθενείς που έπασχαν από ουραιμία, ιδιοπαθή (πρωτογενή) υπέρταση, υπέρταση οφειλόμενη σε διαταραχές ύδατος, ηπατική ή χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, σε μεταμοσχευμένους νεφρού/ήπατος, σε έγκυες γυναίκες με προεκλαμψία και σε πρόωρα βρέφη.

Ο ακριβής βιολογικός ρόλος των DLIS δεν έχει πλήρως κατανοηθεί. Σε γενικές γραμμές, αναστέλλουν τη λειτουργικότητα της Na^+/K^+ ATPάσης και συμμετέχουν στη ρύθμιση της ομοιόστασης ύδατος και νατρίου, οπότε συνιστούν κάποιο είδος νατριουρητικής ορμόνης.

Δομικά, αποτελούν μία ετερόκλητη ομάδα μορίων, που περιλαμβάνει μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια και λυσοφωσφολιπίδια. Το μοριακό βάρος τους κυμαίνεται περί τα 780 Da. Οι δομικές διαφορές μεταξύ DLIS και διγοξίνης είναι μικρές και αφορούν την περιοχή του λακτονικού δακτυλίου και το είδος του σακχάρου.

Τα DLIS μπορεί να είναι ενδογενούς ή εξωγενούς προέλευσης. Ενδογενώς, αποτελούν προϊόντα φλεγμονώδους αντίδρασης του οργανισμού, ενώ εξωγενώς, χορηγούνται είτε με τη μορφή φαρμάκων, όπως η σπειρολακτόνη και ο ενεργός μεταβολίτης της, η κανρενόνη, είτε ως παραδοσιακά κινέζικα βότανα.

Σε κάθε περίπτωση, η ύπαρξη τέτοιων ουσιών σε δείγματα, που προορίζονται για προσδιορισμό επιπέδων διγοξίνης, οδηγεί συνήθως σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Αυτό ισχύει κυρίως για τους ραδιοανοσοπροσδιορισμούς (Radioimmunoassays - RIA), οι οποίοι δεν είναι πλέον εμπορικά διαθέσιμοι για την ανάλυση της διγοξίνης, και δευτερευόντως για τη μέθοδο του πολωμένου ανοσοφθορισμού (Fluorescence Polarization Immunoassay - FPIA). Η ΜΕΙΑ (Microparticle Enzyme Immunoassay) αποτελεί τη μόνη μέθοδο που παράγει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, που μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένη υπερδοσολογία της διγοξίνης και τελικά σε τοξικό δακτυλιδισμό. Το θετικό είναι πως τα DLIS συνδέονται πολύ ισχυρά με τις πρωτεΐνες του ορού, σε αντίθεση με τη διγοξίνη που συνδέεται με τις πρωτεΐνες μόνο σε ποσοστό 25%. Επομένως οι παρεμποδίσεις μπορούν σχεδόν να εξαλειφθούν, αν η ανάλυση πραγματοποιηθεί σε υπερδιήθημα πλάσματος.

Μορφές - Περιεκτικότητες¹³:

- Δισκία 0,25mg
- Σταγόνες από του στόματος 0,75 mg/mL
- Ελιξήριο 0,05 mg/mL
- Ένεση 0,5 mg/amp

Μορφές προϊόντος	Χρόνος για να εμφανιστεί το αποτέλεσμα	Χρόνος για να κορυφωθεί το αποτέλεσμα
Δισκία	0,5 - 2 ώρες	2 - 6 ώρες
Σταγόνες από του στόματος	0,5 - 2 ώρες	2 - 6 ώρες
Έλιξήριο	0,5 - 2 ώρες	2 - 6 ώρες
Ένεση	5 - 30 λεπτά	1 - 4 ώρες

Πίνακας 6: Χρόνος εμφάνισης αποτελέσματος και χρόνος κορύφωσης αποτελέσματος για τις διάφορες μορφές χορήγησης διγοξίνης.

Ιδιοσκευάσματα:

- DIGOXIN/SANDOZ/Novartis: tab 0.25mg x 25,271
- LANOXIN/Glaxo: tab 0.25 mg x 25,198, elix, 0.05 mg/mL x 60 mL, 439
- GARDIGOX/ΙΦΕΤ: inj.sol 0.5 mg/amp x 6
- DIGOXIN/ΙΦΕΤ: elix.paed 0.05 mg/mL x 60mL



Εικόνα 37: Σκεύασμα διγοξίνης

Κεφάλαιο 7: Πειραματικό Μέρος

7.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μέτρηση των επιπέδων διγοξίνης σε 119 ασθενείς υπό θεραπεία με διγοξίνη, της Α' και Β' Καρδιολογικής Κλινικής του νοσοκομείου "Ο Ευαγγελισμός". Η μέτρηση των επιπέδων της διγοξίνης συμβάλλει στην εξατομίκευση της χορηγούμενης από τον κλινικό ιατρό αγωγής, με ρύθμιση των δόσεων του φαρμάκου, έτσι ώστε τα επίπεδα να ευρίσκονται εντός θεραπευτικού εύρους για να επιτευχθεί το βέλτιστο φαρμακολογικό αποτέλεσμα, χωρίς να υπάρχουν παρενέργειες λόγω τοξικότητας. Ο έλεγχος των επιπέδων της διγοξίνης στο πλάσμα ή στον ορό είναι ιδιαίτερα σημαντικός, διότι το φάρμακο αυτό έχει στενό θεραπευτικό παράθυρο (χαμηλό θεραπευτικό δείκτη - μικρή διαφορά ή αλληλοεπικάλυψη μεταξύ ανώτερων θεραπευτικών και τοξικών επιπέδων). Μάλιστα, σε περίπτωση υπερβολικής δόσης μπορεί να δώσει συμπτώματα που να μοιάζουν με την αρχική κατάσταση του ασθενούς. Η διγοξίνη είναι και θεραπεία αλλά και αιτία της υπερκοιλιακής ταχυκαρδίας. Η μέτρηση του επιπέδου της στον ορό ή στο πλάσμα θα δείξει, αν η αρρυθμία οφείλεται σε αυξημένη ή μειωμένη συγκέντρωση διγοξίνης στον οργανισμό. Επίσης, σε περιπτώσεις νεφρικής δυσλειτουργίας, η δόση της διγοξίνης χρειάζεται προσαρμογή.

Ο προσδιορισμός των επιπέδων της διγοξίνης στο αίμα, πραγματοποιήθηκε στους αναλυτές AxSYM Abbott και Architect i2000_{SR} Abbott με σκοπό την σύγκριση των μεθόδων, που εφαρμόζουν οι παραπάνω αναλυτές.

7.2. Δείγματα

Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν σε σωληνάρια χωρίς αντιπηκτικό (μετά K⁺/Li⁺ άλας EDTA ή ηπαρίνη), προωθήθηκαν στο Βιοχημικό Εργαστήριο, στο τμήμα Μέτρησης Επιπέδων Θεραπευτικών Φαρμάκων, όπου έγινε η καταγραφή τους μέσω του συστήματος LISORA με έκδοση εντολής για Digoxin και εκτύπωση των αντιστοίχων ετικετών επικόλλησης γραμμωτού κώδικα (barcode). Για τον σκοπό της μελέτης έγινε διπλός προγραμματισμός, δηλαδή Digoxin AxSYM και Digoxin Architect i2000_{SR} για τη διαδοχική μέτρηση των δειγμάτων και στους δύο αναλυτές.

Ο ορός διαχωρίστηκε από το πύγμα (θρόμβο και ερυθρά αιμοσφαίρια) όσο το δυνατόν πιο σύντομα μετά την αιμοληψία. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά, στις 4000 στροφές/λεπτό, αποχωρίστηκε ο ορός και μεταφέρθηκε στα αντίστοιχα επισημασμένα με ετικέτες φιαλίδια, ώστε να γίνει ο προσδιορισμός των επιπέδων του φαρμάκου και στους δύο αναλυτές. Από τα δείγματα που συλλέχθηκαν, απορρίφθηκαν εκείνα που ήταν λιπαιμικά και ισχυρά αιμολυμένα (με συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης [Hb]>750mg/dL).

7.3 Εξοπλισμός

Εξοπλισμός εργαστηρίου Μέτρησης Επιπέδων Θεραπευτικών Φαρμάκων:

- Πιπέτες Pasteur
- Ρυθμιζόμενες αυτόματες πιπέτες 50, 200, 1000μL (για την αραιώση των ορών που οι αυτόματες αραιώσεις των αναλυτών δεν επαρκούσαν για την ορθή μέτρησή τους)
- Φιαλίδια των 5 mL και αντίστοιχα καπάκια
- Ρύγχη πιπετών (tips)
- Stateau 50 θέσεων για φιαλίδια 5mL και πρωτογενή σωληνάρια
- Αναδευτήρας vortex
- Απλή φυγόκεντρος
- Γάντια μιας χρήσεως

Ειδικός εξοπλισμός αναλυτού AxSYM:

- **Διάλυμα λίπανσης ρύγχους:** είναι ένα διάλυμα, το οποίο περιέχει πλάσμα ανθρώπινης προέλευσης εμπλουτισμένο με ασβέστιο. Το εν λόγω διάλυμα είναι απαραίτητο σε ορισμένες διαδικασίες συντήρησης για την προετοιμασία του ρύγχους του δειγματολήπτη δειγμάτων μετά τον καθαρισμό, προκειμένου να αποφεύγεται η μη ειδική σύνδεση οποιουδήποτε αναλύτη στο ρύγχος.
- **Υποδοχείς αντίδρασης (Reaction Vessels-RVs):** αποτελούν περιέκτες μια χρήσης, μέσα στους οποίους γίνεται η αντίδραση τύπου ΜΕΙΑ.

