

ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ

πρωτεΐνες ορού - πλάσματος
ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ορού - πλάσματος
βασικές αρχές ηλεκτροφορητικών τεχνικών
πρωτεομική (proteomics)

Ε. Λιανίδου,

Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας – Κλινικής Χημείας
lianidou@chem.uoa.gr

πρωτεΐνες πλάσματος

- Περίπου 20.000 γονίδια κωδικοποιούν τη σύνθεση ανθρωπίνων πρωτεϊνών
- 3.000 – 5.000 διαφορετικές πρωτεΐνες / κύτταρο
- Ταυτοποίηση 300 διαφορετικών πρωτεϊνών στο πλάσμα
- 10 –15 πρωτεΐνες προσδιορίζονται συνήθως στο πλάσμα για διαγνωστικούς σκοπούς

Πρωτεΐνες

· πρωτεΐνες : Συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης

Συγκεκριμένες φυσιολογικές ή
παθολογικές συνθήκες

Δομικά συστατικά κυττάρων / ιστών

Ευδιάλυτες σε ενδοκυττάρια ή
εξωκυττάρια υγρά

Μεταβολή συγκέντρωσης πρωτεϊνών
σε ασθενείς και υγιείς

Λειτουργίες των πρωτεϊνών πλάσματος

Λειτουργία	Παράδειγμα
μεταφορά	Σφαιρίνη προσδένουσα τη θυροξίνη (θυρεοειδείς ορμόνες) Απολιποπρωτείνες (χοληστερόλη, τριγλυκερίδια)
Χυμική ανοσία	Ανοσοσφαιρίνες
Διατήρηση της κολλοειδωσμοτικής πίεσης	Όλες οι πρωτεΐνες, ιδιαίτερα η αλβουμίνη
ένζυμα	Ρενίνη, παράγοντες πήξης, πρωτεΐνες συμπληρώματος
Αναστολείς πρωτεασών	A1-αντιθρυψίνη (δρά στις πρωτεάσες)
Ρυθμιστική δράση στην οξεοβασική ισορροπία	όλες οι πρωτεΐνες

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

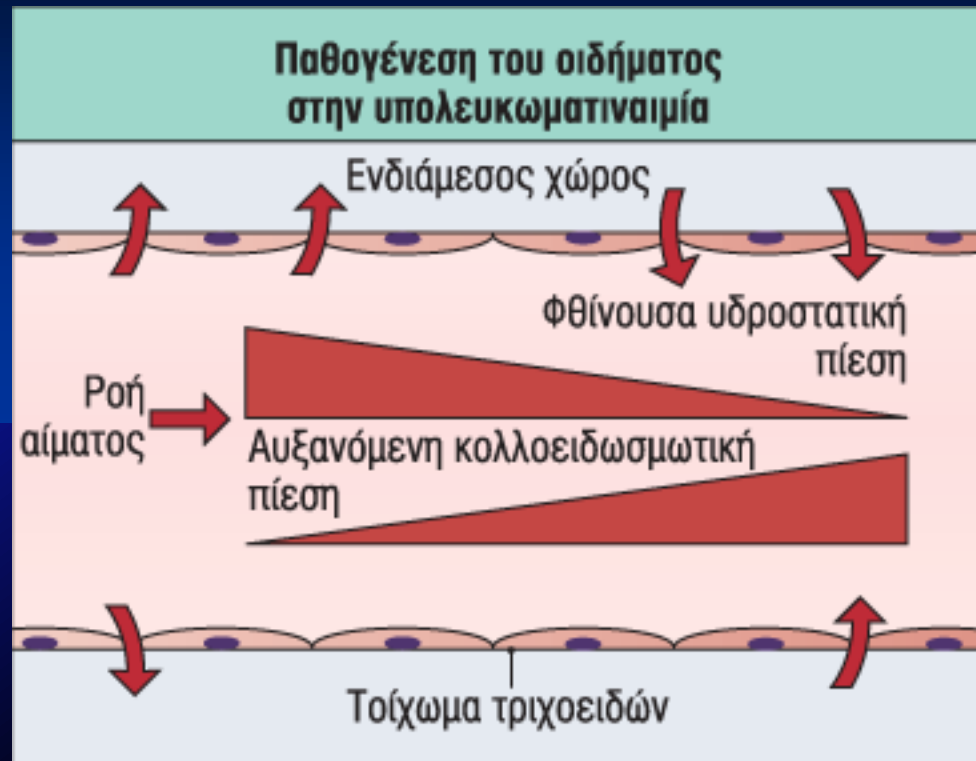
Βιολογικά δείγματα : ορός, πλάσμα, ούρα, ΕΝΥ (CSF),
σίελος, αμνιακό υγρό,
περιτοναϊκό, πλευριτικό υγρό

Σύνθεση πρωτεϊνών : ήπαρ
β-λεμφοκύτταρα
ορμόνες πρωτεϊνικής φύσεως
(εξειδικευμένοι ιστοί)

Καταβολισμός πρωτεϊνών : ήπαρ

Ανωμαλίες στην ποσότητα : γενετικοί,
ή είδος πρωτεΐνης φυσιολογικοί ,
παθολογικοί παράγοντες

Παθογένεση του οιδήματος στην υπολευκωματιναιμία



σε καταστάσεις υπολευκωματιναιμίας η μειωμένη κολλοειδωσμητική πίεση του πλάσματος διαταρράσει την ισορροπία μεταξύ πλάσματος και μεσοκυττάριου υγρού με αποτέλεσμα την μειωμένη μετακίνηση του μεσοκυττάριου υγρού πίσω στο αίμα, στο φλεβικό τμήμα των τριχοειδών.

Η συσσώρευση μεσοκυττάριου υγρού εμφανίζεται κλινικά ως οίδημα

Μεταβολές συγκέντρωσης πρωτεϊνών στο πλάσμα

- οφείλονται :
ταχύτητα πρωτεϊνοσύνθεσης
ταχύτητα απομάκρυνσης
διαφορά κατανομής

επηρεάζονται :
από την ορθοστασία
από την αιμοληψία

Ολικές πρωτεΐνες πλάσματος

Πλάσμα : περιέχει ινωδογόνο (fibrinogen) $\approx 200-400$ mg/dL

Πρωτεΐνες ορού : $\approx 6.3-8.3$ g/dL

↑↑↑ ⇒ Υπερπρωτεϊναιμία
αφυδάτωση (διάρροια, έμετοι κ.τ.λ.)
ελλειπής κατακράτηση νερού

↓↓↓ ⇒ Υποπρωτεϊναιμία
υπερβολική κατακράτηση νερού
υπερβολική ενδοφλέβια χορήγηση υγρών

Διαγνωστική σημασία : Περιορισμένη, συνδυασμός με
άλλες εξετάσεις

Αιτίες μεταβολών συγκέντρωσης πρωτεϊνών στο πλάσμα

Αύξηση	
Υπεργαμμασφαιριναιμία Παραπρωτεϊναιμία	Αυξημένη σύνθεση πρωτεΐνης
Τεχνητή αφυδάτωση	Αιμοσυγκέντρωση λόγω διακοπής ροής του αίματος κατά τη διάρκεια της αιμοληψίας Μείωση του όγκου κατανομής
Μείωση	
Υποσιτισμός και δυσαπορρόφηση Ηπατοπάθεια Χυμική ανοσοανεπάρκεια	Μειωμένη σύνθεση πρωτεΐνης
Υπερυδάτωση Αυξημένη διαπερατότητα τριχοειδών	Αύξηση του όγκου κατανομής
Καταστάσεις απώλειας πρωτεΐνης Καταβολικές καταστάσεις	Αύξηση απέκκρισης, και καταβολισμού

TABLE 28.4 High-Abundance Plasma Proteins

Data from in Hortin GL, Sviridov D, Anderson L. High-abundance polypeptides of the human plasma proteome comprising the top 4 logs of polypeptide abundance. *Clin Chem* 2008;54:1608–1616.

Rank	Ranked by Mass Abundance (mg/L)		Ranked by Molecular Abundance ($\mu\text{mol/L}$)	
	Protein	Concentration	Protein	Concentration
1	Albumin	35,000–52,000	Albumin	500–800
2	Immunoglobulin G	7000–16,000	Immunoglobulin G	40–120
3	Transferrin	2000–3600	Apolipoprotein A-I	30–70
4	Immunoglobulin A	700–4000	Apolipoprotein A-II	30–60
5	α_2 -Macroglobulin	1300–3000	Transferrin	25–45
6	Fibrinogen	2000–4000	α_1 -Antitrypsin	18–40
7	α_1 -Antitrypsin	900–2000	Haptoglobin	6–40

Rank	Ranked by Mass Abundance (mg/L)		Ranked by Molecular Abundance ($\mu\text{mol/L}$)	
	Protein	Concentration	Protein	Concentration
8	Apolipoprotein A-I	910–1940	α_1 -Acid glycoprotein	15–30
9	C3	900–1800	α_2 HS-glycoprotein	9–30
10	IgM	400–2300	Immunoglobulin A	5–30
11	Haptoglobin	300–2000	Hemopexin	9–20
12	Apolipoprotein B	600–1550	Apolipoprotein C-III	6–20
13	α_1 -Acid glycoprotein	500–1200	Fibrinogen	5–18
14	α_2 HS-glycoprotein	400–1300	Gc-globulin	8–14
15	Hemopexin	500–1150	Apolipoprotein C-I	6–12
16	Gc-globulin (vitamin D-BP)	400–700	C3	5–10
17	Factor H	240–740	α_1 -Antichymotrypsin	4–9

Rank	Ranked by Mass Abundance (mg/L)		Ranked by Molecular Abundance ($\mu\text{mol/L}$)	
	Protein	Concentration	Protein	Concentration
18	α_1 -Antichymotrypsin	300–600	Apolipoprotein D	2–10
19	Inter- α -trypsin inhibitor	200–700	Prealbumin	4–8
20	Apolipoprotein A-II	260–510	β_2 -Glycoprotein I	3–6
21	C4b-binding protein	200–530	Apolipoprotein A-IV	3–6
22	Ceruloplasmin	200–500	Apolipoprotein C-II	2–7
23	Factor B	180–460	Serum amyloid A4	3–6
24	Prealbumin	200–400	Inter- α -trypsin inhibitor	3–5
25	Gelsolin	200–400	Antithrombin III	3–5
26	Fibronectin	300	α_1 B-glycoprotein	3–5
27	C1 inhibitor	190–370	Gelsolin	3–5
28	C4	100–400	Ceruloplasmin	2–5
29	Plasminogen	150–350	Factor H	2–5
30	Antithrombin III	170–300	Factor B	2–5

Προαλβουμίνη (prealbumin)

MB \approx 54.000

- Σύνθεση στο ήπαρ
- Δέσμευση θυροξίνης και τριϊωδοθυρονίνης
- Φλεγμονή $\downarrow\downarrow$

Κίρρωση ήπατος $\downarrow\downarrow$ (μειωμένη βιοσύνθεση)

- Προσδιορισμός : νεφελομετρία
Κυκλοτερής ανοσοδιάχυση
- Διαγνωστική σημασία : περιορισμένη

Αλβουμίνη, (Albumin)

MB \approx 66.000 (580 αμινοξέα)

- Κυριώτερη πρωτεΐνη στο πλάσμα 40-60 %
- Σύνθεση στο ήπαρ
- Κύριος βιολογικός ρόλος :
μεταφορά και αποθήκευση πολλών ουσιών,
πηγή ενδογενών αμινοξέων,
διατήρηση κολλοειδωσμητικής πίεσης στον ενδοαγγειακό χώρο, αύξηση της ρυθμιστικής χωρητικότητας του ορού
- Δέσμευση και μεταφορά : χολερυθρίνη, ελεύθερα λιπαρά οξέα, ορμόνες (θυροξίνη, τριωδοθυρονίνη, κορτιζόλη, αλδοστερόνη), φάρμακα, κατιόντα (Ca^{2+})

Αλβουμίνη, (Albumin)

Διαγνωστική σημασία

αύξηση : μικρή διαγνωστική σημασία

Υποαλβουμιναιμία - Κυριότερες Αιτίες:

Μειωμένη σύνθεση

- Υποσιτισμός
- Δυσαπαρρόφηση
- Ηπατοπάθεια

Αυξημένος όγκος κατανομής

- Υπερ-ενυδάτωση
- Αυξημένη διαπερατότητα τριχοειδών (σηψαιμία, υποξαιμία)

Αυξημένη απέκκριση/αποικοδόμηση

- Νεφρωτικό σύνδρομο
- Εντεροπάθειες με απώλεια πρωτεΐνης
- Εγκαύματα
- Αιμορραγία

Καταβολικές καταστάσεις

- Βαριά σήψη
- Πυρετός
- Τραύμα
- Κακοήθης ασθένεια

Αλβουμίνη, (Albumin)

Μέθοδοι προσδιορισμού

1. Πράσινο της βρωμοκρεσόλης (bromocresol green, BMG)
2. Ηλεκτροφόρηση
3. Ανοσοχημικοί προσδιορισμοί

οι προσδιορισμοί στο πλάσμα χρησιμοποιούνται για να εκτιμηθεί η ανταπόκριση του ασθενούς σε διαιτητική υποστήριξη (για μεγάλο χρονικό διάστημα)

χρόνος ημιζωής αλβουμίνης στο πλάσμα 20 ημέρες

έλεγχος ηπατικής λειτουργίας

φυσιολογική στην οξεία ηπατίτιδα

χαμηλή χαρακτηριστικό χρόνιας ηπατικής ασθένειας

α1- αντιθρυψίνη

- ο πρωτεΐνη οξείας φάσεως
- ο φυσικά απαντώμενος αναστολέας πρωτεασών : θρυψίνη, χυμοθρυψίνη, ελαστάση, καλλικρεΐνη, ρενίνη, κολλαγενάση
- ο έλλειψη α1-αντιθρυψίνης ⇒ ελεύθερη κυκλοφορία ενεργών πρωτεολυτικών ενζύμων ⇒ καταστροφή συνδετικού ιστού του πνεύμονα ⇒ πνευμονικό εμφύσημα, κίρρωση ήπατος

Μέθοδοι προσδιορισμού

ηλεκτροφόρηση

- ο νεφελομετρία

• Διαγνωστική σημασία προσδιορισμού της α1 αντιθρυψίνης

- Κλινικές συνέπειες διαταραχών της σύνθεσης της α1 αντιθρυψίνης
- Μπορεί να προκαλέσουν εμφύσημα σε νέα ηλικία (λόγω έλλειψης φυσιολογικής αναστολής του ενζύμου ελαστάση, γεγονός που οδηγεί σε αποδομητικές αλλοιώσεις στον πνεύμονα)
- Νεογνική ηπατίτιδα
- Ομοζυγώτες για τη φυσιολογική πρωτεΐνη Pi MM
- Τριάντα αλληλόμορφα του γονιδίου
- Ανεπάρκεια κυρίως οι ομοζυγώτες για το Z αλληλόμορφο PiZZ
- Συχνότητα γονοτύπου 1/3.000
- Ελάττωση 10-15%
- Η ατέλεια οφείλεται σε υποκατάσταση ενός μόνο αμινοξέος , η οποία οδηγεί την πρωτεΐνη στο σχηματισμό συσσωματωμάτων , που δεν μπορούν να εκκριθούν από το ήπαρ και προκαλούν καταστροφή του ήπατος

