



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ
ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ
ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΕΑΒΑΑ-19, έκδοση 1η

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Προσδιορισμός γαλακτικού στα ούρα με εργαστηριακή μέθοδο

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Η μετασκησιακή συγκέντρωση του γαλακτικού στα ούρα είναι ένας έγκυρος, αξιόπιστος και υποσχόμενος βιοδείκτης του αναερόβιου μυϊκού μεταβολισμού αθλητών/-ριών και ασκουμένων. Η μέτρησή της απαιτεί ελεγχόμενη προ- και μετασκησιακή ενυδάτωση και λήψη μικρής ποσότητας ούρων μία ώρα μετά τη λήξη της άσκησης. Ο προσδιορισμός είναι ενζυμικός φασματοφωτομετρικός, στηρίζεται δηλαδή στη μέτρηση προϊόντος ενζυμικής αντίδρασης σε φασματοφωτόμετρο. Προϋπόθεση για την εκτέλεση της διαδικασίας είναι η γνώση βασικών τεχνικών βιοχημικού εργαστηρίου.

ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΝΤΑ ΠΡΟΣΩΠΑ

Χειριστής/-ρια, αναλυτής/-ρια (μπορεί να είναι το ίδιο πρόσωπο), εξεταζόμενος/-η

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

A/α	Είδος	Λεπτομέρειες
1	Πιπέτα	Των 10-100 μL
2	Πιπέτα	Των 20-200 μL
3	Πιπέτα	Των 100-1000 μL
4	Πιπέτα	Των 500-5000 μL
5	Φασματοφωτόμετρο	Unico 4802 UV/VIS Double Beam
6	Φυγοκεντρητής	Hettich Micro 22R
7	Αναλυτικός ζυγός	Kern ABT 120 - 5DM
8	Επωαστικός κλίβανος	Memmert
9	Κυκλομείκτης	Vortex-Genie 2
10	Γυάλινες κυψελίδες	Semi-micro
11	Σπάτουλα	Για μεταφορά μικροποσοτήτων στερεών ουσιών
12	Στατώ για φιαλίδια erpendorf	
13	Στατώ για σωληνάρια RIA	
14	Χρονόμετρο	
15	Γενικά εργαστηριακά σκεύη	Για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας
16	Τσάντα-φορητό ψυγείο με παγοκύστες	Για τη μεταφορά εξοπλισμού και δειγμάτων
17	Φόρμες καταγραφής αποτελεσμάτων	Ντοσιέ, τετράδιο κλπ.
18	Καταψύκτης	-20°C

ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

A/α	Είδος	Λεπτομέρειες
1	Μπουκάλια εμφιαλωμένου νερού	500 mL (θερμοκρασία δωματίου)
2	Ουροσυλλέκτες	Μιας χρήσης, πλαστικοί των 120 mL
3	Αποσταγμένο νερό	
4	Σωληνάρια RIA και πώματα	Των 3 mL
5	Πλαστικά πιπετάκια Pasteur	Των 3 mL
6	Φιαλίδια erpendorf	Του 1,5 mL
7	Ρύγχη	Κίτρινα, των 10-200 μL
8	Ρύγχη	Μπλε, των 100-1000 μL
9	Ρύγχη	Άχρωμα, των 500-5000 μL

10	Γάντια	Εξεταστικά, μιας χρήσης (μέγεθος ανάλογα με τον/την χειριστή/-ρια)
11	Glycine buffer solution 0.6 M	Sigma-Aldrich G5418. Αποθήκευση στο ψυγείο (4°C).
12	L-Lactic dehydrogenase from rabbit muscle type II, ammonium sulfate suspension, 800-1,200 units/mg protein	Sigma-Aldrich L2500. Αποθήκευση στο ψυγείο (4°C).
13	NAD	Applichem A1124,0001. Αποθήκευση στην κατάψυξη (-20°C).
14	«Γόνδολες» ζύγισης	
15	Στυλό και ανεξίτηλα μαρκαδοράκια	S ή M
16	Δοχείο απόρριψης βιολογικών υλικών	