- **Υποδοχείς (racks)** 10 θέσεων φιαλιδίων ή πρωτογενών σωληναρίων.
- **Matrix cells:** πλέγμα υάλονήματος
- **Ποτηράκια (cups)** για μικρές ποσότητες ορού

Ειδικός εξοπλισμός αναλυτού Architect i2000_{SR}:

- **Διαφράγματα και βοηθητικά πώματα (septa):** τα διαφράγματα είναι μεμβράνες με σχισμές, που χρησιμοποιούνται για να αποτραπεί η εξάτμιση και η επιμόλυνση των αντιδραστηρίων και για να διασφαλιστεί η ακεραιότητα τους.
- **Διάλυμα λίπανσης ρύγχους:** είναι ένα διάλυμα, το οποίο περιέχει πλάσμα ανθρώπινης προέλευσης εμπλουτισμένο με ασβέστιο. Το εν λόγω διάλυμα είναι απαραίτητο σε ορισμένες διαδικασίες συντήρησης για την προετοιμασία του ρύγχους του δειγματολήπτη δειγμάτων μετά τον καθαρισμό, προκειμένου να αποφεύγεται η μη ειδική σύνδεση οποιουδήποτε αναλύτη στο ρύγχος.
- **Υποδοχείς αντίδρασης (Reaction Vessels-RVs):** αποτελούν περιέκτες μια χρήσης, μέσα στους οποίους γίνεται η αντίδραση τύπου CMIA.
- **Υποδοχείς (racks)** 5 θέσεων φιαλιδίων ή πρωτογενών σωληναρίων
- **Ποτηράκια (cups)** για μικρές ποσότητες ορού.

7.4 Αντιδραστήρια

Αντιδραστήρια αναλυτή AxSYM:

- I. Πακέτο (Kit) αντιδραστηρίων (για 100 αναλύσεις):
 - Μικροσωματίδια: ένα φιαλίδιο (7,6 mL) με μικροσωματίδια latex επενδυμένα με αντίσωμα έναντι της διγοξίνης, σε ρυθμιστικό διάλυμα TRIS με σταθεροποιητική πρωτεΐνη. Συντηρητικό: Νατραζίδιο
 - Συνδετικό αντίσωμα επισημασμένο με ένζυμο: ένα φιαλίδιο (15,0 mL) που περιέχει δεύτερο αντίσωμα έναντι της διγοξίνης (από αντισώματα κουνελιών) συζευγμένο με ένζυμο αλκαλικής φωσφατάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα TRIS,

με σταθεροποιητική πρωτεΐνη. Ελάχιστη συγκέντρωση 0.05 µg/ mL.
Συντηρητικό: Νατραζίδιο και αντιμικροβιακοί παράγοντες

- Αραιωτικό διάλυμα της αντίδρασης: ένα φιαλίδιο (10,0 mL) διαλύματος που περιέχει 0.1M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Συντηρητικό: Νατραζίδιο και αντιμικροβιακοί παράγοντες

II. Άλλα αντιδραστήρια (αναλώσιμα διαλύματα)

- Ενζυμικό υπόστρωμα MUP: (4-Methylubelliferyl Phosphate) 1.2M σε ρυθμιστικό διάλυμα AMP. Συντηρητικό: Νατραζίδιο
- Διάλυμα έκπλυσης των πλεγμάτων υαλονήματος (matrix cell): περιέχει διάλυμα 0.3M NaCl σε ρυθμιστικό διάλυμα TRIS. Συντηρητικό: Νατραζίδιο και αντιμικροβιακοί παράγοντες
- Διάλυμα έκπλυσης (Wash buffer): περιέχει PBS (Phosphate buffered saline-αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών).
- Υγρό καθαρισμού πιπेटών (probes) λήψεως δείγματος και αντιδραστηρίου (Probe cleaning solution): περιέχει 2% υδροξείδιο του τετρααιθυλαμμωνίου.

Αντιδραστήρια αναλυτή Architect i2000_{SR}:

I. Πακέτο (Kit) αντιδραστηρίων (για 100 αναλύσεις):

- Μικροσωματίδια: ένα φιαλίδιο (6,6 mL) εναιωρήματος παραμαγνητικών μικροσωματιδίων επικαλυμμένων με αντίσωμα έναντι της διγοξίνης (από μονοκλωνικά αντισώματα ποντικών), σε ρυθμιστικό διάλυμα TRIS με σταθεροποιητική πρωτεΐνη (βοοειδών). Συντηρητικό: ProClin 300
- Συζευκτικό διάλυμα: ένα φιαλίδιο (5,9 mL) διγοξιγενίνης επισημασμένης με ακριδίνιο σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού άλατος. Συντηρητικό: ProClin 300
- Αραιωτικό διάλυμα της αντίδρασης: ένα φιαλίδιο (10,0 mL) διαλύματος που περιέχει ορό αίγας με δινάτριο EDTA (Na₂EDTA) . Συντηρητικό: ProClin 300 και 950

II. Άλλα αντιδραστήρια (Αναλώσιμα διαλύματα):

- Διάλυμα αρχικής φωτοενεργοποίησης (pre-trigger): περιέχει 1,32% (w/v) υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂).
- Διάλυμα φωτοενεργοποίησης (trigger): περιέχει διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) 0,35N.
- Διάλυμα έκπλυσης (Wash buffer): περιέχει PBS (Phosphate buffered saline-αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών).
- Αραιωτικό διάλυμα για τις μη αυτόματες αραιώσεις δειγμάτων με συγκέντρωση φαρμάκων πέραν του ορίου γραμμικότητας της μεθόδου (multi-assay manual diluent): περιέχει PBS (Phosphate buffered saline-αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών).
- Υγρό καθαρισμού πιπτετών (probes) λήψεως δείγματος και αντιδραστηρίου (Probe cleaning solution): περιέχει 2% υδροξειδίου του τετραεθυλαμμωνίου.

7.5 Προετοιμασία της εξέτασης

Τα δείγματα πριν εισέλθουν στους αναλυτές ελέγχονται ώστε να μην περιέχουν φυσαλίδες. Σε περίπτωση που υπάρχουν φυσαλίδες, απομακρύνονται με ένα σιφώνιο αναρρόφησης (πιπέτα pasteur). Στη συνέχεια τα φιαλίδια με τον ορό τοποθετούνται στους υποδοχείς (racks) του αναλυτή AxSYM και μεταφέρονται στο κέντρο δειγματοληψίας του. Μετά το τέλος της μέτρησης των επιπέδων του Digoxin στον AxSYM, τα δείγματα μεταφέρονται με αντίστοιχο τρόπο στον αναλυτή Architect i2000_{SR} για μέτρηση των επιπέδων του Digoxin και στον Architect i2000_{SR}.

Μετά από κάθε τοποθέτηση νέου αντιδραστηρίου στους αναλυτές δημιουργείται καμπύλη βαθμονόμησης της εξέτασης. Επίσης πριν από την ανάλυση των δειγμάτων γίνεται εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος της εξέτασης με ορούς ελέγχου, των οποίων οι συγκεντρώσεις πρέπει να βρίσκονται μέσα στο εύρος τιμών, που δίνεται από την εταιρεία.

7.6 Βαθμονόμηση

Και οι δύο αναλυτές (AxSYM και Architect i2000_{SR}) χρησιμοποιούν την διαδικασία πρότυπης βαθμονόμησης 6 σημείων για την εξέταση της διγοξίνης. Για να πραγματοποιηθεί η πρότυπη βαθμονόμηση, μετρούνται οι πρότυποι βαθμονομητές A, B, C, D, E και F εις διπλούν. Τα έξι φιαλίδια που περιέχουν τους βαθμονομητές (4mL) περιέχουν ορό υγιών ατόμων και διγοξίνη σε διάφορες συγκεντρώσεις. Για την αξιολόγηση της καμπύλης βαθμονόμησης μετρώνται μια φορά τα πρότυπα ελέγχου διγοξίνης όλων των επιπέδων.

Αν η καμπύλη βαθμονόμησης γίνει αποδεκτή, αποθηκεύεται από τον αναλυτή. Η βαθμονόμηση επαναλαμβάνεται μόνο εάν:

- Χρησιμοποιηθεί κουτί αντιδραστηρίων από νέα παρτίδα.
- Οι τιμές των προτύπων ορών ελέγχου (controls) βρίσκονται εκτός εύρους τιμών.

Οι ανθρώπινοι οροί που έχουν χρησιμοποιηθεί για τους βαθμονομητές και τους ορούς ελέγχου έχουν προηγουμένως και αυτοί ελεγχθεί για αιματογενώς μεταδιδόμενα νοσήματα και συγκεκριμένα για ηπατίτιδα Β (HBsAg), ηπατίτιδα C (anti- HCV) και για τον HIV (HIV-1 RNA ή HIV-1Ag, anti- HIV-1/ HIV-2) σύμφωνα με κριτήρια του OSHA (Occupation Safety & Health Administration).^{75,76}

7.7 Διαδικασίες ελέγχου ποιότητας

Χρησιμοποιούνται τρία επίπεδα προτύπων ορών ελέγχου (controls) για τον έλεγχο υποθεραπευτικών, θεραπευτικών καθώς και τοξικών τιμών του φαρμάκου. Ο συνιστώμενος έλεγχος των αποτελεσμάτων για την εξέταση της διγοξίνης περιλαμβάνει την εξέταση δύο τουλάχιστον επιπέδων προτύπων ορών ελέγχου διγοξίνης μια φορά ανά 24 ώρες, κάθε ημέρα λειτουργίας.

Όταν η τιμή ενός προτύπου ορού ελέγχου διγοξίνης βρίσκεται εκτός του καθορισμένου (από την εταιρεία) εύρους τιμών, πιθανόν να σημαίνει ότι τα αντιδραστήρια είναι ακατάλληλα ή ότι έγιναν λάθη στη μεθοδολογία της εξέτασης. Τα σχετικά αποτελέσματα ενδέχεται να μην είναι αποδεκτά και να χρειάζονται επανάληψη της ανάλυσης. Πραγματοποιείται επανάληψη της βαθμονόμησης της εξέτασης.

Παράλληλα πραγματοποιείται και εξωτερικός έλεγχος ποιότητας των μεθόδων προσδιορισμού της διγοξίνης, ΜΕΙΑ και CMIA με άγνωστα δείγματα ελέγχου στα οποία μετρώνται τα επίπεδα της διγοξίνης και των οποίων τα αποτελέσματα αποστέλλονται στο εξωτερικό προς αξιολόγηση.