Έλλειψη α1 αντιθρυψίνης

Κύριο συστατικό της α1 ζώνης στην ηλεκτροφόρηση

Ομοζυγώτες.... Μείωση

Ετεροζυγώτες...δεν παρατηρείται μεταβολή

Διάγνωση μέσω ισοηλεκτρικής εστίασης

χαρακτηρίζει τις παραλλαγμένες πρωτείνες

Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των φαινότυπων

Προγεννητικός έλεγχος με την αντίδραση PCR,
ενισχύοντας το εμβρυϊκό DNA

α2-περιοχή

Απτοσφαιρίνη (haptoglobin, HAP)

- πρωτεΐνη οξείας φάσης
- Δέσμευση ελεύθερης αιμοσφαιρίνης που απελευθερώνεται στο πλάσμα κατά τη διάρκεια της ενδοαγγειακής αιμόλυσης (2 μόρια)
- τα σύμπλοκα αιμοσφαιρίνης απτοσφαιρίνης απομακρύνονται μέσω του ενδοθηλιακού συστήματος και έχουμε μείωση των επιπέδων της απτοσφαιρίνης
- Δέσμευση μέσω α-αλυσίδας
- δεν δεσμεύει μεθαιμοσφαιρίνη, αίμη
- Προστατεύει τον οργανισμό μέσω παρεμπόδισης απώλειας αιμοσφαιρίνης στα ούρα
- Διατήρηση του σιδήρου στον οργανισμό
- Χαμηλές συγκεντρώσεις παρατηρούνται σε χρόνια ηπατοπάθεια, μεταστατική νόσο και βαριά σήψη

α2- Μακροσφαιρίνη

- MW: 820.000 Daltons
- Συνιστά το 1/3 των α2-σφαιρινών
- Παρεμποδιστής πρωτεασών με ευρύ φάσμα δραστηριότητας
- 8% υδατάνθρακες, pI ≈ 5,4

· Δέσμευση &
παρεμπόδιση }
δράσης

ενδοπεπτασών
πρωτεασών
(πλασμίνη, πεψίνη, θρυψίνη,
χυμοθρυψίνη)

· Διαγνωστική } ↑↑ νεφρωτικό σύνδρομο
σημασία } περιορισμένη

· Μέθοδοι } ανοσοχημικές
Προσδιορισμού } νεφελομετρία
ηλεκτροφόρηση

Σερουλοπλασμίνη (Ceruloplasmin)

- α2- γλυκοπρωτεΐνη , πρωτεΐνη οξείας φάσης
- ανεπάρκεια χαρακτηριστική για τη → νόσο Wilson
- Αυξάνεται στην εγκυμοσύνη
- Αυξάνεται με αντισυλληπτικά που περιέχουν υψηλά ποσοστά οιστρογόνων
- MW: 120000- 160000
- 6- 7 άτομα Cu / σερουλοπλασμίνη / 95% χαλκού
- 10% υδατάνθρακες , $pI \approx 4,4$
- βιολογική δράση → οξειδάση (υποστρώματα: πολυαμίνες, πολυφαινόλες)
- $Fe(II) \rightarrow Fe(III)$
- βιοσύνθεση: ήπαρ
- Δρά ως αντιοξειδωτικό (Το κυριότερο αντιοξειδωτικό στο πλάσμα μαζί με την τρανσφερίνη)
- Παρεμπόδιση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και παραγωγή ελευθέρων ριζών σε καταστάσεις φλεγμονής

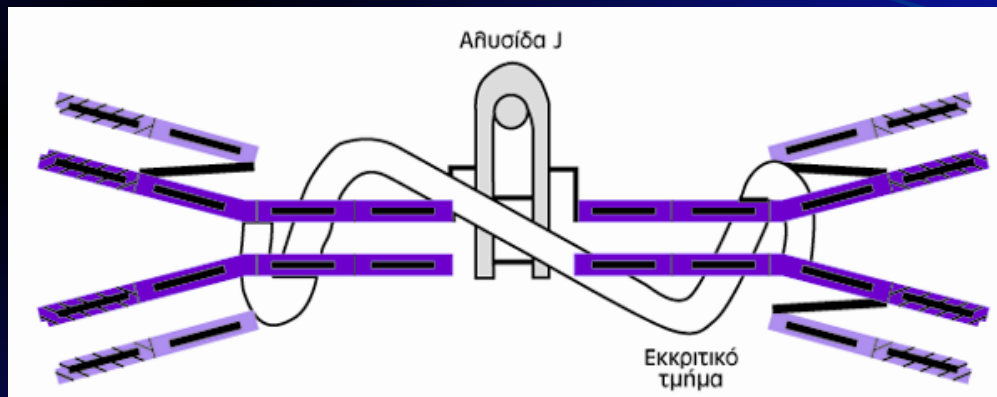
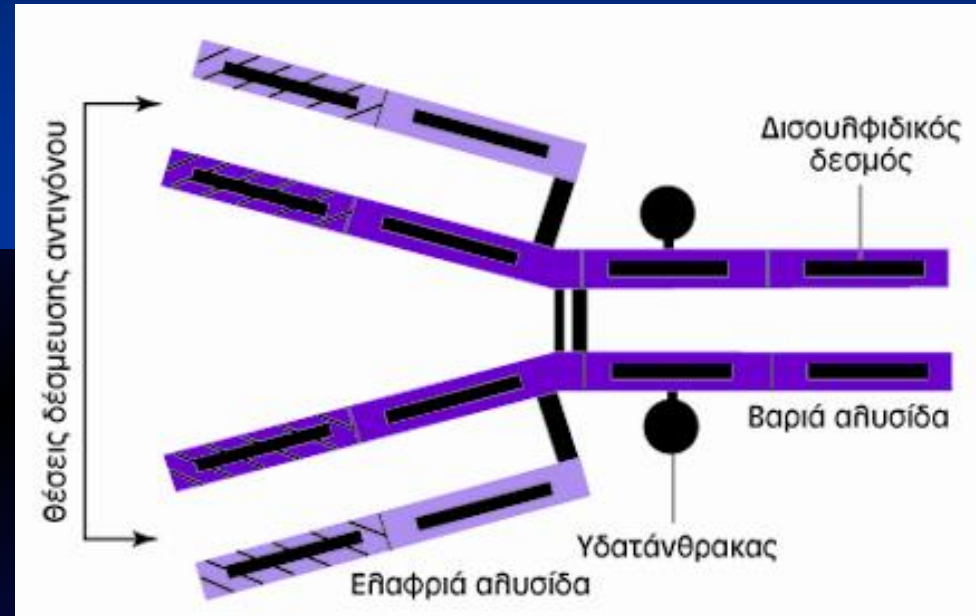
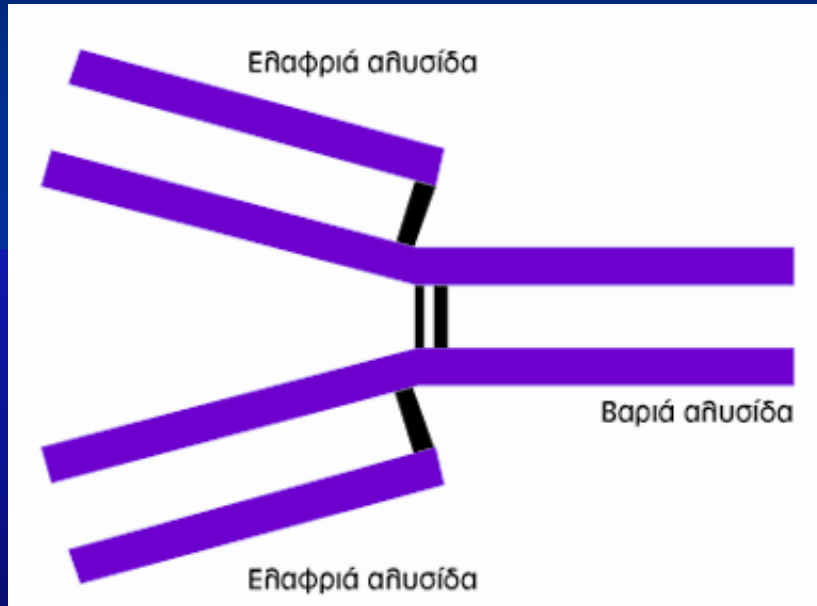
Τρανσφερρίνη / Σιδηροφυλλίνη

- β- σφαιρίνη
 - Κύριος μεταφορέας του σιδήρου στα διάφορα διαμερίσματα του οργανισμού
 - Φυσιολογικά κορεσμένη κατά 30%
 - Αιμοχρωμάτωση 100%
 - η μέτρηση της είναι χρήσιμη στην εκτίμηση της αναταπόκρισης στην τροφική υποστήριξη
 - 2 μόρια Fe^{3+} / μόριο τρανσφερρίνης
 - mw: 77.000
 - 6% υδατάνθρακες, $\text{pI} \approx 5,5- 5,9$
 - βιοσύνθεση – ήπαρ
 - Έλλειψη $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \uparrow\uparrow$ Τρανσφερρίνης , Αναιμία
- Νεφρωσικό
Σύνδρομο } απώλειες πρωτεΐνης => $\downarrow\downarrow$ Τρανσφερρίνης
εντεροπάθειες

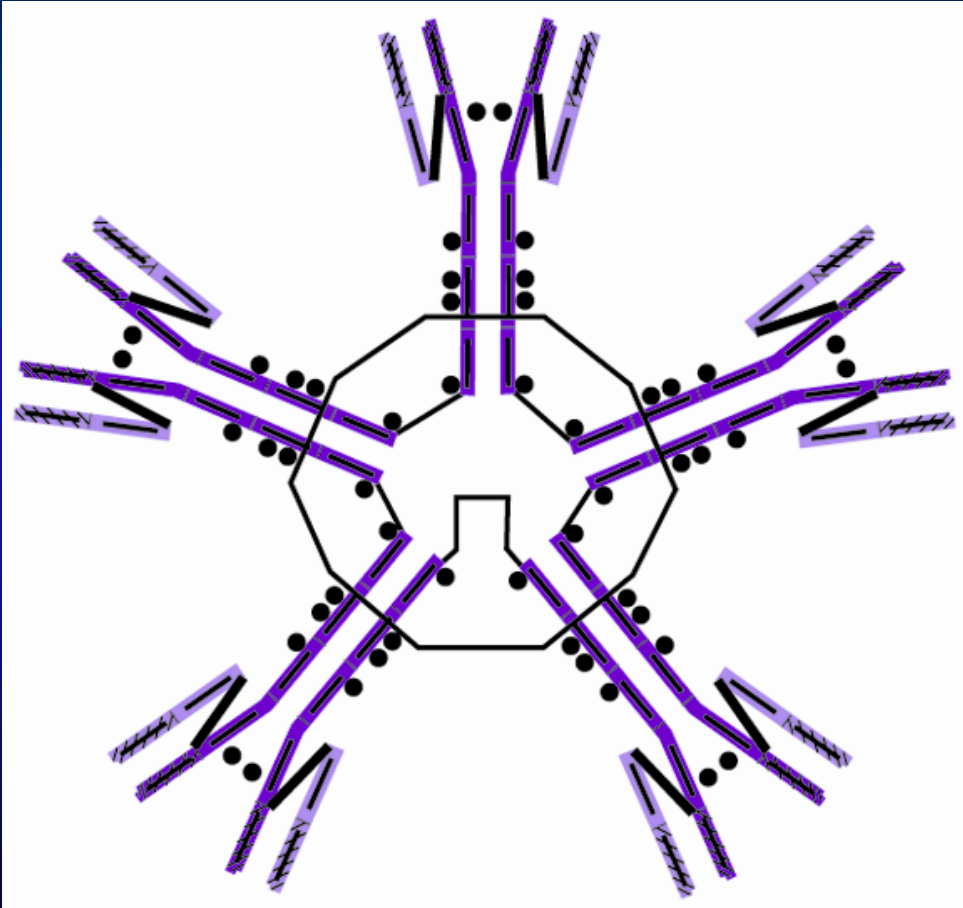
γ- Σφαιρίνες (Ανοσοσφαιρίνες)

- **IgA:** 10-15% / 160.000 / 10% υδατάνθρακες
- **IgG:** 70-75% / 160.000 / IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
- **IgM:** 5- 10% / 900.000 / 10% υδατάνθρακες
- **IgE:** 5-10% / 188.000 / 15% υδατάνθρακες
- **IgD:** 1% / 184.000 / 12% υδατάνθρακες

γ- Σφαιρίνες (Ανοσοσφαιρίνες)



IgM



- Η **σύνθεση της IgM** αρχίζει κατά τα τελευταία στάδια της εμβρυικής ζωής
- Είναι η πρώτη από τις ανοσοσφαιρίνες που σχηματίζεται μετά από αντιγονική διέγερση
- Σε ενήλικα αποτελεί το 10% των κυκλοφορούντων ανοσοσφαιρινών
- Η αύξησή της διεγείρεται από την παρουσία ξένων αντισωμάτων
- Μπορεί να συνδεθεί και να ενεργοποιήσει το σύστημα του συμπληρώματος