ΒΗΜΑΤΑ

A/α	Τίτλος	Εκτελών/-ούσα	Ενέργειες
1	Προετοιμασία εξοπλισμού	Χειριστής/-ρια	Σε τσάντα (εφόσον χρειάζεται μεταφορά) βάζει τον απαραίτητο εξοπλισμό για τη λήψη των δειγμάτων ούρων (μπουκάλια νερό, ουροσυλλέκτες). Επίσης, ετοιμάζει φορητό ψυγείο με παγοκύστες για τη μεταφορά των δειγμάτων.
2	Προετοιμασία εξεταζόμενου/-ης για τη δειγματοληψία ηρεμίας	Χειριστής/-ρια	Έχει ενημερώσει τον/την ασκούμενο/-η ότι πρέπει να μην καταναλώσει καφέ, αλκοόλ ή κάποιο φάρμακο 8 ώρες πριν από τη μέτρηση. Επιπλέον, τον ενημερώνει να πει 500 mL νερού 30 λεπτά πριν τη δειγματοληψία ηρεμίας.
3	Δειγματοληψία ηρεμίας	Εξεταζόμενος/-η	Παρέχει μια μικρή ποσότητα ούρων σε ουροσυλλέκτη και, στη συνέχεια, αδειάζει όσο το δυνατόν καλύτερα την κύστη του σε τουαλέτα.
4	Προετοιμασία εξεταζόμενου/-ης για τη δειγματοληψία μετά την άσκηση	Εξεταζόμενος/-η	Καταναλώνει 250 mL νερού 15 λεπτά μετά τη λήξη της άσκησης και επιπλέον 250 mL νερού 30 λεπτά μετά τη λήξη της άσκησης.
5	Δειγματοληψία μετά την άσκηση	Εξεταζόμενος/-η	Μία ώρα μετά τη λήξη της άσκησης παρέχει μια μικρή ποσότητα ούρων σε ουροσυλλέκτη. Αν επιθυμεί να ουρήσει κατά τη διάρκεια αυτής της ώρας, παρέχει όλα τα ούρα σε ουροσυλλέκτης.
6	Αποθήκευση δειγμάτων	Χειριστής/-ρια	Τοποθετεί τους ουροσυλλέκτες με ούρα στο φορητό ψυγείο και τα μεταφέρει στο εργαστήριο. Αν ο/η εξεταζόμενος/-η έχει δώσει ούρα μετά την άσκηση σε περισσότερους από έναν ουροσυλλέκτη, αναμειγνύει το περιεχόμενό τους σε ένα μεγαλύτερο δοχείο. Αν ο προσδιορισμός γαλακτικού δεν γίνει αμέσως, μεταφέρει το κάθε δείγμα σε δύο ή τρία φιαλίδια erpendorf, χρησιμοποιώντας πιπετάκια Pasteur, και τα αποθηκεύει στους -20 °C μέχρι την ανάλυσή τους.

7	Αραίωση δειγμάτων	Χειριστής/-ρια	Αν η αναμενόμενη συγκέντρωση γαλακτικού στο αίμα είναι > 6,5 mmol/L (όπως μετά από έντονη άσκηση), αραιώνει το αντίστοιχο δείγμα ούρων 100 φορές τοποθετώντας σε ένα σωληνάριο RIA 2970 μ L αποσταγμένου νερού και 30 μ L ούρων με τις κατάλληλες πιπέτες. Πωματίζει το σωληνάριο, αναμειγνύει καλά το περιεχόμενό του και είτε το αναλύει αμέσως είτε το αποθηκεύει στους -20°C μέχρι την ανάλυσή του.
8	Προετοιμασία ανάλυσης	Αναλυτής/-ρια	Βγάζει δείγματα και αντιδραστήρια (glycine buffer, L-lactic dehydrogenase, NAD) από τον καταψύκτη ή το ψυγείο και τα αφήνει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου.
9	Υπολογισμός ποσότητας διαλύματος εργασίας	Αναλυτής/-ρια	Υπολογίζει την ποσότητα του διαλύματος εργασίας που θα χρειαστεί πολλαπλασιάζοντας τον αριθμό K των απαιτούμενων δειγμάτων (δείγματα ούρων + τυφλό) επί 0,725 mL.
10α	Παρασκευή διαλύματος εργασίας α. Ζύγιση NAD και προσθήκη απεσταγμένου νερού	Αναλυτής/-ρια	Ενεργοποιεί τον αναλυτικό ζυγό πατώντας ON. Φροντίζει ώστε ο δίσκος ζύγισης να είναι καθαρός. Αφού ο ζυγός κάνει αυτόματα βαθμονόμηση, τοποθετεί τη γόνδολα ζύγισης στον δίσκο και πατάει TARE. Στην συνέχεια, με μια μικρή σπάτουλα μεταφέρει NAD από το φιαλίδιο στη γόνδολα. Ζυγίζει $K \times 1,19$ mg NAD. Επειδή είναι δύσκολο να ζυγίσει την ακριβή ποσότητα ζυγίζει λίγο περισσότερο, καταγράφει πόσο ζύγισε (Z mg) και προσαρμόζει τις αναλογίες των επόμενων αντιδραστηρίων σύμφωνα με την ζυγισμένη ποσότητα. Μεταφέρει το ζυγισμένο NAD σε μια μικρή κωνική φιάλη ή άλλο μικρό σκεύος. Προσθέτει $Z \times 0,4$ mL αποσταγμένο νερό.
10β	Παρασκευή διαλύματος εργασίας β. Προσθήκη glycine buffer	Αναλυτής/-ρια	Προσθέτει $Z \times 0,2$ mL glycine buffer, φροντίζοντας να μην αγγίξει με το ρύγχος της πιπέτας τη σταγόνα χλωροφορμίου που υπάρχει στον πυθμένα της φιάλης του αντιδραστηρίου ως συντηρητικό.
10γ	Παρασκευή διαλύματος εργασίας γ. Προσθήκη L-lactic dehydrogenase	Αναλυτής/-ρια	Προσθέτει Z μ L L-lactic dehydrogenase. Ανακινεί καλά το διάλυμα εργασίας και το κρατά σφραγισμένο στη φιάλη. Το διάλυμα είναι σταθερό για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και για 24 ώρες σε ψυγείο (4°C).
11α	Προετοιμασία οργάνων α. Άνοιγμα φασματοφωτόμετρου	Αναλυτής/-ρια	Ενεργοποιεί το φασματοφωτόμετρο πατώντας το κουπί ON, που βρίσκεται πίσω κάτω δεξιά. Αφήνει το όργανο να προθερμανθεί και, στο άκουσμα του ήχου ειδοποίησης, πατάει Yes για βαθμονόμηση.
11β	Προετοιμασία οργάνων β. Άνοιγμα κλιβάνου	Αναλυτής/-ρια	Ενεργοποιεί τον κλίβανο γυρνώντας τον δείκτη στο I και ρυθμίζει τη θερμοκρασία στους 37°C .