7.8 Περιορισμοί της διαδικασίας μέτρησης της διγοξίνης με ανοσοπροσδιορισμούς

- Δείγματα από ασθενείς που έχουν λάβει μονοκλωνικά αντισώματα ποντικών για διάγνωση ή θεραπεία, μπορεί να περιέχουν HAMA (human antimouse antibodies). Αυτά τα δείγματα μπορεί να δίνουν εσφαλμένες τιμές, όταν προσδιορίζονται με μεθόδους, που επίσης χρησιμοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα ποντικών.
- Κάποιοι ανοσοπροσδιορισμοί για τον προσδιορισμό της διγοξίνης μπορεί να δίδουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με μεταβολίτες και να οδηγούν σε θετικά σφάλματα στις λαμβανόμενες τιμές.
- Τα επίπεδα της διγοξίνης μπορεί επίσης να προσδιορίζονται εσφαλμένα, σε περίπτωση που ο ασθενής έχει λάβει θεραπεία με DigiFab ή DigiBind.
- Διακύμανση των τιμών στα δείγματα μπορεί να προκληθούν από ετεροφιλικά αντισώματα στον ανθρώπινο ορό. Τα ετεροφιλικά αντισώματα μπορούν να αντιδράσουν με τις ανοσοσφαιρίνες του αντιδραστηρίου και να παρέμβουν στον in vitro ανοσοπροσδιορισμό.
- Η παρουσία ενδογενών ή εξωγενών ανοσοδραστικών ουσιών, που προσομοιάζουν τη διγοξίνη (Digoxin - Like Immunoreactive Substances - DLIS), παρεμβαίνουν στις μετρήσεις των ανοσοπροσδιορισμών εμφανίζοντας ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Σε κάθε περίπτωση, τα αποτελέσματα της διγοξίνης που λαμβάνονται από τον ανοσοπροσδιορισμό θα πρέπει να συνάδουν με την κλινική εικόνα και το ιστορικό του ασθενούς και να μην αξιολογούνται μεμονωμένα.

7.9 Προσδιορισμός διγοξίνης με ΜΕΙΑ στον AxSYM (Abbott) ⁷⁷

Η ανάλυση του AxSYM Digoxin II ακολουθεί την μέθοδο ανοσοπροσδιορισμού ΜΕΙΑ για τον ποσοτικό προσδιορισμό της διγοξίνης στον ανθρώπινο ορό ή πλάσμα.

Σε πρώτη φάση οι σύριγγες δειγματοληψίας του προς ανάλυση υγρού κι οι σύριγγες αναρρόφησης αντιδραστηρίων αναμειγνύουν δείγμα και αντιδραστήρια στις διάφορες θέσεις του υποδοχέα αντίδρασης RV. Μετά τη μεταφορά του υποδοχέα αντίδρασης RV στο κέντρο επεξεργασίας δειγμάτων με τη βοήθεια του ρύγχους επεξεργασίας, γίνονται περαιτέρω αναρροφήσεις. Καθορισμένος όγκος δείγματος, εναιωρήματος επικαλυμμένων με αντισώματα έναντι της διγοξίνης μικροσωματιδίων και αραιωτικού buffer αποτελούν το μίγμα της αντίδρασης και επωάζονται σε μια από τις θέσεις του υποδοχέα αντίδρασης, οπότε η διγοξίνη προσδένεται στα επικαλυμμένα με αντισώματα έναντι της διγοξίνης μικροσωματίδια και σχηματίζεται το σύμπλοκο αντισώματος – αντιγόνου.

Καθορισμένος όγκος από το μίγμα της αντίδρασης μεταφέρεται στο υαλογενές πλέγμα (matrix cell) και το δίκτυο των υαλονημάτων συνδέει μη αντιστρεπτά τα μικροσωματίδια. Ακολουθεί η έκπλυση του υαλογενούς πλέγματος και απομακρύνεται το μη συζευγμένο αντιδραστήριο. Το ειδικό έναντι της διγοξίνης αντίσωμα, που αναγνωρίζει άλλον σε απομακρυσμένο σημείο αντιγονικό επίτοπο, διαφορετικό από το πρώτο αντίσωμα, έχει επισημανθεί με αλκαλική φωσφατάση, διαχέεται στο υαλογενές πλέγμα και προσδενόμενο στο σύμπλοκο αντισώματος – αντιγόνου, σχηματίζει sandwich. Ακολουθεί και νέα έκπλυση του υαλογενούς πλέγματος και απομακρύνεται το μη συζευγμένο αντιδραστήριο.

Το υπόστρωμα της αλκαλικής φωσφατάσης, ο φωσφορικός εστέρας της 4- μεθυλο-ουμπελλιφερόνης MUP, μεταφέρεται στο υαλογενές πλέγμα και μετατρέπεται σε φθορίζουσα μεθυλο-ουμπελλιφερόνη, που εκπέμπει ακτινοβολία στα 448 nm. Ένα σύστημα διπλού φίλτρου επιτρέπει τη διέλευση ενός μόνον μήκους κύματος της ακτινοβολίας εκπομπής και η ένταση αυτού του εκπεμπόμενου φωτός, που κατευθύνεται στο φωτοπολλαπλασιαστή ενισχύεται και μετράται.

Αναλυτικά χαρακτηριστικά του προσδιορισμού της διγοξίνης με την μέθοδο ΜΕΙΑ στον AxSYM:

- Ακρίβεια: Ο αναλυτής έχει σχεδιαστεί, ώστε να έχει ακρίβεια προσδιορισμού $\leq 10\%$ του συνολικού CV (Coefficient of Variation).

- Ανάκτηση: Ο αναλυτής έχει σχεδιαστεί, ώστε να έχει τιμή μέσης ανάκτησης $100\pm 10\%$.
- Γραμμικότητα αραίωσης: Ο αναλυτής έχει σχεδιαστεί, ώστε να έχει μέση απόκλιση από τη γραμμικότητα $\pm 10\%$ για συγκεντρώσεις πάνω από 1.0 ng/mL ή ± 0.1 ng/mL για συγκεντρώσεις μικρότερες από 1.0 ng/mL.
- Ευαισθησία: ορίζεται ως η χαμηλότερη μετρήσιμη συγκέντρωση, που με όριο εμπιστοσύνης 95% μπορεί να διαφοροποιηθεί του μηδενός. Ο αναλυτής έχει σχεδιαστεί να έχει χαμηλότερο όριο ανίχνευσης (LoD) ≤ 0.3 ng/mL. Ως χαμηλότερο όριο ανίχνευσης ορίζουμε εμπειρικά τη μικρότερη συγκέντρωση της προς προσδιορισμό ουσίας, που χρησιμοποιείται στην καμπύλη βαθμονόμησης.
- Εξειδίκευση: αναφέρεται στην ικανότητα του ανοσοπροσδιορισμού να αποκρίνεται μόνο στην ουσία, για την οποία σχεδιάστηκε και να μην επηρεάζεται από την παρουσία άλλων ουσιών στο αναλυόμενο δείγμα. Μέτρο της εξειδίκευσης είναι η διασταυρούμενη δραστικότητα, η οποία εξετάστηκε για μεγάλο αριθμό ενεργών μεταβολιτών της διγοξίνης, για ενώσεις με παρόμοια δομή και για ενώσεις που πιθανόν να χορηγούνται ταυτόχρονα με τη διγοξίνη, έτσι ώστε να διαπιστωθεί αν επηρεάζουν τον ποσοτικό προσδιορισμό της διγοξίνης στο συγκεκριμένο αναλυτή.

Οι ενώσεις που συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα, αποδείχθηκε πειραματικά, ότι παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό, σε ποσοστό μικρότερο του 10%:

Πιθανές παρεμποδίζουσες ενώσεις	Συγκέντρωση παρεμποδίζουσας ένωσης
Χολερυθρίνη (bilirubin)	20 mg/dL
Αιμοσφαιρίνη (Hb)	750 mg/dL
Τριγλυκερίδια (για λιπαιμικό ορό)	2500 mg/dL
Λευκώματα	3 -12 g/dL

Πίνακας 7: Ουσίες οι οποίες όταν προστέθηκαν σε ανθρώπινο ορό παρουσίασαν σφάλμα μικρότερο του 10% κατά την ανίχνευση της προστιθέμενης φαρμακευτικής ουσίας με την εξέταση AxSYM Digoxin II

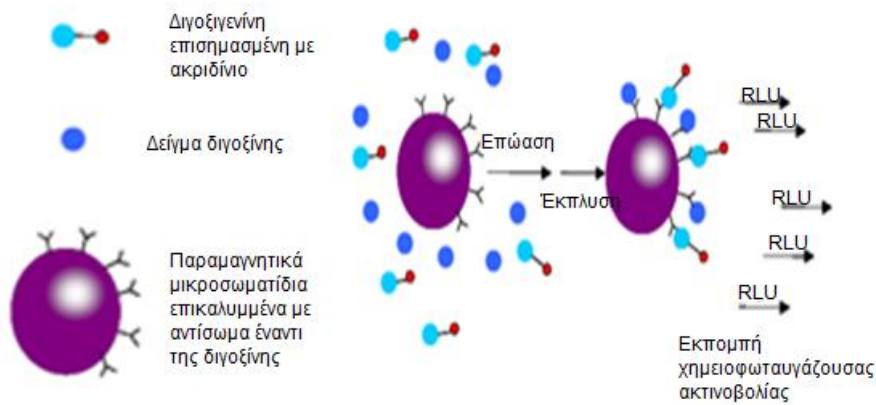
Αρκετά φάρμακα προκαλούν σημαντικά αρνητικά σφάλματα στον προσδιορισμό της διγοξίνης όπως το διουρητικό σπειρονολακτόνη (-33%), ο ανταγωνιστής της αλδοστερόνης κανρενόνη (-41%), σε υψηλές συγκεντρώσεις η υδροξυκορτιζόλη (-38%), τα κορτικοστεροειδή πρεδνισολόνη (-27%), μεθυλοπρεδνισολόνη (-7%), δεξαμεθαζόνη (-15%), η στεροειδής ορμόνη προγεστερόνη (-33%).

Τα επίπεδα της διγοξίνης σε ασθενείς, που έχουν λάβει θεραπεία με DigiFab ή DigiBind σε δόση υψηλή, η οποία δεσμεύει ολόκληρη την ποσότητα διγοξίνης του οργανισμού μετρώνται κοντά στην αναλυτική ευαισθησία της μεθόδου 0.3 ng/mL. Εάν η δόση των DigiFab ή DigiBind είναι χαμηλή και δεσμεύει ένα μέρος μόνον της ποσότητας της διγοξίνης του οργανισμού, μπορεί να λαμβάνονται υψηλότερες τιμές διγοξίνης. Πρέπει να τονιστεί, ότι η μέθοδος ΜΕΙΑ μετρά μόνον τη διγοξίνη, που δεν είναι συνδεδεμένη πάνω στο αντίσωμα DigiFab ή DigiBind.