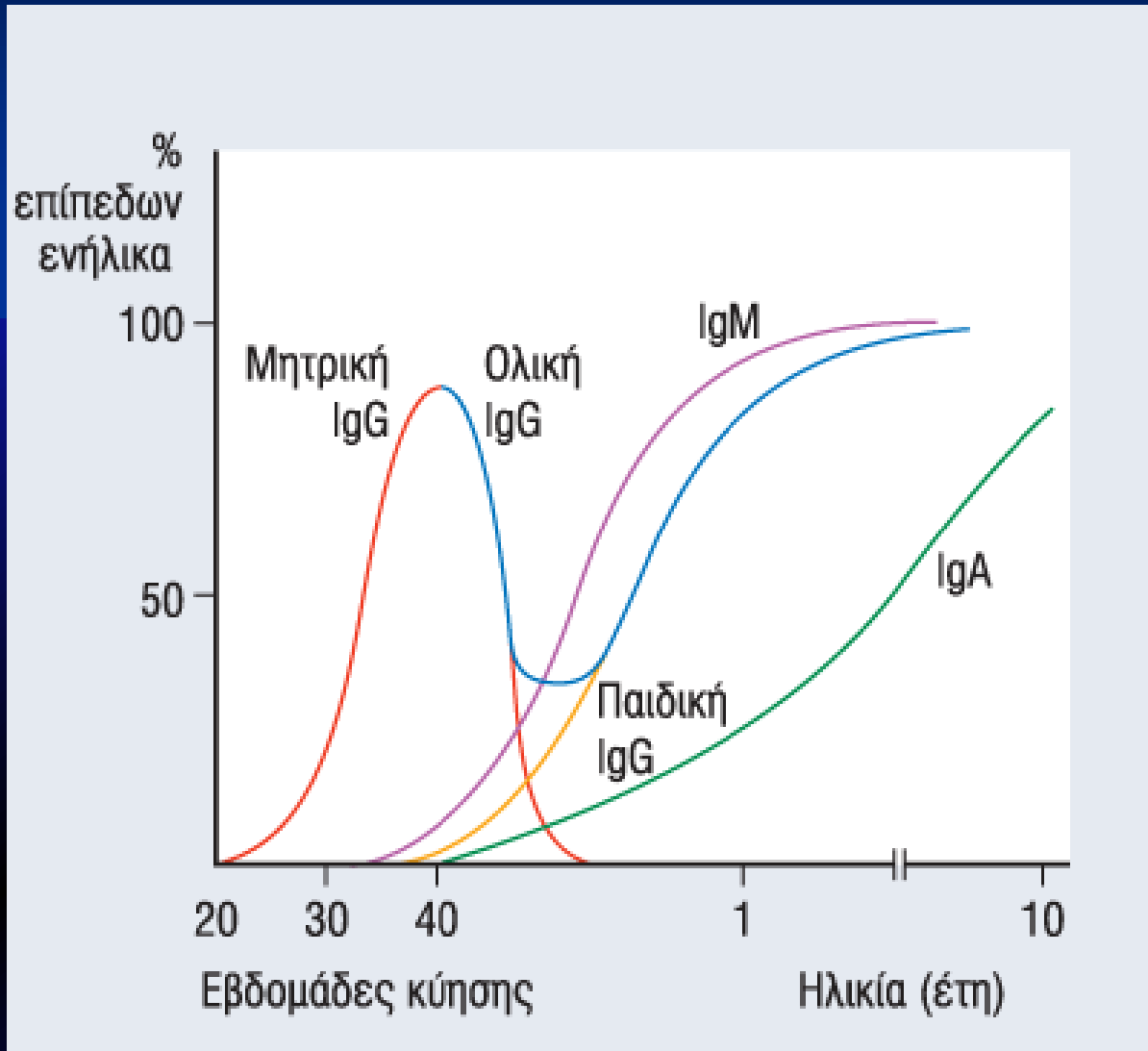
Χαρακτηριστικές ιδιότητες των τάξεων των ανοσοσφαιρινών

ΠΙΝΑΚΑΣ 9.1

Οι τάξεις των ανοσοσφαιρινών

Ανοσοσφαιρίνη	Μοριακός τύπος	Φυσική κατάσταση	Σθένος (αριθμός θέσεων δέσμευσης αντιγόνου)	Μοριακό βάρος (daltons)	Συγκέντρωση στον ορό ενήλικα (mg/dL)
IgG	$\gamma_2\kappa_2$	Μονομερές	2	160.000	1100
IgA	$\gamma_2\pi_2$	Μονομερές	2	170.000	230
	$\alpha_2\kappa_2$				
	$\alpha_2\pi_2$	Διμερές	4	385.000	
IgM	$\alpha_4\kappa_4$	Πενταμερές	10	900.000	190
	$\alpha_4\pi_4$				
IgD	$\mu_{10}\kappa_{10}$	Μονομερές	2	184.000	4
	$\mu_{10}\pi_{10}$				
IgE	$\delta_2\kappa_2$	Μονομερές	2	188.000	0,03
	$\delta_2\pi_2$				

Μεταβολές στις συγκεντρώσεις των ανοσοσφαιρινών στο πλάσμα ανάλογα με την ηλικία



ΠΙΝΑΚΑΣ 9.2

Τιμές αναφοράς για τις ανοσοσφαιρίνες του ορού σε διάφορες ηλικιακές ομάδες (mg/dL)

Ηλικία	Εύρος τιμών IgG	Εύρος τιμών IgA	Εύρος τιμών IgM
Ορός αίματος ομφάλιου θήρου	775-165	0.05-9	4-25
0,5-3 μηνών	305-835	3.5-6.3	16-125
3-6	145-970	5-86	19-114
6-12	425-1120	15-90	45-215
1-2 ετών	360-1185	14-113	38-232
2-3	500-1245	24-131	51-197
3-6	575-1355	36-199	53-207
6-9	670-1505	30-271	52-220
9-12	645-1570	63-282	67-268
12-16	695-1520	85-242	47-247

Τροποποιημένος από τους Hicks, J.M., and Boeckx, R.L.: Pediatric Clinical Chemistry. Philadelphia, W.B. Saunders, 1984.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9.4
Μεμονωμένες πρωτεΐνες ορού ως διαγνωστικά εργαλεία

Πρωτεΐνη ορού	Κλινική σημασία	Εύρος τιμών αναφοράς στον ορό	Λειτουργία
Προαλβουμίνη	↓ φλεγμονή, κακοήθεια, ηπατοκυτταρικές παθήσεις, υποσιτισμός	10-40 mg/dL	Μεταφορά θυροξίνης και βιταμίνης Α
α ₁ -όξινη γλυκοπρωτεΐνη	↑ πρωτεΐνη οξείας φάσης, φλεγμονή, ρευματοειδής αρθρίτιδα, συστηματικός ερυθηματώδης λύκος	50-150 mg/dL	Άγνωστη, μεταφορά στεροειδών
α ₁ -αντιθρυψίνη	↑ πρωτεΐνη οξείας φάσης, ↓ συγγενής έλλειψη συνδεδεμένη με πνευμονικό εμφύσημα	75-200 mg/dL	Αναστολέας πρωτεάσης
Καρκινικό εμβρυικό αντιγόνο (CEA)	↑ καρκίνος του κόλου, παγκρέατος, πνευμόνων ή στομάχου	<3,0 ng/mL, μη καπνιστές <5,0 ng/mL καπνιστές	
α-εμβρυϊκή πρωτεΐνη	↑ ελλείμματα εμβρυϊκού νευρικού σωλήνα (βλ. Κεφάλαιο 15), ηπατικοί όγκοι	10-60 ng/mL 16η εβδομάδα κύησης	Πρωτογενής πρωτεΐνη του εμβρυϊκού πλάσματος
Φερριτίνη	↓ αναιμία οφειλόμενη στην έλλειψη σιδήρου	12-125 ng/mL, γυναίκες 30-250 ng/mL, άνδρες	Αποθήκευση σιδήρου
Απτοσφαιρίνη	↑ αντίδραση οξείας φάσης, ↓ χρόνια ενδαγγειακή αιμόλυση	25-200 mg/dL	Δέσμευση ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα
β ₂ -μικροσφαιρίνη	↑ νεφρική ανεπάρκεια, φλεγμονή, νεοπλάσματα, απόρριψη νεφρικού μυσχεύματος	0,10-0,26 mg/dL	
Τραναφερρίνη	Διαφορική διάγνωση		Μεταφορές σιδήρου
C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)	↑ πρωτεΐνη οξείας φάσης		Ενεργοποίηση της κλασικής οδού συμπληρώματος
Σερουλοπλάσμίνη	↑ νόσος Wilson, εγκυμοσύνη, αντισυλληπτικά		Σύνδεση με χαλκό, σιδηροοξειδάση

Πρωτεΐνες σε άλλα βιολογικά υγρά

Εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ)

Συνήθως δειγματοληπτείται για διαγνωστικούς σκοπούς με οσφυϊκή παρακέντηση

Συγκέντρωση πρωτεΐνης : 0.1- 0.4 g/L

Κυριαρχούσα πρωτεΐνη αλβουμίνη

Νεογνά: υψηλή συγκέντρωση μέχρι και 0.9 g/L

Ηλικιωμένοι: υψηλή συγκέντρωση

Εξέταση ΕΝΥ:

Προσοχή να μην επιμολύνεται με αίμα κατά τη δειγματοληψία

Εκτελείται συνήθως σε περιστατικά όπου υπάρχει υποψία μηνιγγίτιδας

Βιοχημική ανάλυση κυρίως για γλυκόζη και ολική πρωτεΐνη

Τι μπορεί να σημαίνει αυξημένη ολική πρωτεΐνη στο ΕΝΥ:

Μηνιγγίτιδα: έκκριση IgG στο ΕΝΥ, αύξηση ολικής πρωτεΐνης

όγκοι ΚΝΣ: (>5 g/L), λόγω παρεμπόδισης φυσιολογικής κυκλοφορίας ΕΝΥ

πολλαπλή σκλήρυνση: IgG/αλβουμίνη Αύξηση από 10% έως και 50%. Η αναλογία είναι παθολογική στο 80% των περιστατικών

με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου ανιχνεύονται ολιγοκλωνικές ζώνες στο 95% των περιπτώσεων

Πρωτεΐνες σε άλλα βιολογικά υγρά

πλευριτικό υγρό – ασκίτης:

προσδιορίζεται η συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης για να καθορισθεί αν το δείγμα είναι διίδρωμα (υγρό με χαμηλό πρωτεϊνικό περιεχόμενο) ή εξίδρωμα (υγρό με υψηλό πρωτεϊνικό περιεχόμενο εκκρινόμενο ως απάντηση σε φλεγμονή)

Η τιμή 30 g/L λαμβάνεται ως η διαχωριστική γραμμή μεταξύ των δύο τύπων υγρού.

Το κύριο ερώτημα:

ο ασκίτης ή το πλευριτικό υγρό είναι μολυσμένα ή οι υψηλές συγκεντρώσεις ολικής πρωτεΐνης οφείλονται στην παρουσία όγκου????

Αυτό καθορίζεται μόνο με μικροβιολογική και κυτταρολογική εξέταση

Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνών

Φωτομετρικές (μέθοδος Bradford)

Ανοσοχημικές (θολωσιμετρία,
νεφελομετρία, RIA, ELISA)

Ηλεκτροφόρηση

Ανοσοηλεκτροφόρηση

Φωτομετρικές (μέθοδος Bradford)



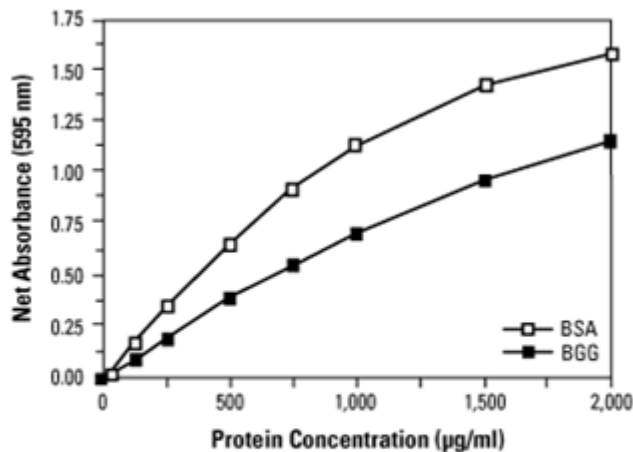
•Dr. Marion Bradford, 1976:
Bradford, MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254. 1976.

Χρωστική: coomassie brilliant blue G-250

Όξινο περιβάλλον: σύνδεση πρωτεΐνης με την χρωστική, αλλαγή περιοχής απορρόφησης της χρωστικής από 465nm σε 595nm


Μέτρηση απορρόφησης στα 595nm

Υπολογισμός συγκέντρωσης δείγματος με καμπύλη αναφοράς



Standard curves. Typical standard curves for bovine serum albumin (BSA) and bovine gamma globulin (BGG) in the Pierce Coomassie Protein Assay. The assay kit (Part No. 23200) includes ampules of Albumin Standard.

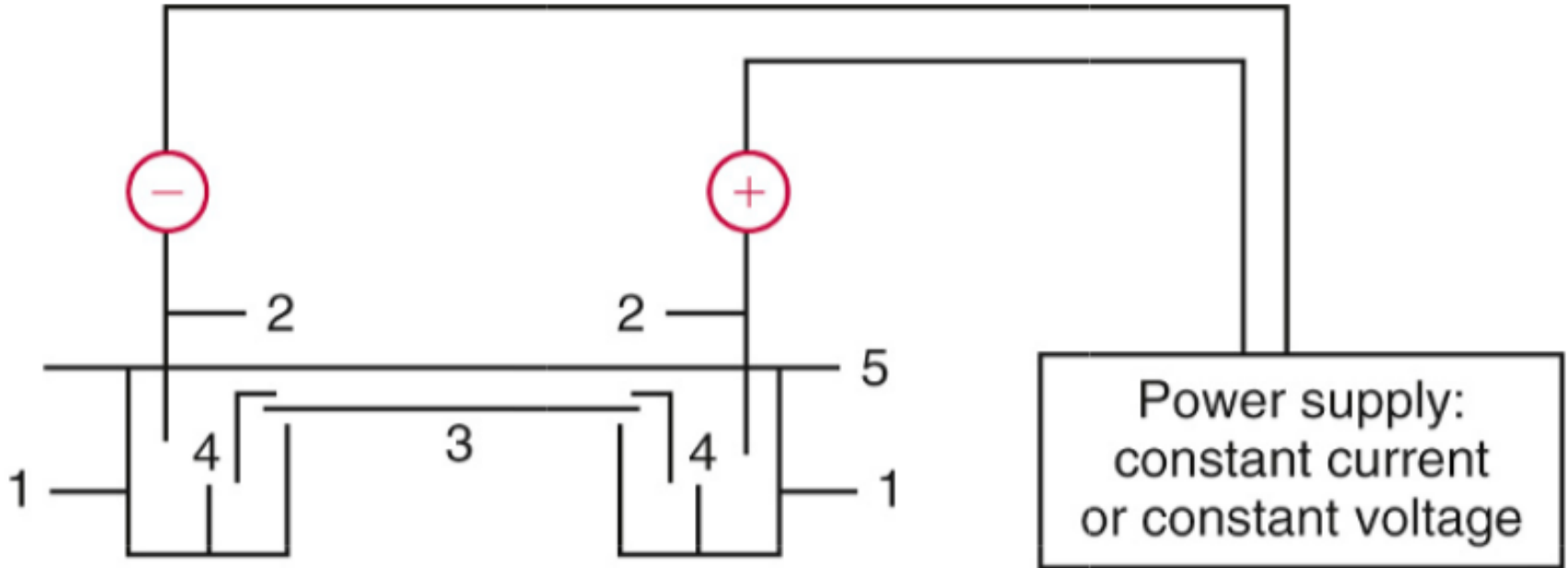
Ανοσοπροσδιορισμοί

- Θολωσιμετρία
 - Νεφελομετρία
 - RIA
 - ELISA
- 

Ηλεκτροφόρηση

- αποτελεί μια πολύτιμη αναλυτική μέθοδο για το διαχωρισμό ιονισμένων σωματιδίων, κυρίως βιομακρομορίων όπως οι πρωτεΐνες και το DNA
- χρησιμοποιείται ευρύτατα για διαχωρισμό πεπτιδίων, πρωτεϊνών του πλάσματος, των αιμοσφαιρινών, των ισοενζύμων, των λιποπρωτεϊνών, αλλά και στην έρευνα για διαχωρισμό και ταυτοποίηση πρωτεϊνών, DNA, RNA
- αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά και θεμελιώδη εργαλεία στην εργαστηριακή διαγνωστική ιατρική και στη μοριακή βιολογία.
- βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων σωματιδίων μέσα σ'ένα υγρό μέσον υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.
- Πρώτος ο Tiselius χρησιμοποίησε τη μέθοδο το 1937, για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών.