11γ	Προετοιμασία οργάνων γ. Άνοιγμα φυγοκεντρική	Αναλυτής/-ρια	Ενεργοποιεί τον φυγοκεντρική πατώντας το κουμπί ON, που βρίσκεται στο πλάι δεξιά. Ρυθμίζει το πρόγραμμα φυγοκέντρωσης στα 5 min, 10.000 rpm και 18°C.
12	Φυγοκέντρωση δειγμάτων	Αναλυτής/-ρια	Φυγοκεντρική μόνο τα δείγματα που περιέχουν ίζημα (συνήθως αυτά είναι τα πυκνά προασκησιακά). Τοποθετεί τα δείγματα μέσα στην κεφαλή του φυγοκεντρική σε αντιδιαμετρικές θέσεις και κλείνει καλά τα καπάκια της κεφαλής και του φυγοκεντρική. Πατάει Start για να ξεκινήσει η φυγοκέντρωση. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης βγάζει και επανατοποθετεί τα δείγματα σε στατώ προσεκτικά, ώστε να αποφευχθεί πιθανή ανατάραξη του ιζήματος.
13	Προετοιμασία φιαλιδίων erpendorf για την ανάλυση	Αναλυτής/-ρια	Ετοιμάζει και αριθμεί τόσα φιαλίδια erpendorf όσα και τα δείγματα ούρων συν ένα για το τυφλό.
14	Τοποθέτηση διαλύματος εργασίας	Αναλυτής/-ρια	Σε κάθε φιαλίδιο τοποθετεί 725 μL διαλύματος εργασίας.
15	Προσθήκη βιολογικού δείγματος ή αποσταγμένου νερού	Αναλυτής/-ρια	Σε κάθε φιαλίδιο που αντιστοιχεί σε δείγμα ούρων προσθέτει 25 μL του αντίστοιχου δείγματος με ξεχωριστό ρύγχος. Στο φιαλίδιο για το τυφλό προσθέτει 25 μL αποσταγμένου νερού. Κλείνει και ανακινεί όλα τα φιαλίδια στον κυκλομείκτη.
16	Επάωση	Αναλυτής/-ρια	Τοποθετεί όσα φιαλίδια περιέχουν δείγματα ηρεμίας στον κλίβανο για 15 min, ενώ όσα φιαλίδια περιέχουν δείγματα άσκησης για 30 min. (Το φιαλίδιο για το τυφλό δεν χρειάζεται επάωση).
17α	Μέτρηση α. Ρύθμιση φασματοφωτόμετρου	Αναλυτής/-ρια	Στο φασματοφωτόμετρο επιλέγει 1 (Basic mode) και enter, στη συνέχεια set λ 340 nm και enter και, τέλος, factor 53,05 και enter.
17β	Μέτρηση β. Τοποθέτηση δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο και ανάγνωση συγκέντρωσης	Αναλυτής/-ρια	Με τη χρήση πιπέτας 100-1000 μL, μεταφέρει το τυφλό σε γυάλινη κυψελίδα semi-micro, την οποία και τοποθετεί στη θέση αναφοράς. Στη συνέχεια μεταφέρει ομοίως τα δείγματα σε γυάλινες κυψελίδες semi-micro, τις οποίες τοποθετεί κατά σειρά στο καρουζέλ. Κλείνει καλά το καπάκι του διαμερίσματος δειγμάτων, πατά τον αριθμό θέσης κάθε δείγματος στο καρουζέλ (π.χ. 1) και πατά enter. Καταγράφει την τιμή που δείχνει το όργανο στην οθόνη του. Για να βρει την πραγματική συγκέντρωση διαιρεί με το 11 για τα δείγματα που δεν έχουν αραιωθεί και πολλαπλασιάζει με το 9,09 για τα δείγματα που έχουν αραιωθεί 100 φορές.