7.10 Προσδιορισμός διγοξίνης με CMIA στον Architect i2000SR (Abbott)⁷⁸

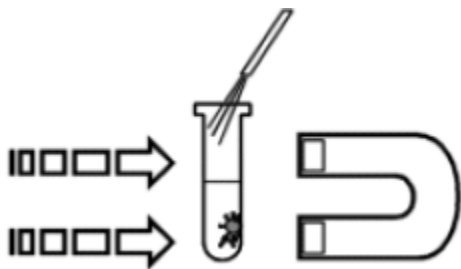
Η ανάλυση του Architect iDigoxin είναι ένας ανοσοπροσδιορισμός ανταγωνιστικού τύπου ενός σταδίου, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της διγοξίνης στον ανθρώπινο ορό ή πλάσμα χρησιμοποιώντας τεχνικές CMIA, με ευέλικτα πρωτόκολλα ανάλυσης γνωστά ως Chemiflex :

Σε ένα στάδιο, το δείγμα, τα παραμαγνητικά σωματίδια επικαλυμμένα με το ειδικό αντίσωμα έναντι της διγοξίνης και η διγοξιγενίνη επισημασμένη με ακριδίνιο αναμιγνύονται και επωάζονται στον υποδοχέα αντίδρασης (RV). Στην ισορροπία της ανοσολογικής αντίδρασης, η διγοξίνη που υπάρχει στο δείγμα ανταγωνίζεται την επισημασμένη με ακριδίνιο διγοξιγενίνη για την κατάληψη θέσεων σύνδεσης του ειδικού αντισώματος, που επικαλύπτει τα παραμαγνητικά σωματίδια.



Εικόνα 38: Αρχή μεθόδου του αναλυτού Architect i2000_{SR}

Μετά τη επώαση, ένας μαγνήτης έλκει τα παραμαγνητικά σωματίδια προς ένα τοίχωμα του υποδοχέα αντίδρασης (RV) και στη συνέχεια το μίγμα των αντιδρώντων εκπλύνεται επανειλημμένα, ώστε να απομακρυνθούν οι μη συνδεδεμένες ουσίες.



Εικόνα 39: Μαγνήτης έλκει τα παραμαγνητικά σωματίδια

Το ακροφύσιο διαλύματος αρχικής φωτοενεργοποίησης διανέμει το διάλυμα αρχικής φωτοενεργοποίησης (Pre-Trigger) και το σύστημα οπτικών CMIA διεξάγει ανάγνωση τυφλού. Το διάλυμα αρχικής φωτοενεργοποίησης διενεργεί τις εξής λειτουργίες:

- Δημιουργεί όξινο περιβάλλον, έτσι ώστε να αποτραπεί η πρόωρη απελευθέρωση ενέργειας (εκπομπή φωτός).
- Συμβάλλει στην αποτροπή σχηματισμού συσσωμάτων.
- Διασπά τη χρωστική ακριδίνης και την απομονώνει από το συνδετικό διάλυμα, που έχει συνδεθεί στο σύμπλεγμα μικροσωματιδίων. Με αυτόν τον τρόπο, η χρωστική ακριδίνης προετοιμάζεται για το επόμενο στάδιο.

Το ακροφύσιο του διαλύματος φωτοενεργοποίησης κατανέμει διάλυμα φωτοενεργοποίησης (Trigger) στο μίγμα της αντίδρασης. Η ακριδίνη οξειδώνεται όταν εκτίθεται σε υπεροξείδιο και σε αλκαλικό διάλυμα. Αυτή η αντίδραση οδηγεί σε χημειοφωταυγάζουσα αντίδραση. Σχηματίζεται N-μεθυλοακριδόνη και απελευθερώνεται ενέργεια (εκπομπή φωτός) καθώς επανέρχεται στη θεμελιώδη κατάστασή της (κατάσταση ελάχιστης ενέργειας).

Το σύστημα οπτικών CMIA μετρά την εκπομπή χημειοφωταύγειας (ενεργοποιημένη μέτρηση) σε ένα προκαθορισμένο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε να προσδιοριστεί ποσοτικά η συγκέντρωση της διγοξίνης.

Η οπτική μέτρηση είναι η διαδικασία που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των RLUs (Relative Light Units - σχετικών μονάδων φωτεινότητας) και τη μετατροπή τους στη συνέχεια σε μονάδες συγκέντρωσης διγοξίνης ng/ml. Στα θέματα περί οπτικής μέτρησης συμπεριλαμβάνονται:

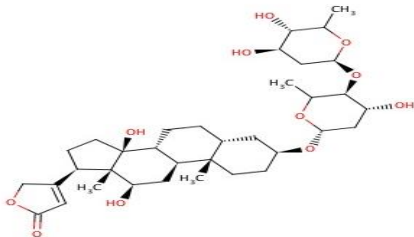
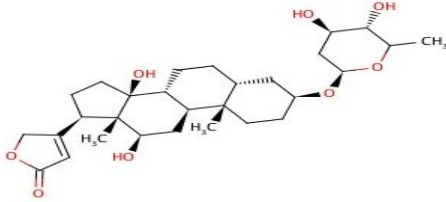
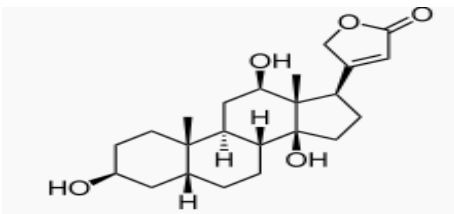
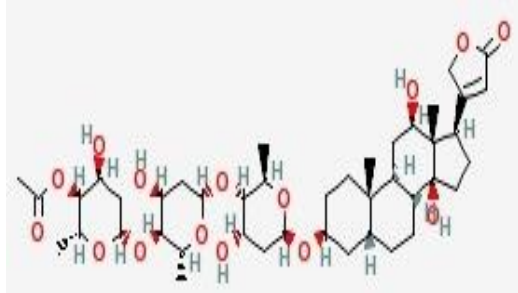
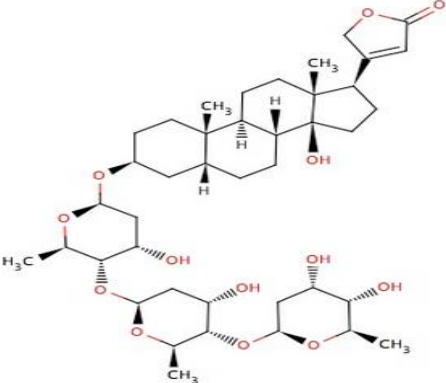
- Αλληλουχία συστήματος οπτικών και μέτρησης: το οπτικό σύστημα στη μονάδα επεξεργασίας είναι ένα σύστημα που κατευθύνει την εκπομπή χημειοφωταύγειας από τον υποδοχέα αντίδρασης στη συσκευή μέτρησης CMIA.
- Υπολογισμός αναγωγής δεδομένων.

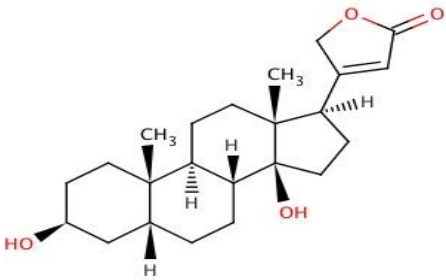
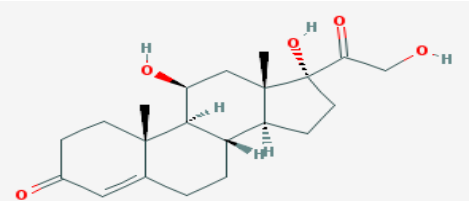
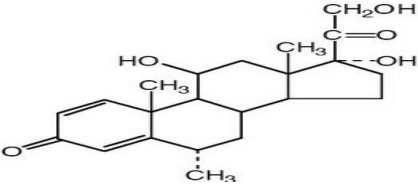
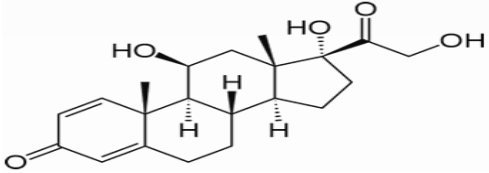
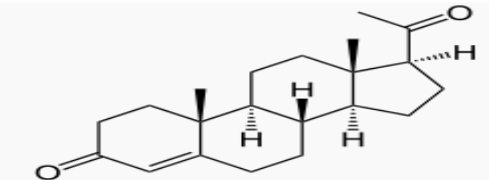
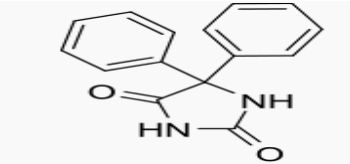
Κατά τη διεξαγωγή του υπολογισμού αναγωγής δεδομένων το σύστημα:

1. Αθροίζει το σήμα που μετρήθηκε από το σύστημα οπτικών CMIA.
2. Επαληθεύει ότι:
 - i. Οι μετρήσεις τυφλού εμπίπτουν σε αποδεκτό εύρος τιμών
 - ii. Το προφίλ της ενεργοποιημένης ένδειξης μέτρησης εμπίπτει σε ένα αποδεκτό σύνολο από εύρη τιμών
3. Αφαιρεί τις μετρήσεις του τυφλού από τις μετρήσεις ενεργοποιημένης ένδειξης μέτρησης προκειμένου να υπολογίσει την τελική ένδειξη μέτρησης και να τη μετατρέψει σε μονάδες συγκέντρωσης. Η τελική ένδειξη μέτρησης (RLUs) είναι αντιστρόφως ανάλογη με την συγκέντρωση της διγοξίνης στο δείγμα.