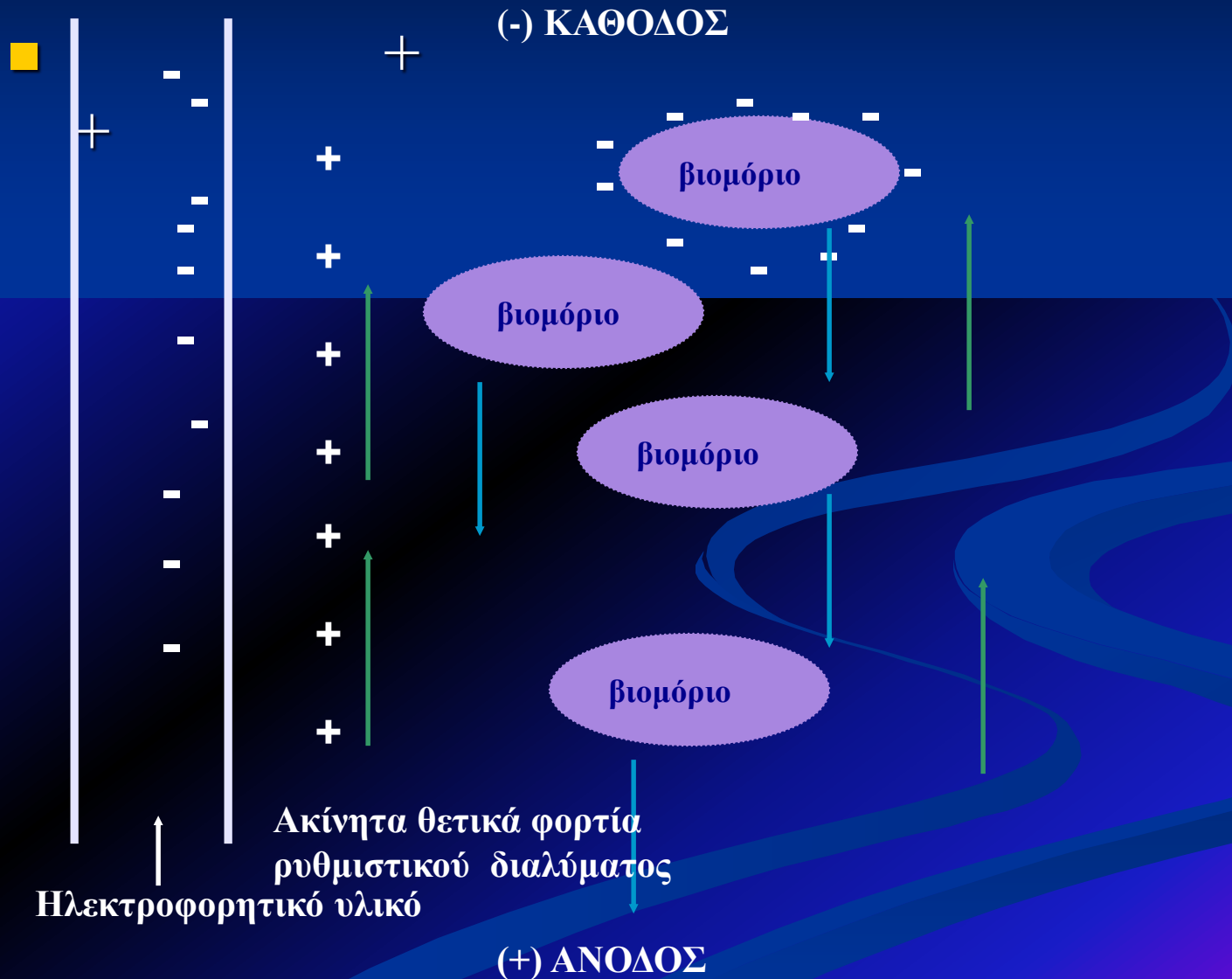
Ηλεκτροφόρηση-βασική συνδεσμολογία



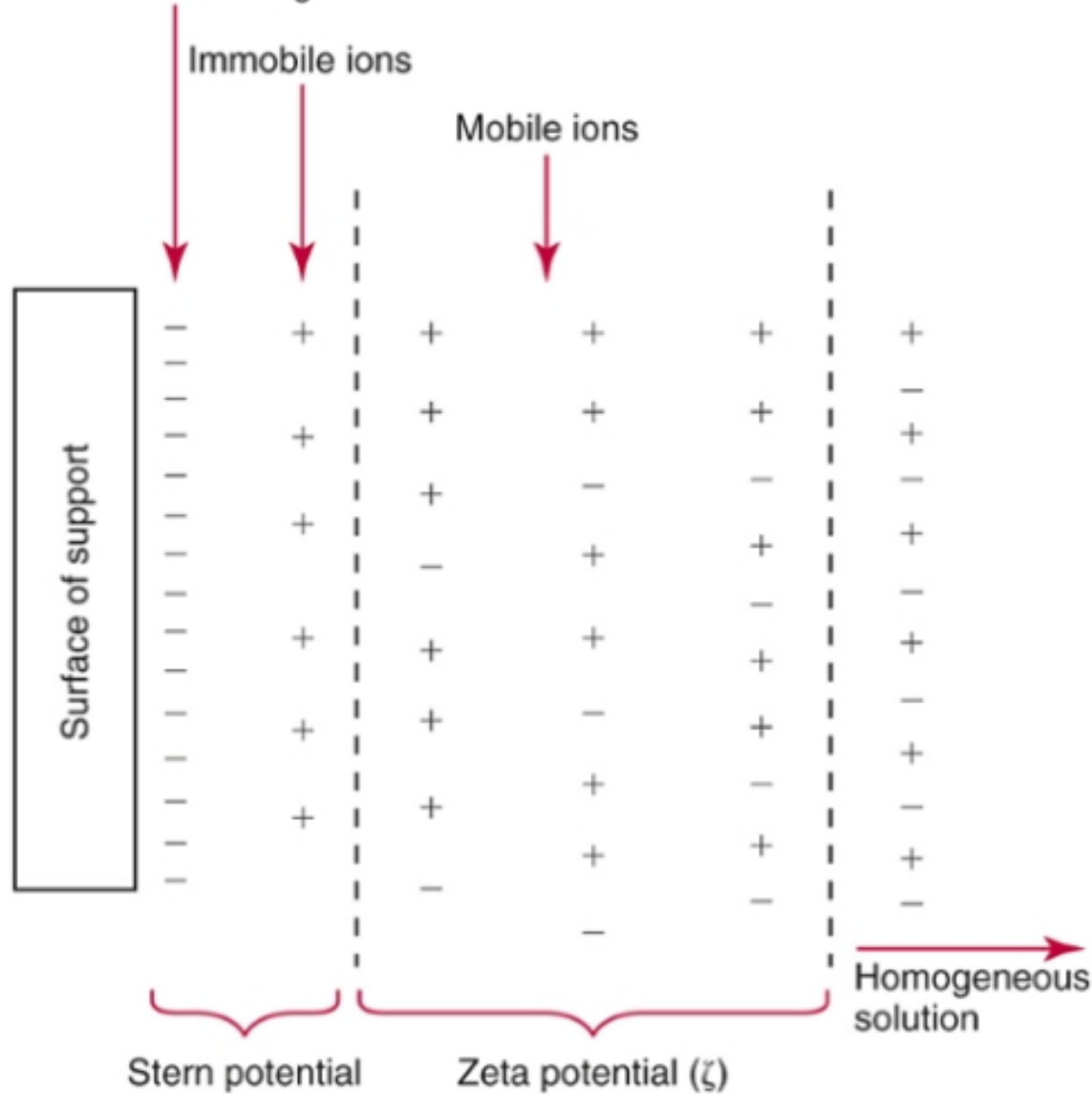
Παράγοντες που επηρεάζουν τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό

- pH
- θερμοκρασία
- ένταση του ηλεκτρικού πεδίου
- είδος του ηλεκτροφορητικού υλικού
- μέγεθος και σχήμα του βιομορίου
- φύση του ρυθμιστικού διαλύματος

Το είδος του ηλεκτροφορητικού υλικού - Ηλεκτροενδόσμωση (Electroendosmosis)



Fixed surface charges



Stern potential

Zeta potential (ζ)

Homogeneous solution

Ανίχνευση πρωτεϊνών σε ηλεκτροφόρημα

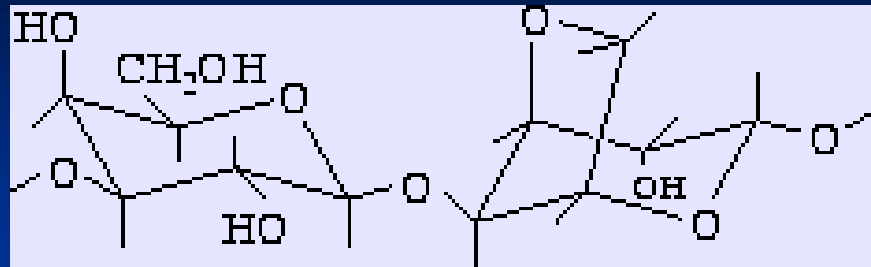
- **Πρωτείνες ορού**
Amido Black (640 nm),
Bromophenol Blue (600 nm),
Coomassie Brilliant Blue (595 nm),
Nigrosin (540 nm)
PONCEAU-S (520 nm).
- **διαχωρισμός ισοενζύμων**
ενζυματικές ενδεικτικές αντιδράσεις με NADH, ή NADPH, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή φορμαζάνης (570 nm).
- **Λιποπρωτεΐνες**
Sudan Red 7B (540 nm)
Oil Red O (520 nm)
Sudan Black (600 nm)
- **AgNO₃ (silver stain)**, με κύριο πλεονέκτημα την αύξηση της ευαισθησίας, διότι ενώ με τη χρωστική Coomassie Blue το όριο ανίχνευσης είναι 1 μg, πρωτεΐνης με τη χρώση αργύρου μειώνεται στα 10 ng.
- **Αυτοραδιογραφία:** χρήση ραδιενεργών ιχνηθετών, μόνο για ερευνητική χρήση

Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης (agarose gel electrophoresis)

χρησιμοποιείται ευρύτατα:

- στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών του ορού
- των ισοενζύμων (LDH, CK, ALP, αιμοσφαιρινών κ.α.)
- των κλασμάτων λιποπρωτεϊνών
- των νουκλεϊνικών οξέων (DNA, RNA).

Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης



- Η πηκτή αγαρόζης ως ηλεκτροφορητικό υλικό αποτελείται από πυκνό δίκτυο ουδέτερων πολυσακχαριτών (επαναλαμβανομένων μονάδων αγαρόζης), των οποίων οι αλυσίδες σχηματίζουν πόρους κατά το σχηματισμό της πηκτής,
- Διάλυμα αγαρόζης σε θερμοκρασία $\sim 100^{\circ}\text{C}$ πολυμερίζεται δημιουργώντας ένα κολλοειδές διάλυμα που πήζει σε θερμοκρασία μικρότερη των 45°C .
- Η πηκτή αγαρόζης, λόγω των μεγάλων πόρων που σχηματίζονται κατά τον πολυμερισμό, αποτελεί ένα ικανοποιητικό ηλεκτροφορητικό υλικό που δεν εμποδίζει στερεοχημικά την ελεύθερη μετακίνηση των βιομακρομορίων.

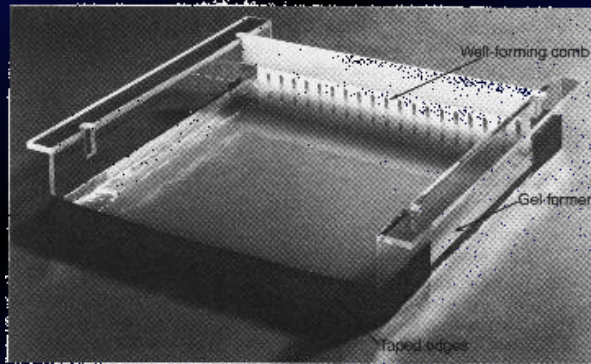
Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης



α) τροφοδοτικό

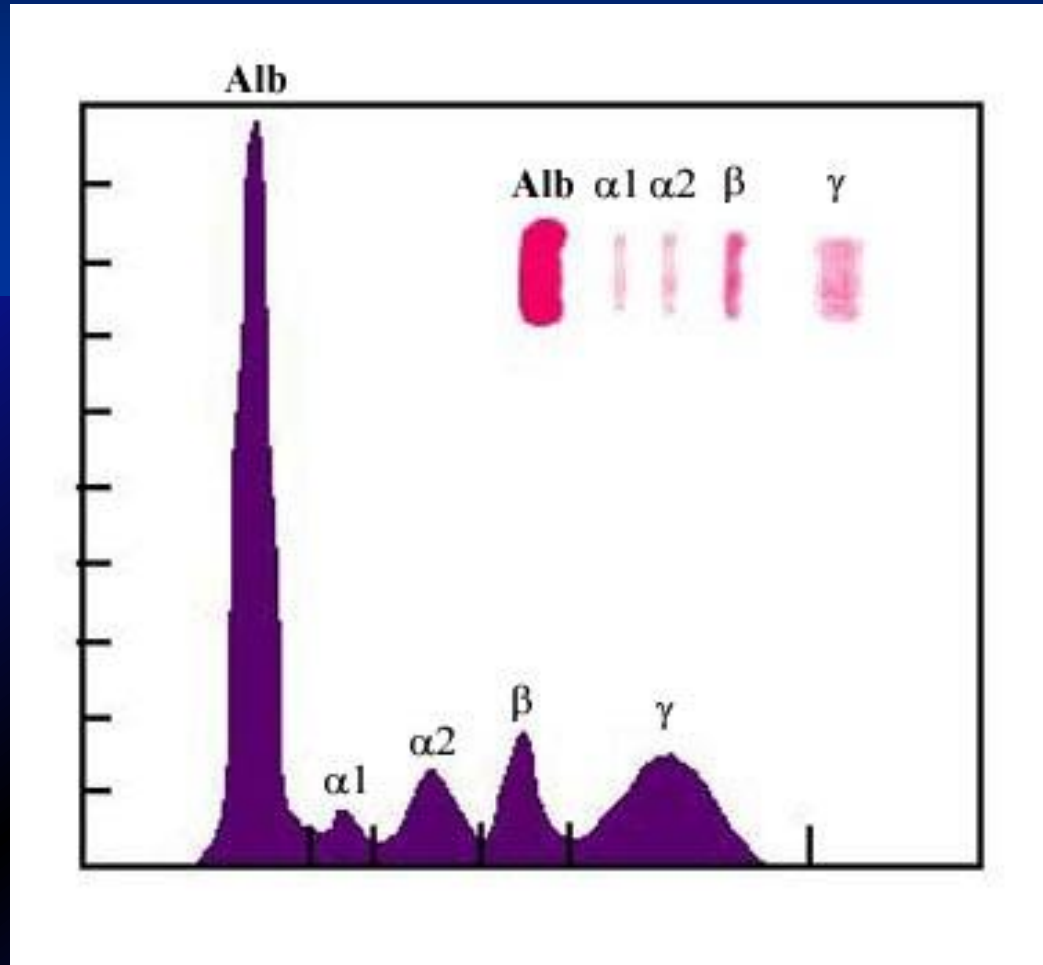


β) συσκευή

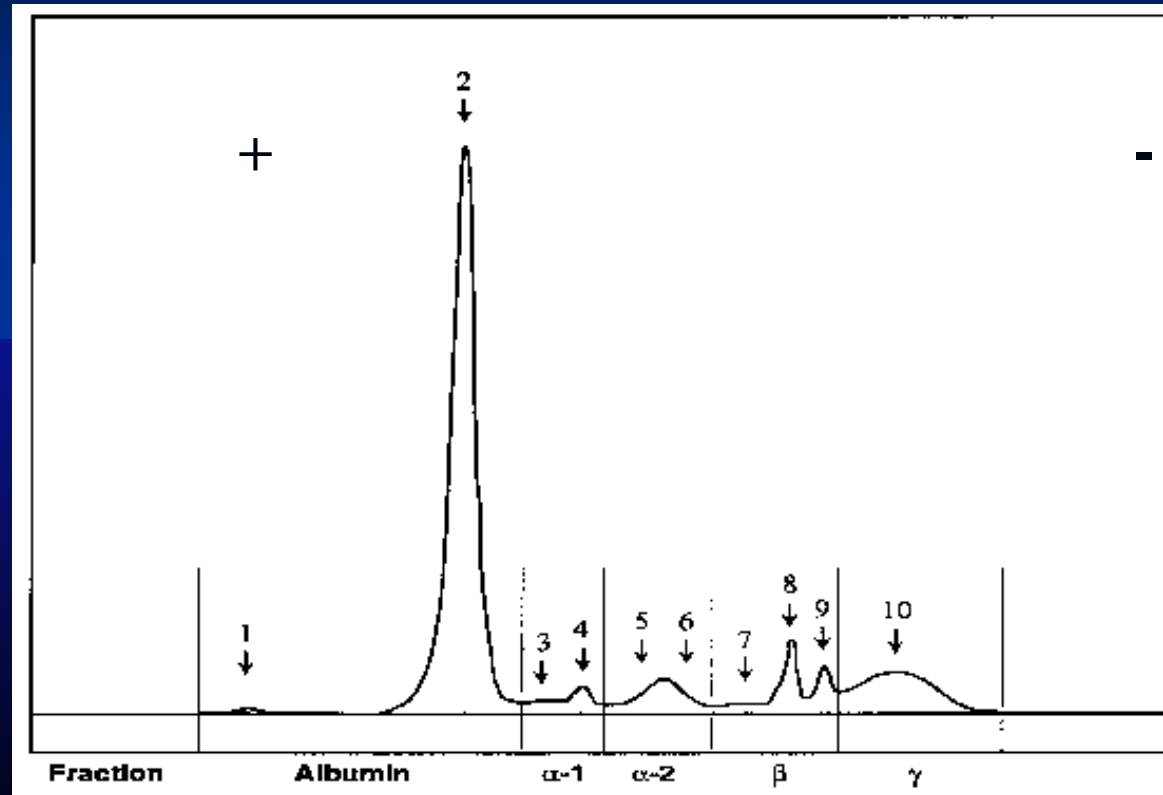


γ) παρασκευή πηκτής

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών του ορού σε πηκτή αγαρόζης



Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών του ορού σε πηκτή αγαρόζης

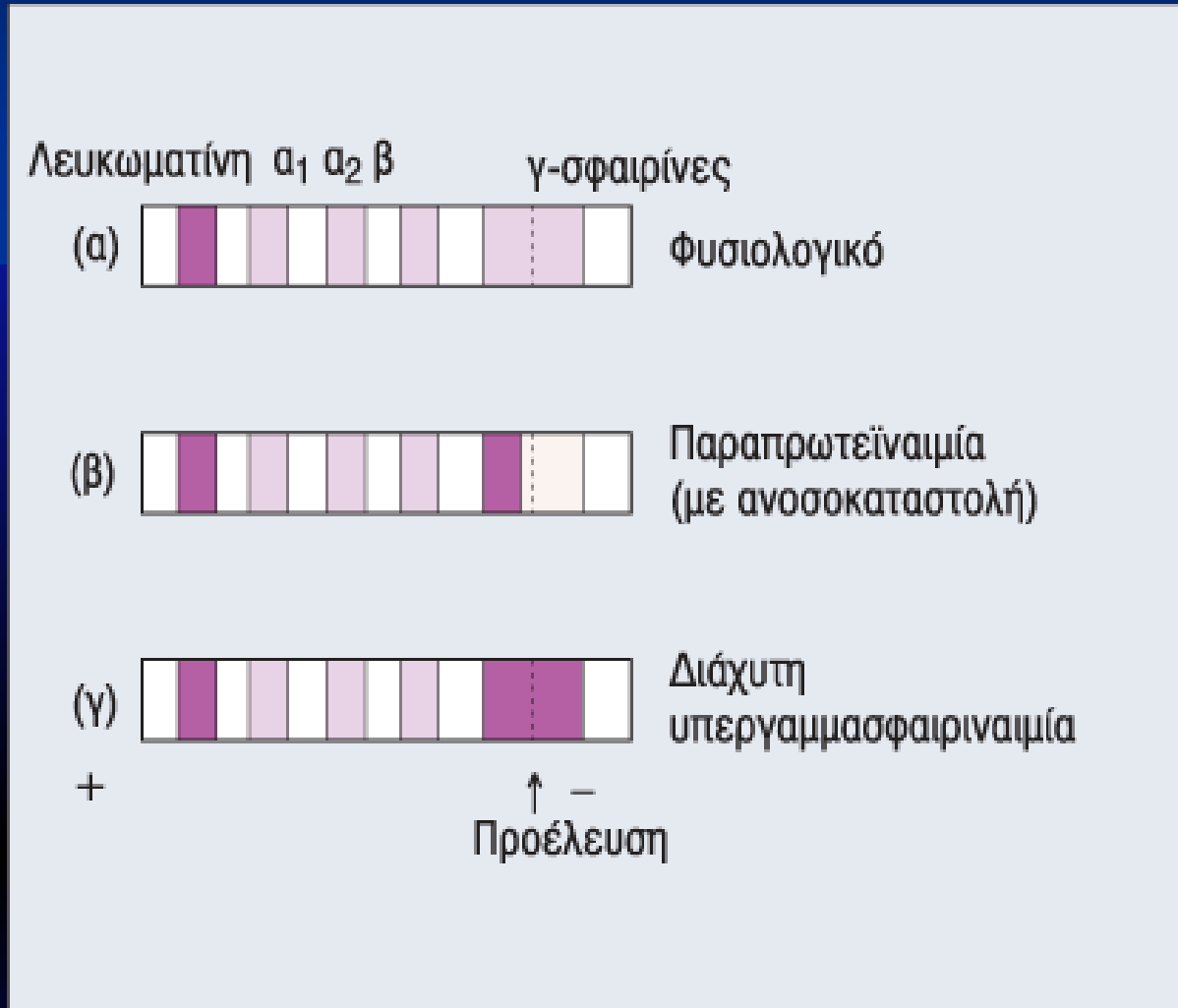


1. pre-albumin
2. Albumin
3. alpha 1-Acid-Glycoprotein
4. alpha 1-Antitrypsin
5. Haptoglobin
6. alpha2 macroglobulin
7. Hemopexin
8. Transferrin
9. Complement
10. Gamma

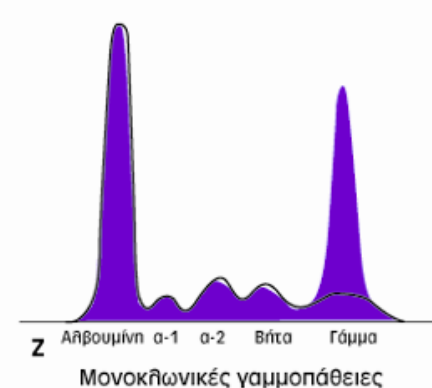
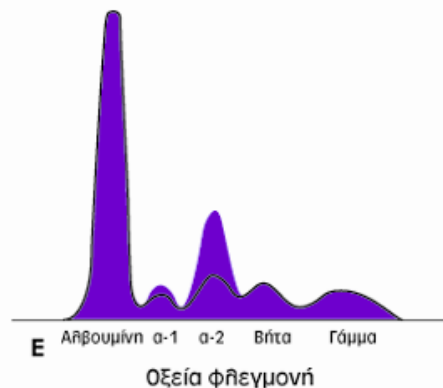
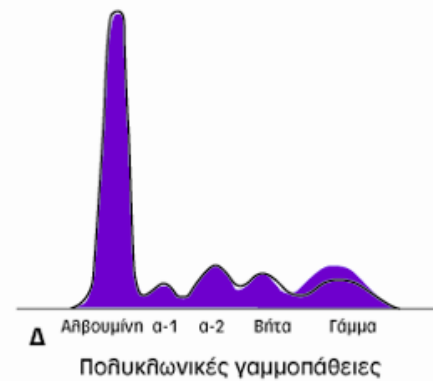
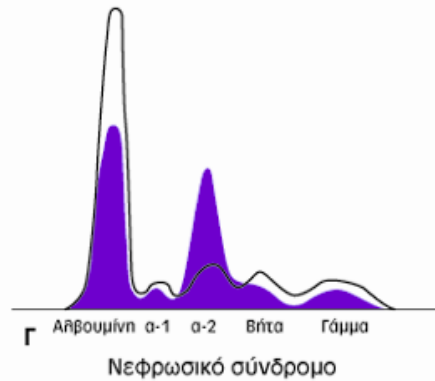
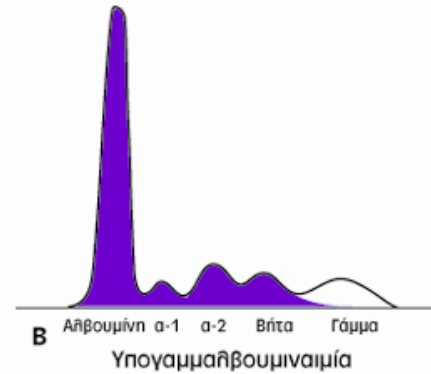
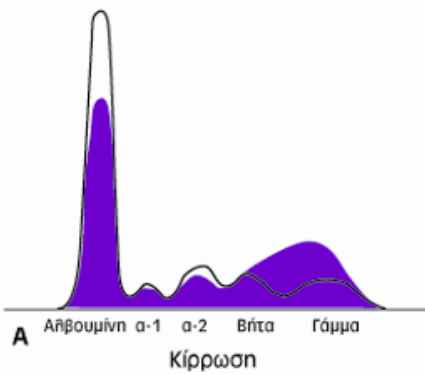
Προσοχή

- η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών μερικές φορές δεν είναι χρήσιμη και μπορεί να αποβεί παραπλανητική
- η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών είναι αμφίβολο αν έχει κάποια αξία στη διάγνωση και αντιμετώπιση ασθενειών με μόνη σοβαρή εξαίρεση την παραπρωτεϊναιμία.
- Η ηλεκτροφορητική ικανότητα των πρωτεϊνών μπορεί να αλλάξει όταν δεσμεύονται με φάρμακα ή άλλα προσδέματα όπως χολερυθρίνη, δημιουργώντας επιπρόσθετες ζώνες
- Για παράδειγμα η έλλειψη της IgA η πλέον συχνή διαταραχή συγγενούς ανοσοανεπάρκειας συχνά δεν αποκαλύπτεται με την ηλεκτροφόρηση

Μερικές παθολογικές εικόνες ηλεκτροφόρησης ορού

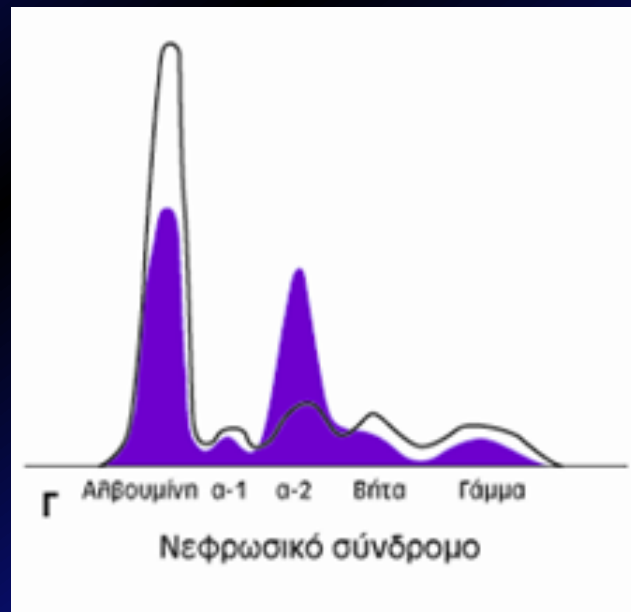


Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών του ορού σε πηκτή αγαρόζης



νεφρωτικό σύνδρομο

- μείωση αλβουμίνης και στις α_1 και γ σφαιρίνες
- αυξήσεις στις α_2 και β σφαιρίνες
- Η εικόνα αυτή όμως παρατηρείται μόνο στα πολύ σοβαρά περιστατικά αλλά και σε άλλες περιπτώσεις απώλειας πρωτεΐνης

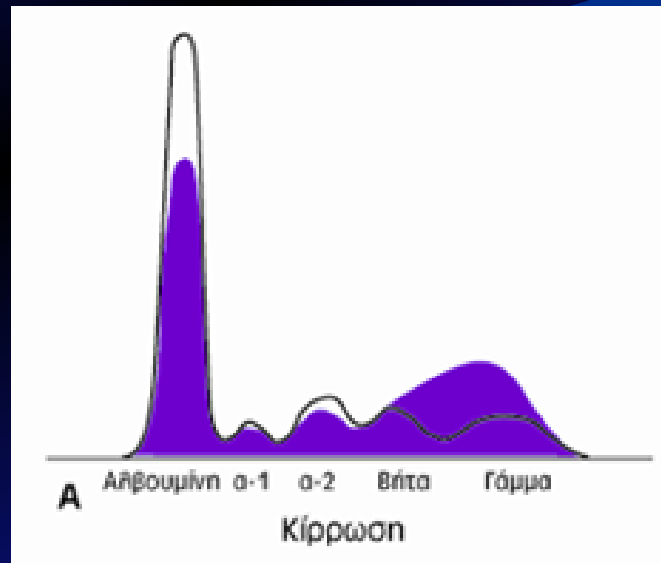


κίρρωση ήπατος

Η ηλεκτροφορητική εικόνα χαρακτηρίζεται από:

- ελαττωμένη αλβουμίνη
- διάχυτη αύξηση στις γ σφαιρίνες
- β και γ συγχώνευση οφείλεται στην αύξηση της IgA που εμφανίζεται σε μερικές μορφές της πάθησης

παρατηρείται μόνο σε προχωρημένες καταστάσεις και έχει μικρή διαγνωστική αξία



γ- Σφαιρίνες (Ανοσοσφαιρίνες)

Πολυκλωνική υπεργαμμασφαιριναιμία

- Λοιμώξεις
- ↑↑ αντισωμάτων στον ορό

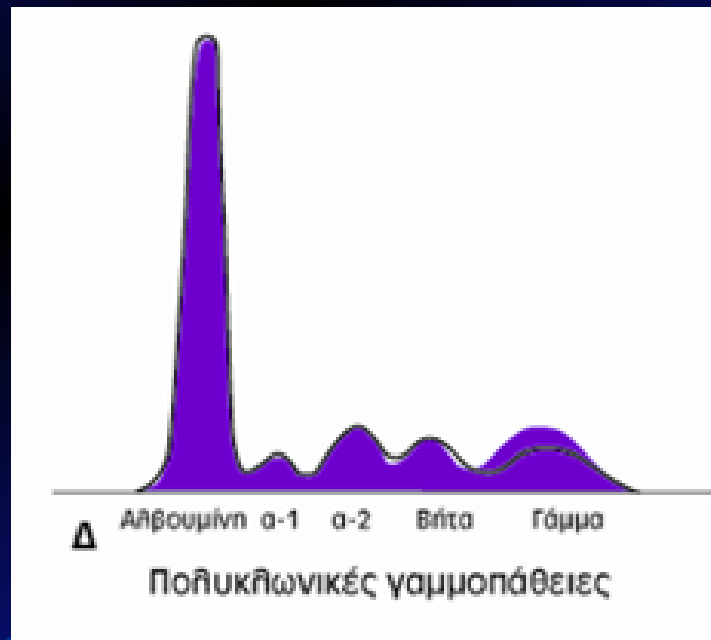
Μονοκλωνική υπεργαμμασφαιριναιμία

- νεοπλασία
- Β- λεμφοκύτταρο → μονοκλωνικό αντίσωμα

Πολλαπλούν μυέλωμα

ΥΠΕΡΓΑΜΜΑΣΦΑΙΡΙΝΑΙΜΙΑ

- αυξημένα επίπεδα γάμμα σφαιρινών παρατηρούνται σε:
- οξείες και χρόνιες μολύνσεις (σε αυτή την περίπτωση απαιτείται περαιτέρω ανίχνευση μιάς ανοσοσφαιρίνης έναντι κάποιου ειδικού αντιγόνου πχ Αυστραλιανού για την ηπατίτιδα Β)
- αυτοάνοσες ασθένειες ρευματοειδής νόσος, συστηματικός ερυθρηματώδης λύκος (SLE)
- χρόνιες ηπατοπάθειες (μερικές έχουν αυτοάνοση βάση, πχ πρωτοπαθής χολική κίρρωση)
- σε αυτές τις καταστάσεις παράγονται πολλές διαφορετικές ανοσοσφαιρίνες και δημιουργούν μία διάχυτη (πολυκλωνική) αύξηση στη ζώνη της γ σφαιρίνης



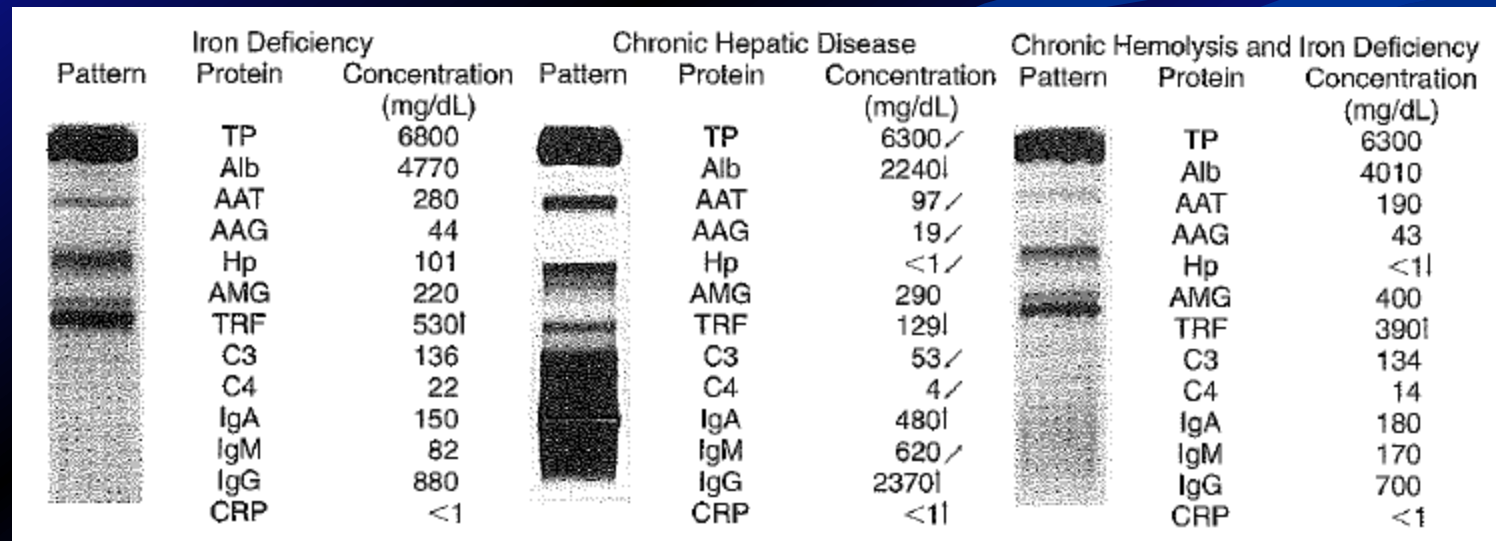
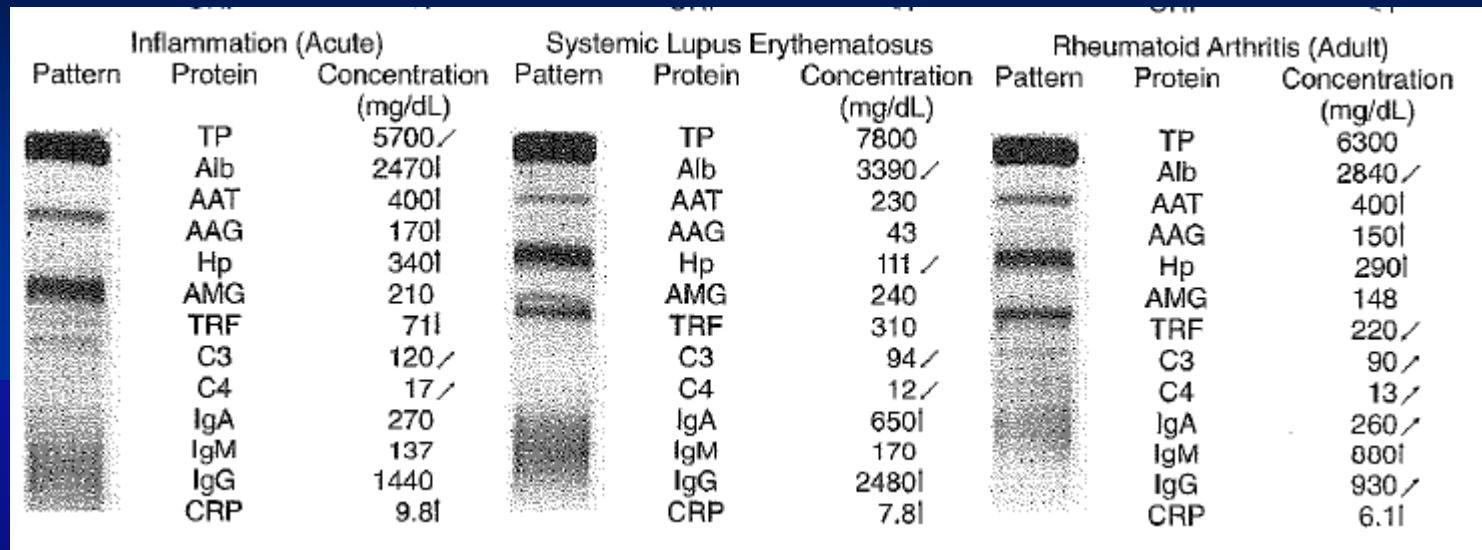
Χαρακτηριστικά καταγραφήματα (Tietz textbook of Clin Chemistry)

Normal (Adult)			Normal (Pediatric)			Chronic Renal Disease		
Pattern	Protein	Concentration (mg/dL)	Pattern	Protein	Concentration (mg/dL)	Pattern	Protein	Concentration (mg/dL)
	TP	6800-8300		TP	6900		TP	2300↓
	Alb	3500-5000		Alb	4390		Alb	1110↓
	AAT	100-200		AAT	240		AAT	260↓
	AAG	50-150		AAG	59		AAG	72↓
	Hp	30-215		Hp	65		Hp	101
	AMG	125-140		AMG	490		AMG	180
	TRF	200-350		TRF	300		TRF	81
	C3	70-150		C3	127		C3	71↓
	C4	10-40		C4	27		C4	14↓
	IgA	40-390		IgA	180		IgA	67↓
	IgM	25-210		IgM	140		IgM	47↓
	IgG	525-1650		IgG	870		IgG	200↓
	CRP	<2		CRP	<1		CRP	<1

IgG Monoclonal Gammopathy (Benign)			IgA Monoclonal Gammopathy (Multiple Myeloma)			Nephrotic Syndrome		
Pattern	Protein	Concentration (mg/dL)	Pattern	Protein	Concentration (mg/dL)	Pattern	Protein	Concentration (mg/dL)
	TP	6900↓		TP	9100↓		TP	2900↓
	Alb	4380↓		Alb	2170↓		Alb	680↓
	AAT	200		AAT	250		AAT	160↓
	AAG	50		AAG	63		AAG	35↓
	Hp	75		Hp	97		Hp	370*
	AMG	220		AMG	170		AMG	460↓
	TRF	270		TRF	150		TRF	101↓
	C3	122		C3	90		C3	125↓
	C4	24		C4	20		C4	22↓
	IgA	70↓		IgA	5800↓		IgA	250↓
	IgM	170↓		IgM	24↓		IgM	93↓
	IgG	1330↓		IgG	200↓		IgG	440↓
	CRP	<1		CRP	<1		CRP	<1

Inflammation (Acute)			Systemic Lupus Erythematosus			Rheumatoid Arthritis (Adult)		
Pattern	Protein	Concentration (mg/dL)	Pattern	Protein	Concentration (mg/dL)	Pattern	Protein	Concentration (mg/dL)
	TP			TP			TP	
	Alb			Alb			Alb	
	AAT			AAT			AAT	
	AAG			AAG			AAG	
	Hp			Hp			Hp	
	AMG			AMG			AMG	
	TRF			TRF			TRF	
	C3			C3			C3	
	C4			C4			C4	
	IgA			IgA			IgA	
	IgM			IgM			IgM	
	IgG			IgG			IgG	
	CRP			CRP			CRP	

Χαρακτηριστικά καταγραφήματα (Tietz textbook of Clin Chemistry)



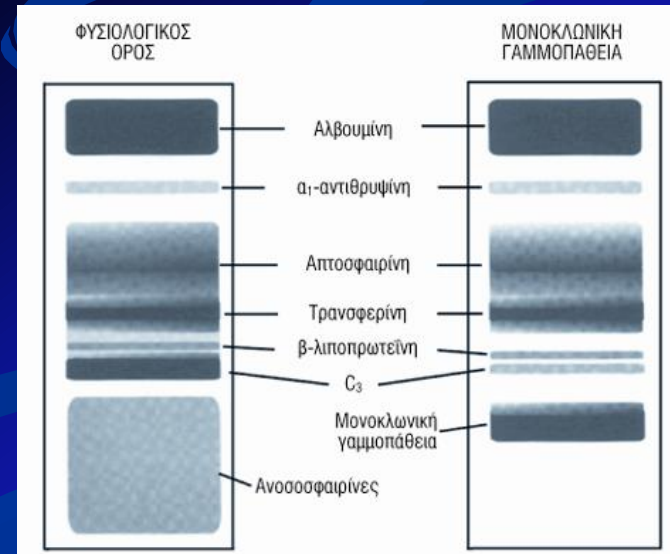
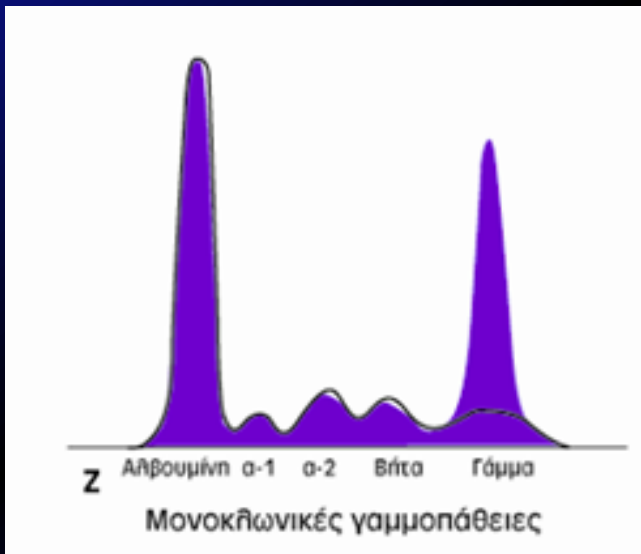
ΠΙΝΑΚΑΣ 9.3

Μεταβολές στην ολική πρωτεΐνη και τα ηλεκτροφορητικά κλάσματα σε διάφορες παθήσεις*

Πάθηση	Ολική πρωτεΐνη	Αλβουμινη	Σφαιρίνη			
			α_1	α_2	β	γ
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	N	↓	N ↑	↑	N	↑
Ερυθματώδης λύκος	N ↑	↓	N	↑	N	↑
Οξεία σπειραματονεφρίτιδα	N	N ↓	N ↑	↑	N	N ↑
Νεφρωσικό σύνδρομο	↓	↓	N ↓	↑	N ↑	↓
Ηπατίτιδα						
Οξεία	N ↓	↓	N ↑	↓	N	↑
Χρόνια (κίρρωση) [†]	N ↓	↓	N	↓	↑	↑
Χολόσταση	N	N	N	↑	↑	N
Οξεία λοίμωξη	N	N ↓	↑	N ↑	N	N
Χρόνια λοίμωξη	N ↓	↓	↑	↑	N	↑
Υποσιτισμός	↓	↓	N	N	N	↓
Πολυθηπλό μυέλωμα [§]	↑	↓	N	N ↑	N ↑	N ↓
Υπογαμμασφαιριναμία	↓	N	N	N	N	↓