18	Συμμάζεμα	Αναλυτής/-ρια	Μετά το τέλος της μέτρησης όλων των δειγμάτων, απορρίπτει όσα υλικά δεν χρειάζονται ή ήταν μιας χρήσης, πλένει τα σκεύη που χρησιμοποίησε και αποθηκεύει δείγματα και αντιδραστήρια στο ψυγείο και στον καταψύκτη. Τέλος τακτοποιεί στη θέση του ό,τι μεταχειρίστηκε.
----	-----------	---------------	---

ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

A/α	Πρόβλημα	Αντιμετώπιση
1	Απροσδόκητα υψηλές τιμές	Ελέγχουμε αν είναι καθαρή εξωτερικά η κυψελίδα. Αν δεν είναι, τη σκουπίζουμε προσεκτικά με χαρτομάντιλο και ξαναμετράμε. Αν η υπερβολικά υψηλή τιμή επιμένει, ελέγχουμε την απορρόφηση και, αν υπερβαίνει το 0,45 (βλ. 2η σημείωση παρακάτω), κάνουμε αραιώση στο αρχικό δείγμα ούρων κι επαναλαμβάνουμε την ανάλυση.
2	Αρνητικές τιμές	Αν έχουμε κάνει αραιώση, επαναλαμβάνουμε την ανάλυση χωρίς αραιώση. Αν δεν έχουμε κάνει αραιώση, σημειώνουμε ως τιμή συγκέντρωσης το 0.

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

- Πυκνότητα ούρων.** Είναι χρήσιμο, όταν μετράμε βιοδείκτες (όπως το γαλακτικό) στα ούρα, να μετράμε και την πυκνότητα των ούρων (ανατρέξτε στη σχετική διαδικασία).
- Αραιώσεις.** Παρά τη γενική οδηγία να αραιώνουμε 100 φορές τα ούρα όταν η αναμενόμενη αντίστοιχη συγκέντρωση γαλακτικού στο αίμα είναι > 6,5 mmol/L (βήμα 7), είναι πιθανό να «πέσουμε έξω», λαμβάνοντας απροσδόκητα υψηλές ή χαμηλές τιμές. Με το φασματοφωτόμετρο έχουμε τη δυνατότητα να βλέπουμε και τις απορροφήσεις εκτός από τις συγκεντρώσεις. Αυτό μας δίνει τη δυνατότητα να γνωρίζουμε τότε η σχέση συγκέντρωσης-απορρόφησης αποκλίνει από τη γραμμικότητα (δίνοντάς μας έτσι ανακριβή αποτελέσματα), κάτι που συμβαίνει με τιμές απορρόφησης πάνω από 0,45. Στις περιπτώσεις αυτές πρέπει να κάνουμε αραιώση του αρχικού δείγματος ούρων ή να του κάνουμε άλλη αραιώση από αυτήν που του έχουμε κάνει. Στον παρακάτω πίνακα παραθέτουμε τις περιοχές απορρόφησης και τις προτεινόμενες αραιώσεις.

Απορρόφηση	Αραιώση	Αναλογία όγκων	Πολλαπλασιάζουμε τη συγκέντρωση που δείχνει το φασματοφωτόμετρο επί
0,45–1,0	1/11 ή	10 μL ούρων και 100 μL νερού	-
	1/22	10 μL ούρων και 210 μL νερού	2
1,0–1,7	1/33 ή	10 μL ούρων και 320 μL νερού	3
	1/44 ή	10 μL ούρων και 430 μL νερού	4
	1/55	10 μL ούρων και 540 μL νερού	5
1,7–2,2	1/66 ή	10 μL ούρων και 650 μL νερού	6
	1/77	10 μL ούρων και 760 μL νερού	7

Δημιουργήθηκε από	Στέφανο Νικολαΐδη, Ιωάννη Κοσμίδη
Ελέγχθηκε από	Βασίλη Μούγιο
Ημερομηνία	24 Δεκεμβρίου 2018