Αναλυτικά χαρακτηριστικά του προσδιορισμού της διγοξίνης με την μέθοδο CMIA στον Architect i2000_{SR}:

- Ακρίβεια: Ο αναλυτής έχει σχεδιαστεί ώστε να έχει ακρίβεια προσδιορισμού $\leq 10\%$ του συνολικού CV (Coefficient of Variation).
- Ανάκτηση: Ο αναλυτής έχει σχεδιαστεί ώστε να έχει τιμή μέσης ανάκτησης $100 \pm 10\%$.
- Γραμμικότητα αραίωσης: Ο αναλυτής έχει σχεδιαστεί ώστε να έχει μέση απόκλιση από τη γραμμικότητα $\pm 10\%$ για συγκεντρώσεις πάνω από 1.0 ng/mL ή ± 0.1 ng/mL για συγκεντρώσεις μικρότερες από 1.0 ng/mL.
- Ευαισθησία: ορίζεται ως η χαμηλότερη μετρήσιμη συγκέντρωση με όριο εμπιστοσύνης 95%, που μπορεί να διαφοροποιηθεί του μηδενός. Ο αναλυτής έχει σχεδιαστεί να έχει χαμηλότερο όριο ανίχνευσης (LoD) ≤ 0.3 ng/mL. Ως χαμηλότερο όριο ανίχνευσης ορίζουμε εμπειρικά τη μικρότερη συγκέντρωση της προς προσδιορισμό ουσίας, που χρησιμοποιείται στην καμπύλη βαθμονόμησης.
- Εξειδίκευση: αναφέρεται στην ικανότητα του ανοσοπροσδιορισμού να αποκρίνεται μόνο στην ουσία για την οποία σχεδιάστηκε και να μην επηρεάζεται από την παρουσία άλλων ουσιών στο αναλυόμενο δείγμα. Μέτρο της εξειδίκευσης είναι η διασταυρούμενη δραστικότητα, η οποία εξετάστηκε για μεγάλο αριθμό ενεργών μεταβολιτών της διγοξίνης, για ενώσεις με παρόμοια δομή και για ενώσεις που πιθανόν να χορηγούνται ταυτόχρονα με τη διγοξίνη, έτσι ώστε να διαπιστωθεί αν επηρεάζουν τον ποσοτικό προσδιορισμό της διγοξίνης στο συγκεκριμένο αναλυτή.

Ένωση	Δομή	Λειτουργία
<p>digoxigenin bis-digitoxoside (C₃₅H₅₄O₁₁)</p>		<p>Μεταβολίτης της διγοξίνης</p>
<p>digoxigenin mono-digitoxoside (C₂₉H₄₄O₈)</p>		<p>Μεταβολίτης της διγοξίνης</p>
<p>Διγοξιγενίνη (C₂₃H₃₄O₅)</p>		<p>Στεροειδές της διγοξίνης</p>
<p>Ακετυλοδιγοξίνη (C₄₃H₆₆O₁₅)</p>		<p>Παράγωγο της διγοξίνης</p>
<p>Διγοτοξίνη (C₄₁H₆₄O₁₃)</p>		<p>Καρδιακές γλυκοσίδες</p>

<p>Διγοτοξιγενίνη (C₂₃H₃₄O₄)</p>		<p>Καρδενολίδιο, το άγλυκο μέρος των φυτικών καρδιακών γλυκοσίδων</p>
<p>Υδροκορτιζόνη (C₂₁H₃₀O₅)</p>		<p>Βραχείας δράσης γλυκοκορτικοειδή</p>
<p>Μεθυλοπρεδνιζόλη (C₂₂H₃₀O₅)</p>		<p>Ενεργοποιητής των μηχανισμών της απόπτωσης</p>
<p>Πρεδνιζόλη (C₂₁H₂₈O₅)</p>		<p>Συνθετικό γλυκοκορτικοειδές</p>
<p>Προγεστερόνη (C₂₁H₃₀O₂)</p>		<p>Ενδογενής στεροειδής ορμόνη</p>
<p>Φαινυτοΐνη (C₁₅H₁₂N₂O₂)</p>		<p>Αντιεπιληπτικό</p>

Πίνακας 8: Ενώσεις που εξετάστηκαν για αντιδράσεις διασταυρούμενης δραστηριότητας με τη διγοξίνη

Η διασταυρούμενη δραστικότητα προσδιορίστηκε από τον παρακάτω τύπο:

$\% \text{Διασταυρούμενη Δραστικότητα} = (\text{μετρούμενη τιμή ένδειξης που εμπλουτίστηκε με δοκιμαστική ένωση} - \text{μετρούμενη τιμή του δείγματος ελέγχου}) / (\text{συγκέντρωση της δοκιμαστικής ένωσης})$

$$\% \Delta. \Delta = \frac{C_{\text{μετρούμενη}} - C_{\text{control}}}{C_{\text{δ.ε}}}$$

- Παρεμποδίζουσες ενώσεις: Οι ενώσεις που αποδείχθηκε πειραματικά ότι παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό συνοφίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πιθανές παρεμποδίζουσες ενώσεις	Interferent concentration	Ποσοστό ανάκτησης %
Χολερυθρίνη (bilirubin)	20 mg/dL	98.9-103.1
Αιμοσφαιρίνη (Hb)	750 mg/dL	100.0-103.2
Τριγλυκερίδια (για λιπαιμικό ορό)	2500 mg/dL	98.4-105.6
HAMA	1000 ng/dL	98.1-101.6
Ρευματοειδής παράγοντας (Rf)	500 IU/mL	97.1-102.5
Χαμηλή συγκέντρωση λευκωμάτων	3 g/dL	94.3-106.8
Υψηλή συγκέντρωση λευκωμάτων	12 g/dL	97.6-109.8

Πίνακας 9: Ουσίες οι οποίες όταν προστέθηκαν σε ανθρώπινο ορό παρουσίασαν σφάλμα μικρότερο του 10% κατά την ανίχνευση της προστιθέμενης φαρμακευτικής ουσίας με την εξέταση Architect iDioxin

Σημειώνεται ότι σε αντίθεση με τον AxSYM, ο Architect δε δημιουργεί σημαντικά αρνητικά σφάλματα στον προσδιορισμό της διγοξίνης παρουσία άλλων φαρμάκων όπως η σπείρονολακτόνη και η κανρενόνη.⁷⁹

Παρακάτω παρατίθεται ένας συγκεντρωτικός πίνακας των χαρακτηριστικών του προσδιορισμού της διγοξίνης στους δύο αναλυτές που χρησιμοποιήθηκαν:

Στοιχεία φυλλαδίων της εταιρείας	AxSYM	Architect i2000 _{SR}
Μέθοδος	ΜΕΙΑ	CMIA
Κατηγορία ανοσοπροσδιορισμού	Μη ανταγωνιστικού τύπου	Ανταγωνιστικού τύπου
Στερεή φάση	Μικροσωματίδια latex	Παραμαγνητικά μικροσωματίδια
Ιχνηθέτης	Αλκαλική φωσφατάση	Ακριδίνιο
Εύρος ανάλυσης	0.3-4.0 ng/ml	0.3-4.0 ng/ml
Καμπύλη βαθμονόμησης	6 σημείων (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0)	6 σημείων (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0)
Οροί ελέγχου (ng/ml)	L 0,9 (0,60-1,20) M 1.9 (1.43-2.38) H 3.2 (2.50-3.90)	L 0.58 (0.47-0.70) M 1.67 (1.34-2.00) H 3.5 (2.80-4.20)
Όγκος δείγματος	194 μl	100 μl
Αναλυτική ευαισθησία LoD	0.3 ng/ml	0.3 ng/ml
Σχέση συγκέντρωσης-σήματος	Ευθέως ανάλογη	Αντιστρόφως ανάλογη
Είδος μετρούμενης ακτινοβολίας	Φθορισμός	Χημειοφωταύγεια

Πίνακας 10: Χαρακτηριστικά του προσδιορισμού της διγοξίνης στους αναλυτές AxSYM και Architect i2000_{SR}.

Κεφάλαιο 8: Αποτελέσματα

8.1 Εισαγωγή

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα LISORA, που αποτελεί το LIS (Laboratory Information System) του Βιοχημικού εργαστηρίου καθώς και με την εφαρμογή Medcalc, η οποία διαθέτει την ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης κατά Passing – Bablok.⁸⁰

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων της διγοξίνης με τις δύο μεθοδολογίες MEIA και CMIA που περιγράφησαν στα προηγούμενα κεφάλαια, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του πρωτόκολλου αξιολόγησης (Evaluation Protocol) EP9-A2 του CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline.⁸¹

Από τα αποτελέσματα των 119 δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν για την σύγκριση των δύο μεθόδων τα 104. Τα αποτελέσματα των υπόλοιπων 15 δειγμάτων αποκλείστηκαν της στατιστικής επεξεργασίας για λόγους, που θα αναφερθούν παρακάτω.

Κατ' αρχήν προσδιορίστηκαν οι ακόλουθες παράμετροι και για τις δύο σειρές αποτελεσμάτων (MEIA – AxSYM και CMIA – Architect i2000_{SR}): ο **αριθμός των δειγμάτων** (N), η **διάμεσος τιμή** (median, M) που είναι η μεσαία κατά μέγεθος τιμή, η **μέση τιμή** (mean value) που είναι η τιμή που αντιπροσωπεύει το κέντρο της κατανομής των δεδομένων, η **μέγιστη τιμή**, η **ελάχιστη τιμή**, η **τυπική απόκλιση** (standard deviation, s), και το **τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής** (standard error of the mean, SE).

Η εύρεση της συσχέτισης των τιμών των δύο μεθόδων πραγματοποιήθηκε με την χρήση της γραμμικής παλινδρόμησης κατά Passing – Bablok και του διαγράμματος διασποράς που δημιουργείται από αυτήν. Στον άξονα των y τοποθετήθηκαν οι τιμές των επιπέδων διγοξίνης της προς αξιολόγηση μεθόδου (από τον αναλυτή Architect i2000_{SR}), ενώ στον άξονα των x τοποθετήθηκαν οι τιμές των επιπέδων διγοξίνης από τον αναλυτή AxSYM, ως προς τον οποίο έγινε η σύγκριση.

Η ανάλυση παλινδρόμησης κατά Passing – Bablok αποτελεί μια πολύ χρήσιμη στατιστική διεργασία, που δύναται να αξιολογήσει κατά αξιόπιστο τρόπο τον βαθμό

συσχέτισης δύο αναλυτικών μεθόδων. Η δοκιμασία αυτή είναι μη παραμετρική και δεν προϋποθέτει συγκεκριμένη υπόθεση όσον αφορά το είδος της κατανομής των τιμών των δειγμάτων και των σφαλμάτων (δεν απαιτείται η κατανομή των τιμών να είναι κανονική). Βασική προϋπόθεση ωστόσο της σωστής εφαρμογής της ανάλυσης κατά Passing – Bablok είναι η γραμμική συσχέτιση μεταξύ των δεδομένων των δύο αναλυτικών μεθόδων.⁸²

Τα αποτελέσματα τοποθετούνται στο διάγραμμα διασποράς και η ευθεία γραμμικής παλινδρόμησης προσδιορίζεται από την εξίσωση της γραμμικής συνάρτησης του y ως προς x , την $y = \alpha + \beta x$, όπου η τομή α στον άξονα των y αντιστοιχεί στο μέγεθος του σταθερού συστηματικού σφάλματος και η κλίση β στο μέγεθος του αναλογικού συστηματικού σφάλματος. Οι ιδανικές τιμές για την τομή α και την κλίση β είναι 0 και 1 αντίστοιχα. Αυτό συμβαίνει μόνον όταν τα αποτελέσματα της προς αξιολόγηση μεθόδου ταυτίζονται απόλυτα με αυτά της συγκριτικής. Η τομή α και η κλίση β υπολογίζονται μαζί με το 95% διάστημα εμπιστοσύνης τους (95% CI - Confidence Interval). Αυτά τα διαστήματα εμπιστοσύνης χρησιμοποιούνται για να προσδιορισθεί κατά πόσον η διαφορά της τιμής της τομής α από το 0 και της τιμής της κλίσης β από το 1, οφείλονται στην τύχη, επιτρέποντας έτσι την ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τον βαθμό συμφωνίας των δύο μεθόδων.

Έτσι, εάν το 95% CI για την τομή α περιλαμβάνει την τιμή 0, συνεπάγεται ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ της υπολογισθείσας τιμής της τομής α και της τιμής 0 και άρα δεν υπάρχει σταθερή διαφορά (σταθερό συστηματικό σφάλμα) μεταξύ των δύο μεθόδων. Αντίστοιχα, εάν το 95% CI για την κλίση β περιλαμβάνει την τιμή 1 συνεπάγεται ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ της υπολογισθείσας τιμής της κλίσης β και της τιμής 1 και άρα δεν υπάρχει αναλογική διαφορά (αναλογικό συστηματικό σφάλμα) μεταξύ των δύο μεθόδων.

8.2 Αξιολόγηση γραμμικής παλινδρόμησης κατά Passing– Bablok

8.2.1 Πίνακας των παραμέτρων των μεταβλητών x και y

	AxSYM Μεταβλητή x	Architect i2000 _{SR} Μεταβλητή y
N	104	104
Χαμηλότερη τιμή	0.3100	0.3000
Υψηλότερη τιμή	3.8800	3.8900
Μέση τιμή	1.2265	1.0962
Διάμεσος τιμή	1.0000	0.9500
Τυπική απόκλιση (s)	0.6971	0.7167
Τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SE)	0.06836	0.07028

8.2.2 Εξίσωση Γραμμικής Παλινδρόμησης

$$y = -0.0995833 + 0.983333x$$

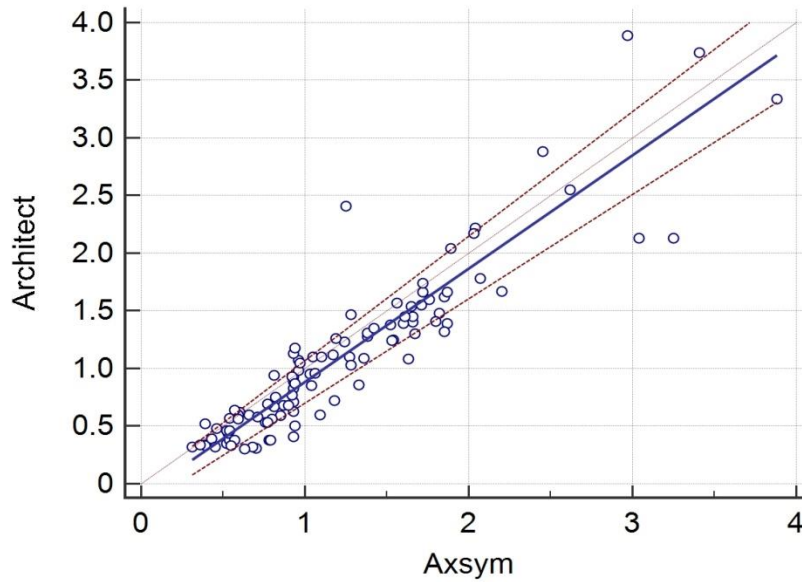
8.2.3 Ανάλυση παλινδρόμησης

Συστηματικές διαφορές	
Τομή α	-0.0995833
95% CI	-0.2040 έως -0.01214
Αναλογικές διαφορές	
Κλίση β	0.983333
95% CI	0.9048 έως 1.0800

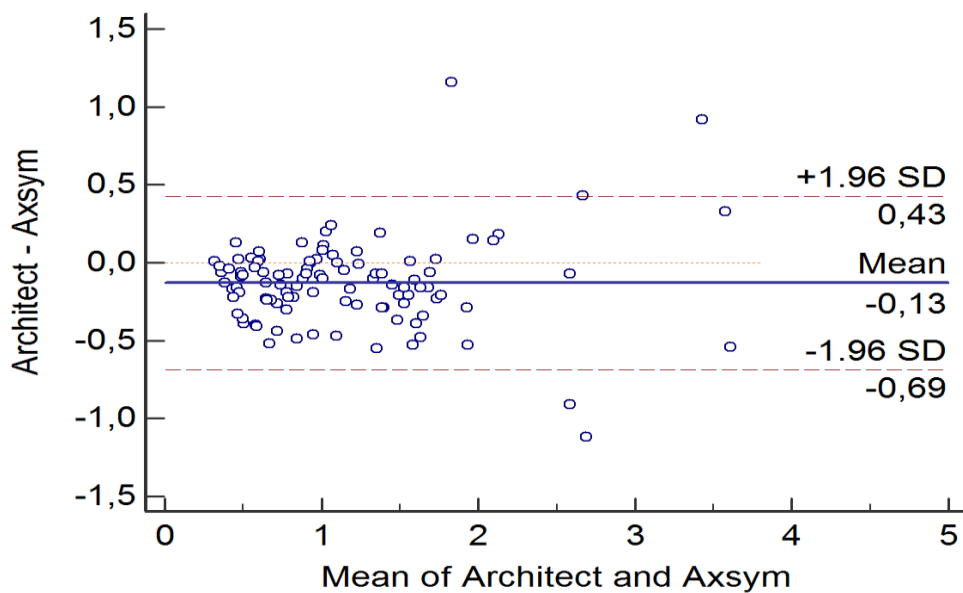
Τυχαίες διαφορές	
Τυπική απόκλιση των καταλοίπων (RSD)	0.2028
± 1.96 RSD διάστημα	-0.3975 έως 0.3975
Εγκυρότητα γραμμικού μοντέλου	
Τεστ γραμμικότητας Cusum	P=0.40 (μη σημαντική απόκλιση από την γραμμικότητα)

Από τα ανωτέρω διαπιστώνεται ότι:

1. Το τέστ Cusum για τον έλεγχο της γραμμικότητας ($P > 0.10$) δείχνει, ότι τα δεδομένα από τις δύο μεθόδους μπορούν να συσχετισθούν γραμμικά και άρα να εφαρμοσθεί η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης κατά Passing – Bablok.
2. Από το 95% CI της τομής α και το 95% CI της κλίσης β φαίνεται, ότι οι δύο μέθοδοι MEIA στον AxSYM και CMIA στον Architect i2000_{SR} για τον προσδιορισμό της διγοξίνης στον ορό, είναι σε πολύ καλή συμφωνία.
3. Η τυπική απόκλιση των καταλοίπων (RSD) είναι ένα μέτρο των τυχαίων διαφορών μεταξύ των δύο μεθόδων. 95% των τυχαίων διαφορών αναμένεται να βρίσκεται στο διάστημα μεταξύ ± 1.96 RSD. Το διάστημα αυτό είναι μικρό, άρα οι δύο μέθοδοι είναι συγκρίσιμες.



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα διασποράς (scatter plot) και ευθεία γραμμικής παλινδρόμησης κατά Passing-Bablok. (Μονάδες διγοξίνης AxSYM και Architect ng/ml)



Διάγραμμα 2: Διάγραμμα διαφορών (difference plot – Bland-Altman plot) των αποτελεσμάτων μεταξύ της προς αξιολόγηση (CMIA - Architect i2000_{SR}) και της συγκριτικής (MEIA – AxSYM) μεθόδου στον άξονα των y, ως προς τους μέσους όρους των αποτελεσμάτων της προς αξιολόγηση (CMIA - Architect i2000_{SR} - yi) και της συγκριτικής (MEIA – AxSYM – xi) μεθόδου στον άξονα των x $[(y_i+x_i)/2]$.

Από το ανωτέρω διάγραμμα διαφορών κατά Bland-Altman⁸³ παρατηρούμε ότι :

1. Οι διαφορές των τιμών της διγοξίνης της μεθόδου CMIA από την μέθοδο MEIA ισοκατανέμονται γύρω από την τιμή του μέσου όρου των διαφορών (-0.13).
2. Οι περισσότερες διαφορές βρίσκονται μέσα στα όρια της συμφωνίας (limits of agreement) τα οποία ορίζονται από τον μέσο όρο των διαφορών \pm το 1.96 της τυπικής απόκλισης των διαφορών. Έτσι, οι διαφορές μεταξύ μετρήσεων ενός δείγματος με τις δύο μεθόδους θα βρίσκονται εντός του εύρους των ορίων της συμφωνίας -0.69 με 0.43, στο 95% των περιπτώσεων. Το εύρος αυτό είναι αρκετά στενό για να έχει κλινική σημασία.
3. Ο μέσος όρος των διαφορών (-0.13) εκφράζει την απόκλιση από την «αληθή» τιμή (estimated bias). Η τιμή αυτή είναι αρκετά μικρή για να έχει κλινική σημασία για τον προσδιορισμό της διγοξίνης.

Από τα ανωτέρω διαφαίνεται ότι οι δύο μέθοδοι προσδιορισμού της διγοξίνης (CMIA - Architect και MEIA - AxSYM) είναι σε καλή συσχέτιση και συμφωνία μεταξύ τους, με απόλυτη τιμή bias της CMIA από την MEIA μόλις -0.13 .

8.3 Αποκλεισθείσες τιμές

Τα 15 δείγματα των οποίων οι τιμές αποκλείσθηκαν της συσχέτισης διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

- I. 12 δείγματα των οποίων οι τιμές των επιπέδων διγοξίνης στον μεν AxSYM ήσαν μετρήσιμες (μεταξύ 0.3 και 0.5 ng/ml), στον δε Architect ήσαν μικρότερες του LoD (< 0.3 ng/ml)
- II. 3 δείγματα του ίδιου ασθενούς, ο οποίος εισήχθη στην Καρδιολογική κλινική με διάγνωση τοξικού δακτυλιδισμού και στον οποίο χορηγήθηκαν αντισώματα DigiFab προς αντιμετώπιση της τοξικότητας.

Στην πρώτη περίπτωση τα επίπεδα της διγοξίνης στα δείγματα αυτά είναι χαμηλότερα από το όριο ανίχνευσης (LoD) του Architect. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε ίσως, να εξηγηθεί από την μεγαλύτερη εξειδίκευση του αντισώματος της

μεθόδου CMIA ως προς την διγοξίνη, με αποτέλεσμα κάποιες ενδογενείς ουσίες του ορού, που δίνουν μετρήσιμη τιμή διγοξίνης στον AxSYM, να μην μετρώνται ως διγοξίνη στον Architect.

Στην δεύτερη περίπτωση τα επίπεδα της διγοξίνης των 3 δειγμάτων στον AxSYM και στον Architect ήσαν:

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	AxSYM (MEIA) ng/ml	Architect (CMIA) ng/ml
1	1.03	36.08
2	0.89	35.45
3	0.39	34.78

Η πολύ μεγάλη αυτή διαφορά στις τιμές AxSYM και Architect θα μπορούσε να εξηγηθεί από την φύση των δύο μεθόδων. Η μέθοδος MEIA είναι ανοσοπροσδιορισμός τύπου σάντουιτς και μετρά μόνον τη διγοξίνη, που δεν είναι συνδεδεμένη πάνω στο αντίσωμα DigiFab ή DigiBind. Η μέθοδος CMIA φαίνεται, ότι δεν μπορεί να διαφοροποιήσει την ελεύθερη διγοξίνη από την συνδεδεμένη με το αντίσωμα DigiFab και κατά συνέπεια δίνει πολύ υψηλές τιμές διγοξίνης.

8.4 Συμπεράσματα

Η μέθοδος προσδιορισμού της διγοξίνης CMIA στον αναλυτή Architect i2000_{SR} είναι σε πολύ καλή συμφωνία με την μέθοδο MEIA του αναλυτή AxSYM, έχοντας μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις μικρότερη διασταυρούμενη δραστικότητα από αυτήν. Η μέθοδος όμως MEIA στον αναλυτή AxSYM υπερτερεί στην περίπτωση του τοξικού δακτυλιδισμού.

Βιβλιογραφία

1. Hall E. J., G. G. A. *Ιατρική Φυσιολογία*. (Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., 2008).
2. Η ανατομία της καρδιάς-Incardiology. at <<http://www.incardiology.gr/kardia/kardia.html>>
3. Ιστολογία - Εμβρυολογία Ι. at <<http://emed.med.uoa.gr>>
4. Μακροπούλου, Μ. *Βιοφυσικός μηχανισμός της μυϊκής συστολής*. (2009).
5. A. Goth. *Ιατρική Φαρμακολογία*. (Εκδόσεις Λίτσας, 1982).
6. Δ. Δ. Βαρώνος. *Ιατρική φαρμακολογία*. (1987).
7. Κωνσταντίνος Α. Δημόπουλος, Σ. Α. *Βασική Βιοχημεία*. (2009).
8. Δημήτριος Θ. Κρεμαστινός. *Καρδιολογία Κλινική Καρδιολογία Τόμος Ι*. (Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης., 2009).
9. Richard D. Howland, M. J. M. *Φαρμακολογία*. (Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου, 2007).
10. Αρρυθμίες: Τα φτερουγίσματα της καρδιάς. at <<http://www.care.gr>>
11. Katzung, G. B. *Βασική & Κλινική Φαρμακολογία*. (Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης., 2004).
12. Σιπαρά, Ν. Μ. *Φαρμακολογία απο αμφιθεάτρου*. (cn&n, 1998).
13. *Εθνικό Συνταγολόγιο*. (Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων, 2000). at <www.eof.gr>
14. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, L. S. *Βιοχημεία*. (Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2012).
15. Velat, I. & Čulić, V. Circulating magnesium and cardiovascular events. *Am. J. Clin. Nutr.* **99**, 647 - 8 (2014).

16. Del Gobbo, L. C. *et al.* Circulating and dietary magnesium and risk of cardiovascular disease: a systematic review and meta - analysis of prospective studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **98**, 160 - 73 (2013).
17. Μαργαρίτης Λ. Χ. , Γαλανόπουλος Β.Κ. , Κεραμάρης Κ.Ε. , Μαρίνος Ε.Σ. , Παπασιδέρη Ι.Σ. , Στραβοπόδης Δ.Ι., Τ. Ι. Π. *Βιολογία Κυττάρου*. (Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, 2008).
18. Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J., Henderson, G. *Rang και Dale Φαρμακολογία*. (Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., 2013).
19. William J. Marshall, S. K. B. *Κλινική Χημεία*. (Π.Χ. Πασχαλίδης (Ιατρική Βιβλιοθήκη), 2011).
20. Schoeller, D. a. Changes in total body water with age. *Am. J. Clin. Nutr.* **50**, 1176–81 (1989).
21. Chumlea, W. C., Guo, S. S., Zeller, C. M., Reo, N. V & Siervogel, R. M. Total body water data for white adults 18 to 64 years of age: the Fels Longitudinal Study. *Kidney Int.* **56**, 244–52 (1999).
22. Schrier, R. W. & Szatalowicz, V. L. Disorders of water metabolism. *Contrib. Nephrol.* **21**, 48–54 (1980).
23. Ε.Φ. Διαμαντής, Π.Α Σίσκος, Α. Π.-Δ. *Μαθήματα Κλινικής Χημείας*. (Εκδόσεις Λύχνος, 1987).
24. Διαταραχές του μεταβολισμού του ασβεστίου | Ελληνική Ενδοκρινολογική Εταιρεία | Hellenic Endocrine Society. at <<http://www.endo.gr>>
25. Peacock, M. Calcium metabolism in health and disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **5 Suppl 1**, S23 - 30 (2010).
26. Α. Ονουφρίου. Εργαστηριακός έλεγχος ηπατικής λειτουργίας. in *8ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο ΕΕΚΧ - ΚΒ in Ηπατική λειτουργία - Πεπτικό σύστημα*

27. Δ. Βλαχάκος. Παθοφυσιολογία νεφρικής λειτουργίας. 11ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο. in *Νεφρική λειτουργία* (2005).
28. Λιάπη, Χ. Γενικές αρχές δράσης των φαρμάκων. in *15ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο. Φάρμακο εργαστηριακή ανάλυση και κλινική πράξη. ΕΕΚΧ-ΚΒ* (2005).
29. Τ. Απτά – Πολίτου. *Εισαγωγή στην τοξικολογία*. (Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2008).
30. Σκουρολιάκου, Μ. *Στοιχεία Φαρμακοκινητικής Θεωρία και Πράξη*. (ΒΗΤΑ Ιατρικές Εκδόσεις ΕΠΕ, 1995).
31. Routledge, P. A. The plasma protein binding of basic drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **22**, 499–506 (1986).
32. Α. Γρηγοράτου. Η εποχή της Φαρμακογενωμικής. *Νοσοκομειακά Χρονικά*, **72**, 45-58 (2010).
33. Research, C. for D. E. and. Drug Interactions & Labeling - Why Learn about Adverse Drug Reactions (ADR)? at <<http://www.fda.gov>>
34. Φαρμακογονιδιωματική και εξατομικευμένη θεραπεία. at <<http://www.analysi.gr/pharmacogenomics>>
35. Martin, J., Registrar, C. P. & Fay, M. Cytochrome P450 drug interactions : are they clinically relevant ? **24**, 10–12 (2001).
36. Hasler, J. a. *et al.* Human cytochromes P450. *Mol. Aspects Med.* **20**, 1–137 (1999).
37. Zanger, U. M. & Schwab, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* **138**, 103–141 (2013).
38. Gene:ABCB1 ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1. at <<https://www.pharmgkb.org>>

39. Hodges, L. M. *et al.* Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet. Genomics* **21**, 152–61 (2011).
40. Μελπίδου, Α. Μέτρηση-Παρακολούθηση Επιπέδων Φαρμάκων απο τη φαρμακοκινητική στη φαρμακογενωμική. *Νοσοκομειακά Χρονικά*, **72**, 59–74 (2010).
41. Μ. Σκουρολιάκου. Παρακολούθηση επιπέδων φαρμάκων στο αίμα. 15ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο. in *Φάρμακο εργαστηριακή ανάλυση και κλινική πράξη*. (2005).
42. Therapeutic Drug Monitoring. at <<https://www.abbottdiagnostics.com>>
43. N.W Tietz. *Clinical Guide to Laboratory tests*. (W.B Saunders Co., 1990).
44. Ε. Λιανίδου, Π. Σ. Βασικές Αρχές Εργαστηριακής Μελέτης, Ανοσοπροσδιορισμοί, Σημειώσεις του μαθήματος κλινικής χημείας. (2006).
45. Friedman, M. a. & Brownell, K. D. Learning Guide Immunoassay. *Psychol. Bull.* **117**, 3 (1995).
46. Δ. Κοκκαλιάρης. Ανοσοενζυμικές Δοκιμασίες. in *14ο Σεμινάριο Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης της ΕΕΚΧ-ΚΒ Σύγχρονες Αναλυτικές Μέθοδοι στα εργαστήρια Κλινικής Χημείας* (2011).
47. Kricka, L. J. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin. Chem.* **45**, 942–956 (1999).
48. Ανθρώπινα αντισώματα κατά της Ανοσοσφαιρίνης του επίμοου (HAMA). at <<http://www.neuroiasis.com>>
49. Klee, G. G. State of the Art in Clinical and Anatomic Pathology Human Anti-Mouse Antibodies. *Arch Pathol Lab Med* **124**, 921–923 (2000).
50. Tjandra, J. J., Ramadi, L. & McKenzie, I. F. Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients. *Immunol. Cell Biol.* **68 (Pt 6)**, 367–376 (1990).

51. Χρ.Μητρόπουλος. Η εξέλιξη των αντιδαστηρίων των σύγχρονων αυτόματων βιοχημικών αναλυτών. in *14ο Σεμινάριο Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης της ΕΕΚΧ-ΚΒ Σύγχρονες Αναλυτικές Μέθοδοι στα εργαστήρια Κλινικής Χημείας* (2011).
52. Jane Smith, G. O. et al. Abbott AxSYM random and continuous access immunoassay system for improved work flow in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* **39**, 2063–69 (1993).
53. Κατερίνα Γρηγόρη. Η τεχνική της χημειοφωταύγειας. in *14ο Σεμινάριο Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης της ΕΕΚΧ-ΚΒ Σύγχρονες Αναλυτικές Μέθοδοι στα εργαστήρια Κλινικής Χημείας* (2011).
54. Koivunen, M. E. & Krogsrud, R. L. Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *Lab. Med.* **37**, 490–497 (2006).
55. Kricka, L. J. Clinical applications of chemiluminescence. *Anal. Chim. Acta* **500**, 279–286 (2003).
56. Baeyens, W. R. G. et al. Chemiluminescence-based detection: Principles and analytical applications in flowing streams and in immunoassays. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 941–953 (1998).
57. Darwish, I. a. Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis : Basic Methodology and Recent Advances. *Int. J. Biomed. Science* **2**, 217–235 (2006).
58. Dodeigne, C., Thunus, L. & Lejeune, R. Chemiluminescence as a diagnostic tool. A review. *Talanta* **51**, 415–439 (2000).
59. *Εγχειρίδιο της Abbott για τον προσδιορισμό iDigoxin με τον αναλυτή Architect i2000SR.*
60. *The Immunoassay Handbook.* (Gulf Professional Publishing, 2005). at <<https://books.google.com/books>>
61. Fozzard, H. a. & Sheets, M. F. Cellular mechanism of action of cardiac glycosides. *J. Am. Coll. Cardiol.* **5**, 10A–15A (1985).

62. Carr, P. Cardiovascular drugs. *Home Healthc. Nurse* **6**, 37–38 (1999).
63. McEvoy, G. K. Cardiac glycosides. *Am. Hosp. Formul. Serv. Drug Inf.* 2002. Bethesda, MD Am. Soc. Heal. Pharm. Inc. (Plus Suppl. (2002).
64. Inhibitors of Na⁺/K⁺-ATPase: Cardiac glycosides - Chemical structure and pharmacokinetics - Pharmacorama. at <<http://www.pharmacorama.com>>
65. Digoxin tablet. at <<http://dailymed.nlm.nih.gov>>
66. Julie Hixson-Wallace. Digoxin Toxicity: A Review. (2006). at <<http://www.uspharmacist.com>>
67. Σπυρίδων Ν. Κουλούρης. Καρδιοτονωτικές Γλυκοσίδες. in *15ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο. Φάρμακο εργαστηριακή ανάλυση και κλινική πράξη. ΕΕΚΧ-ΚΒ* (2005).
68. Aronson, J. K. *Meyler's Side Effects of Cardiovascular Drugs*. (Elsevier Inc., 2009).
69. Digoxin: serious drug interactions. *Prescrire Int.* **19**, 68–70 (2010).
70. Brown, J. H., McLoughlin, J. C. & Boland, M. Use of digoxin-specific antibody fragments (Fab) in the management of digoxin poisoning. *Ulster Med. J.* **55**, 89–92 (1986).
71. DigiFab:Digoxin Immune Fab (ovine). 1–14 (2001). at <www.drugs.com>
72. Cardiac Diseases and Therapies Heart Failure Digoxin Immune Fab (DigiFab ®) Management of Digoxin Toxicity Cardiac Diseases and Therapies Heart Failure. *Digoxin Handbook, Cardiovasc. Pharmacother.* (2015).
73. Gheorghiade, M., Adams, K. F. & Colucci, W. S. Digoxin in the management of cardiovascular disorders. *Circulation* **109**, 2959–2964 (2004).
74. Dasgupta, A. Endogenous and exogenous digoxin-like immunoreactive substances: Impact on therapeutic drug monitoring of digoxin. *Am. J. Clin. Pathol.* **118**, 132–140 (2002).

75. Dasgupta, A., Saldana, S. & Heimann, P. Monitoring free digoxin instead of total digoxin in patients with congestive heart failure and high concentrations of digoxin-like immunoreactive substances. *Clin. Chem.* **36**, 2121–2123 (1990).
76. Dasgupta, A. Therapeutic Drug Monitoring: Newer Drugs and Biomarkers. *Acad. Press* (2012).
77. *World Health Organization, WHO. Laboratory Biosafety Manual.* (2004).
78. Α. Γρηγοράτου. Υγιεινή και ασφάλεια στο χώρο του εργαστηρίου. in *10ο Σεμινάριο Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης Ελληνικής Εταιρείας Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας. Η οργάνωση των in vitro διαγνωστικών εργαστηρίων.*
79. Ένθετο αντιδραστηρίων Digoxin της εταιρείας Abbott για τον αναλυτή AxSYM.
80. Ένθετο αντιδραστηρίων Digoxin της εταιρείας Abbott για τον αναλυτή Architect i2000SR.
81. DeFrance, A., Armbruster, D., Petty, D., Cooper, K. C. & Dasgupta, A. Abbott ARCHITECT clinical chemistry and immunoassay systems: digoxin assays are free of interferences from spironolactone, potassium canrenoate, and their common metabolite canrenone. *Ther. Drug Monit.* **33**, 128–31 (2011).
82. MedCalc statistical software. at <<https://www.medcalc.org>>
83. Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines. at <<http://clsi.org/>>
84. Passing H, B. W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part I. *Clin Chem Clin Biochem* **21**, 709–20 (1983).
85. Bland, J. M. & Altman, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* **1**, 307–10 (1986).

Abstract

Introduction: The aim of this study was the determination of digoxin in serum, using immunoassays on the Architect i2000_{SR} (Abbott) and AxSYM System (Abbott) automatic immunological analyzers. Digoxin is a potent cardiac glycoside prescribed for the treatment of supraventricular tachycardias and congestive heart failure. Its mechanism of action is based on its positive inotropic effect, which inhibits the sodium-potassium pump $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$.

Methods: The present study included serum samples from digoxin taking hospital patients (n=119). For the quantitative measurement of digoxin we used the Architect Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA) and the AxSYM Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA). The method comparison was performed according to the guidelines of evaluation protocol EP9-A2 of CLSI based on Passing – Bablok linear regression analysis and Bland – Altman analysis of differences.

Results: The linear regression equation with the calculated values for y (Architect analyzer) and x (AxSYM analyzer) shows a good correlation between the two methods according to Passing and Bablok analysis. The estimated bias from the difference plot (Bland – Altman) between Architect and AxSYM method is low (-0.13), which means that the two methods are in agreement with each other.

CMIA method gave very elevated measurements of digoxin from the samples of the patient, who was under treatment with DigiFab. MEIA method, on the contrary, measured only the digoxin that was not bound to the DigiFab antibodies.

Conclusions: CMIA digoxin assay on the Architect i2000_{SR} analyzer is in good agreement with MEIA digoxin assay on the AxSYM analyzer. More specifically, CMIA method demonstrates lower cross – reactivity than MEIA.

MEIA method proved to be more suitable than the CMIA method for quantitating digoxin in serum from patients on antibody fragment therapy.

Περίληψη

Εισαγωγή: Η μελέτη, που ακολουθεί, έχει ως αντικείμενο τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της διγοξίνης σε δείγματα ορού αίματος. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται η σύγκριση των αποτελεσμάτων, που λαμβάνονται από τους αυτόματους ανοσολογικούς αναλυτές Architect i2000_{SR} και AxSYM System της εταιρίας Abbott. Ως καρδιακή γλυκοσίδη με μεγάλη ισχύ, η διγοξίνη χορηγείται για τη θεραπεία της υπερκοιλιακής ταχυκαρδίας και τη χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας. Ο μηχανισμός της βασίζεται στη θετική ινότροπο δράση της, η οποία αναστέλλει την αντλία Na⁺/K⁺.

Μέθοδοι: Δείγματα ορού (n=119) από νοσηλευόμενους ασθενείς σε θεραπεία με διγοξίνη μετρήθηκαν ποσοτικά, χρησιμοποιώντας τη μικροσωματιδιακή ανοσοχημειοφωταύγεια (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay, CMIA) του αναλυτή Architect και τη μέθοδο μικροσωματιδιακού ενζυμοανοσοπροσδιορισμού (Microparticle Enzyme Immunoassay, MEIA) του αναλυτή AxSYM. Η σύγκριση των δύο μεθόδων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του πρωτόκολλου αξιολόγησης (Evaluation Protocol) EP9-A2 του CLSI, με βάση την ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης κατά Passing – Bablok και του διαγράμματος διαφορών κατά Bland – Altman.

Αποτελέσματα: Η εξίσωση γραμμικής παλινδρόμησης του y (αναλυτής Architect) ως προς τον x (αναλυτής AxSYM), η οποία υπολογίσθηκε σύμφωνα με την ανάλυση κατά Passing – Bablok, δείχνει καλή συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων. Από το διάγραμμα διαφορών κατά Bland – Altman προκύπτει, ότι το bias της μεθόδου CMIA του Architect από την MEIA του AxSYM είναι πολύ χαμηλό, άρα οι δύο μέθοδοι είναι σε καλή συμφωνία μεταξύ τους.

Η μέθοδος CMIA (Architect) έδωσε ψευδώς πολύ υψηλές τιμές διγοξίνης στα δείγματα του ασθενούς με τοξικό δακτυλιδισμό, στον οποίο χορηγήθηκαν αντισώματα DigiFab. Αντιθέτως, η μέθοδος MEIA (AxSYM) προσδιόρισε μόνο τη διγοξίνη τη μη δεσμευμένη από τα DigiFab.

Συμπεράσματα: Η μέθοδος προσδιορισμού της διγοξίνης CMIA στον αναλυτή Architect i2000_{SR} είναι σε πολύ καλή συμφωνία με τη μέθοδο MEIA του αναλυτή AxSYM, έχοντας μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις μικρότερη διασταυρούμενη δραστηριότητα από αυτήν. Η μέθοδος όμως MEIA στον αναλυτή AxSYM υπερτερεί στην περίπτωση του τοξικού δακτυλιτισμού.