ΠΑΡΑΠΡΩΤΕΙΝΑΙΜΙΑ

- παραπρωτεΐνη είναι ανοσοσφαιρίνη που παράγεται από ένα μοναδικό κλώνο κυττάρων της σειράς των Β-λεμφοκυττάρων.
- Επειδή όλα τα μόρια αυτά είναι παρόμοια η παραπρωτεΐνη εμφανίζεται στην ηλεκτροφόρηση ως μία οξεία ζώνη συνήθως στη γ περιοχή
- Κατά την ηλεκτροφόρηση πλάσματος η παρουσία μιας ζώνης ινωδογόνου μπορεί να μιμηθεί ή να καλύψει μία παραπρωτεΐνη
- Απαντώνται κυρίως στο πολλαπλούν μυέλωμα (διάχυτος κακοήθης πολλαπλασιασμός των πλασματοκυττάρων)
- Σε αυτή την περίπτωση πρέπει να εξετάζονται και τα ούρα
- Στο 20% των περιπτώσεων ο όγκος παράγει ελαφρές αλυσίδες μόνο
- Αυτές είναι μικρού μοριακού βάρους και ανιχνεύονται στα ούρα ως πρωτεΐνες Bence Jones και απαντώνται στο 50% των περιστατικών με μυέλωμα
- Οι παραπρωτεΐνες μπορεί επίσης να είναι καλοήθεις
- Το 3% ατόμων άνω των 70 έχουν καλοήθη παραπρωτεϊναιμία



Παραπρωτεΐνες στο μυέλωμα

Παραπρωτεΐνες στο μυέλωμα	
Πρωτεΐνη	Συχνότητα (%)
IgG	55
IgA	22
IgD	1,5
Bence-Jones	75
Bence-Jones μόνο	20

Εικόνα 13.10 Παραπρωτεΐνες στο μυέλωμα. Οι IgE και IgM απαντώνται στο μυέλωμα, αλλά είναι πολύ σπάνιες. Σε περίπου 1% όλων των περιπτώσεων, δεν ανιχνεύεται παραπρωτεΐνη.

Τυπικά διαγνωστικά κριτήρια στην καλοήθη παραπρωτεϊναιμία

Τυπικά διαγνωστικά κριτήρια στην καλοήθη παραπρωτεϊναιμία

Απουσία κλινικής εκδήλωσης μυελώματος ή σχετικής διαταραχής (π.χ. απουσία αναιμίας ή υπερασβεστιαϊμίας, φυσιολογική νεφρική λειτουργία)

Απουσία καταστολής των φυσιολογικών ανοσοσφαιρινών

Απουσία λυτικών αλλοιώσεων στην ακτινογραφία των οστών

Φυσιολογικός μυελός οστών

Συγκέντρωση παραπρωτεΐνης <30 g/L

Απουσία πρωτεϊνουρίας Bence-Jones

Απουσία αύξησης συγκέντρωσης παραπρωτεΐνης με την ηλικία

Απουσία θετικής ένδειξης κακοήθειας κατά την παρακολούθηση (για τρία τουλάχιστον έτη)

Τυπικά εργαστηριακά ευρήματα στο πολλαπλό μυέλωμα

Τυπικά εργαστηριακά ευρήματα στο πολλαπλό μυέλωμα

Βιοχημικά

Ορός: Παραπρωτεΐνη
↓ φυσιολογικές ανοσοσφαιρίνες
↑ ουρία
↑ κρεατινίνη
↑ β₂-μικροσφαιρίνη
↑ ασβέστιο
↑ ουρικό
Φυσιολογική αλκαλική φωσφατάση

Ούρα: Πρωτεΐνη Bence-Jones

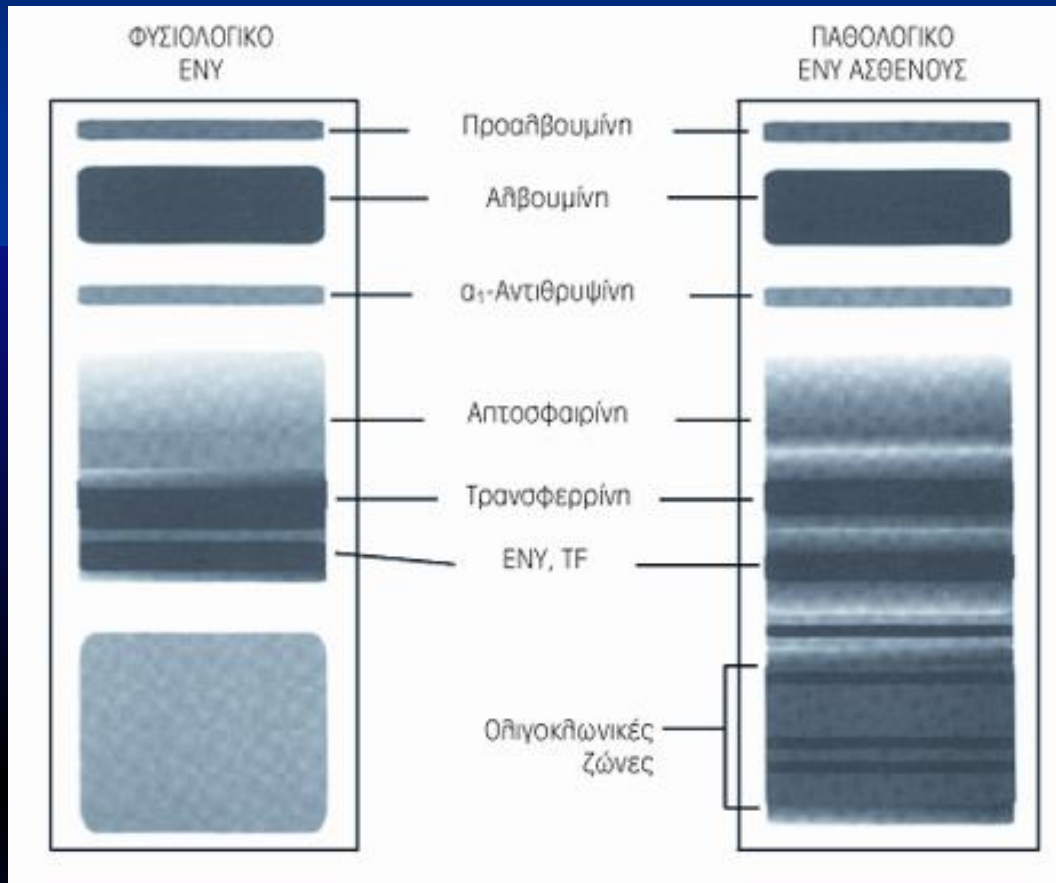
Αιματολογικά

↑ ταχύτητα καθίζησης ερυθροκυττάρων (ΤΚΕ)
Αναιμία (συνήθως ορθόχρωμη, ορθοκυτταρική)
Σχηματισμός κυλίνδρων

έλλειψη α1 αντιθρυψίνης

- α1 αντιθρυψίνη
- κύριο συστατικό της ζώνης της α1 σφαιρίνης
- σε ασθενείς με έλλειψη της α1 αντιθρυψίνης ομόζυγους για το γονίδιο Z, η ζώνη αυτή είναι πολύ εξασθενημένη
- σε ετεροζυγώτες μπορεί να φαίνεται φυσιολογική
- για προγενετικό έλεγχο και συμβουλές σε συγγενείς ασθενών πρέπει να γίνεται ισοηλεκτρική εστίαση

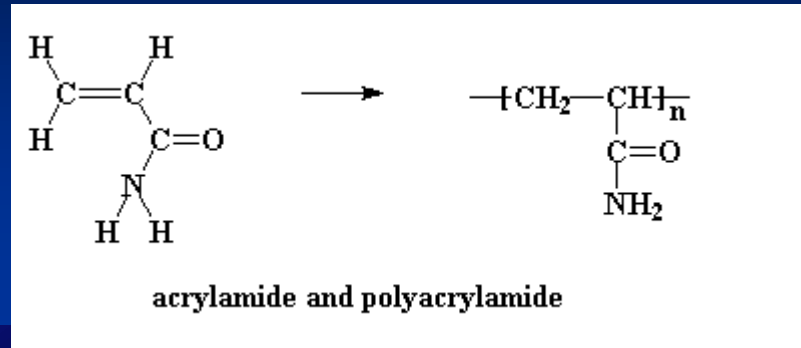
Ηλεκτροφόρηση Εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ΕΝΥ)



Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

- χαρακτηρίζεται από υψηλή διαχωριστική ικανότητα.
- Σε επίπεδο πρωτεϊνών χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ανίχνευση γενετικών ανωμαλιών και διαχωρισμό ισοενζύμων.
- Κατά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών του ορού διαχωρίζονται με την τεχνική αυτή είκοσι και πλέον κλάσματα, ενώ οι απλές τεχνικές (οξική κυτταρίνη, αγαρόζη) δίνουν συνήθως 5 πρωτεϊνικά κλάσματα.
- Άλλο σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί η πολύ χαμηλή ηλεκτροενδόσμωση και η μεγάλη περιοχή pH που μπορεί να χρησιμοποιηθεί.
- Σε συνδυασμό με την επιφανειοδραστική ουσία, δωδεκυλικό θειϊκό νάτριο, SDS (Sodium-dodecyl sulfate), η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό πρωτεϊνών όχι με βάση το ηλεκτρικό τους φορτίο αλλά με βάση τη διαφορά του μοριακού βάρους (SDS-PAGE electrophoresis).

Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου κυριότεροι παράγοντες



- Συγκέντρωση ακρυλαμιδίου
- Αναλογία ακρυλαμιδίου προς δισακρυλαμίδιο στην πηκτή (cross linking)
- Παρουσία προσθέτου
- Θερμοκρασία
- ένταση ηλεκτρικού πεδίου

Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου



α) τροφοδοτικό

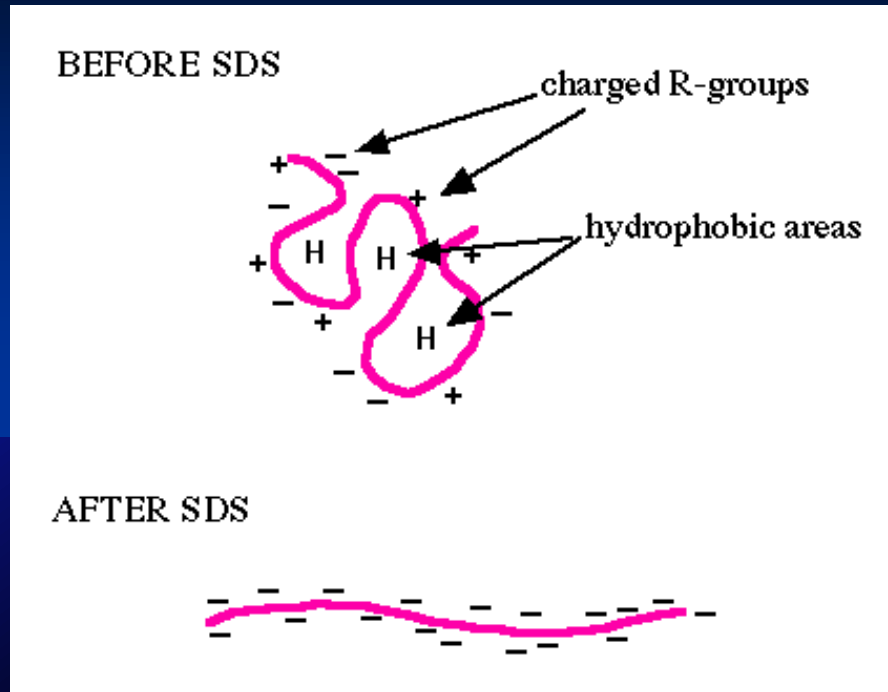


β) συσκευή



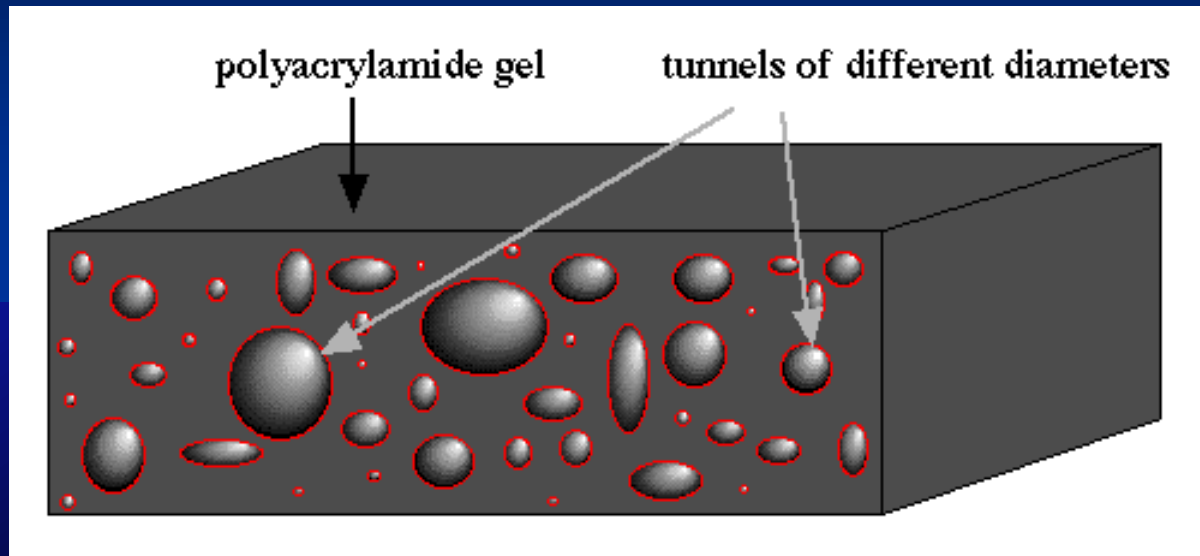
γ) χτένα

Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE



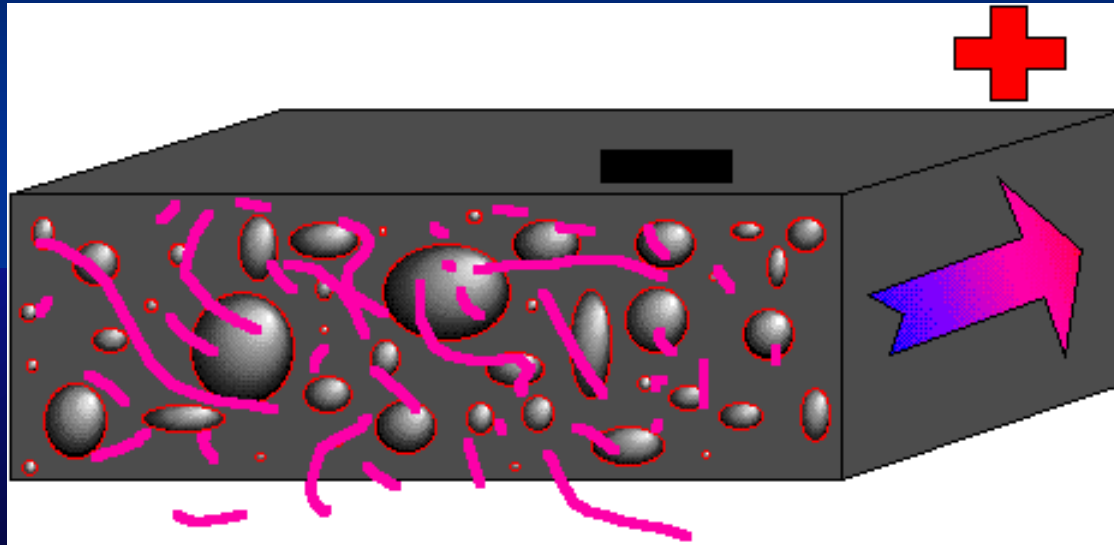
- Κάθε πρωτεΐνη φέρει θετικά και αρνητικά φορτία R λόγω των αμινοξέων της
- Οι μη πολικές υδρόφοβες περιοχές H βρίσκονται σε απόσταση από το πολικό υδατικό περιβάλλον
- Όταν μία πρωτεΐνη επωάζεται με το επιφανειοδραστικό SDS, τότε οι πρωτεΐνες περιβάλλονται από ένα αρνητικό νέφος, το οποίο καταστρέφει τις υδρόφοβες περιοχές, οι πρωτεΐνες αλλάζουν δομή.

Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE



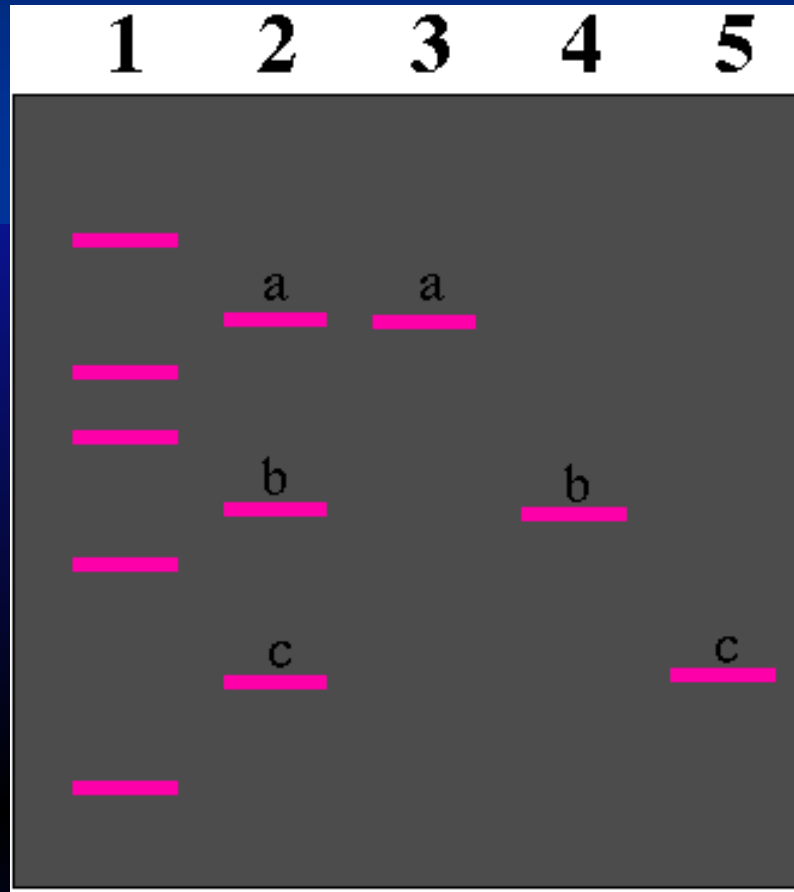
- Η πηκτή του πολυακρυλαμιδίου σχηματίζει τούνελ με διαφορετικό μήκος και μέγεθος, διασκορπισμένα σε όλες τις περιοχές της πηκτής.
- Το μέγεθος της διαμέτρου των οπών του τούνελ καθορίζεται κυρίως από τη σύσταση του πολυακρυλαμιδίου.

Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE



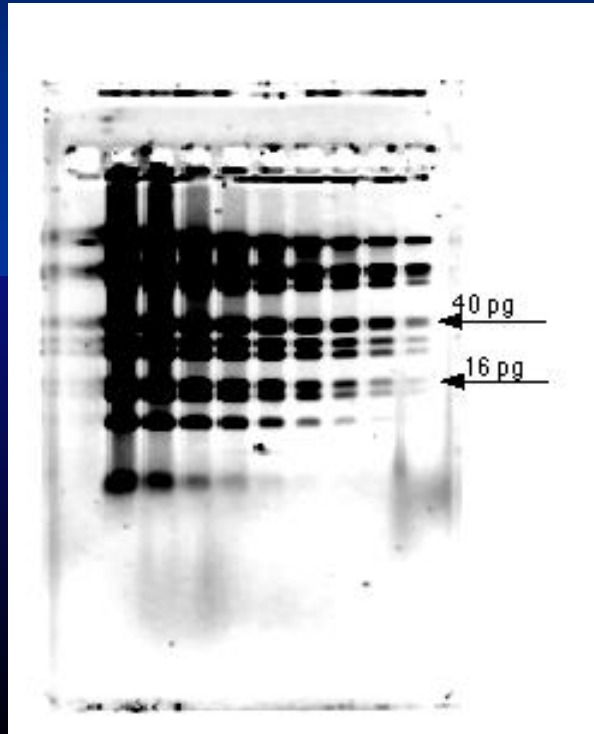
- Οι αποδιατεταγμένες με SDS πρωτεΐνες κινούνται κατά μήκος της πηκτής του πολυακρυλαμιδίου μέσω των τούνελ προς την άνοδο.
- Καθώς όλες οι πρωτεΐνες είναι ισχυρά φορτισμένες αρνητικά κατευθύνονται με βάση το μοριακό τους βάρος.

Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE



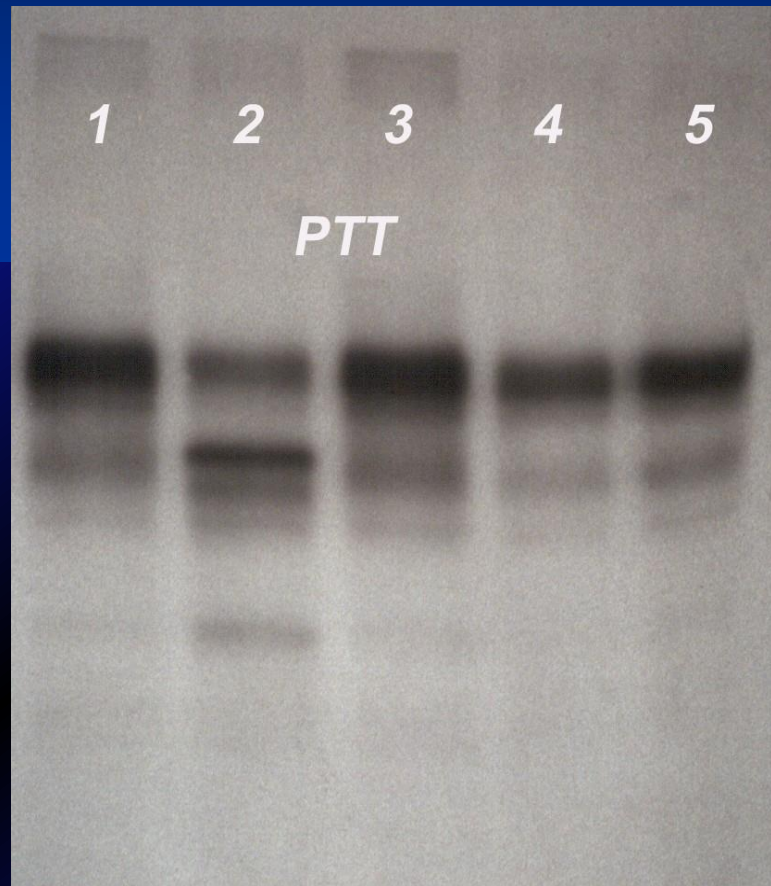
- 1. Δείκτης μοριακών βαρών
- 2. Μίγμα τριών πρωτεϊνών, α η μεγαλύτερη και c η μικρότερη
- 3. Πρωτεΐνη α
- 4. Πρωτεΐνη β
- 5. Πρωτεΐνη c

Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

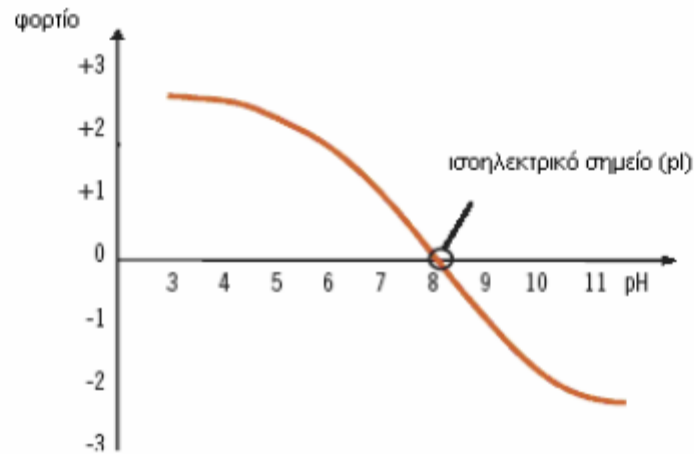
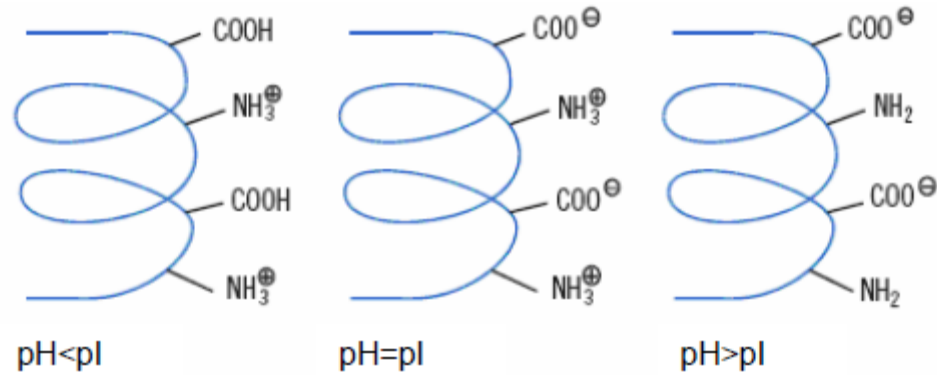


- Διαδοχικές αραιώσεις του ίδιου δείγματος.
- Όριο ανίχνευσης: 16 picograms
 $= 16 \cdot 10^{-12}$ grams

Παράδειγμα ανίχνευσης πρωτεϊνών με αυτοραδιογραφία
έπειτα από ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE



Πρωτεΐνες: ισοηλεκτρικό σημείο



Ισοηλεκτρική εστίαση (isoelectric focusing)

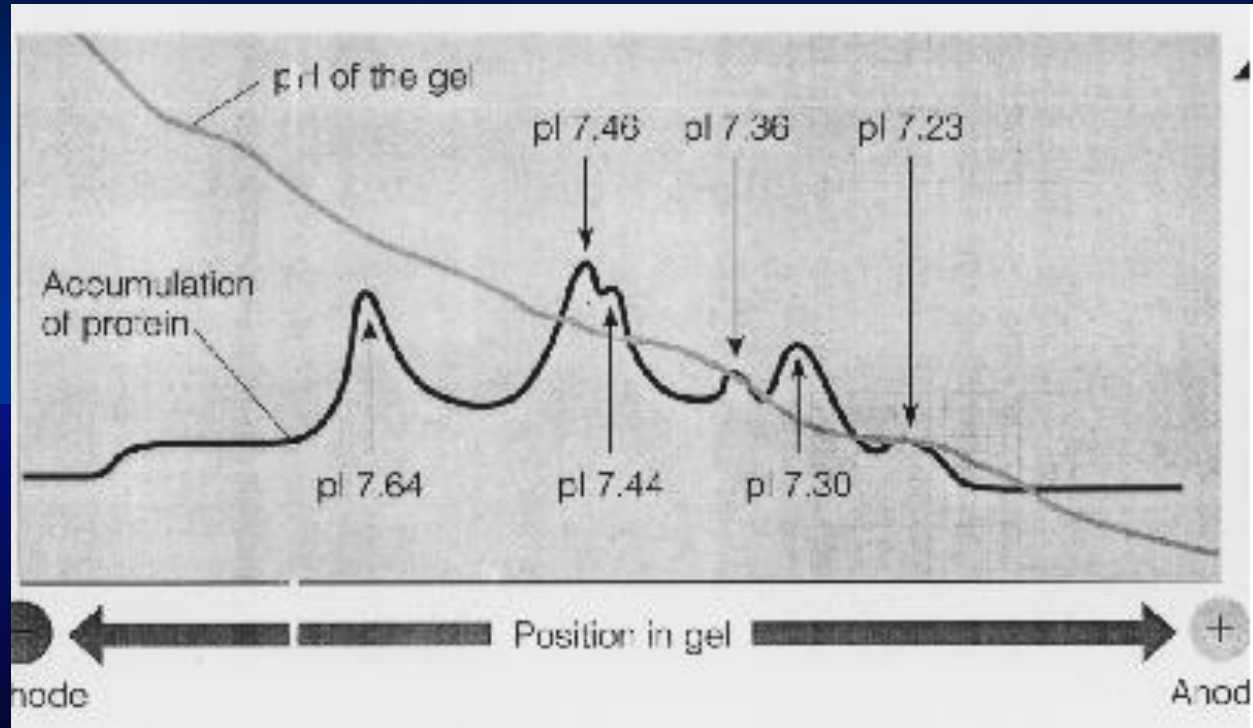
οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σ' ένα μέσον με μεταβλητή σύσταση pH, διαβαθμιζόμενη ως προς την κατεύθυνση μετακίνησης.

Η πρωτεΐνη μετακινείται προς τη ζώνη εκείνη, όπου το pH είναι ίσο με το ισοηλεκτρικό της σημείο (pI). Σ αυτό το pH το συνολικό φορτίο των πρωτεΐνης εξουδετερώνεται και η μετακίνηση σταματά.

Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιείται πολύ υψηλή τάση, περίπου 2000 V και απαιτείται σύστημα ψύξης για αποφυγή υπερθέρμανσης.

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κυρίως σε ερευνητικό επίπεδο, αλλά έχει και πολλές πρακτικές διαγνωστικές εφαρμογές.

Ισοηλεκτρική εστίαση (isoelectric focusing)

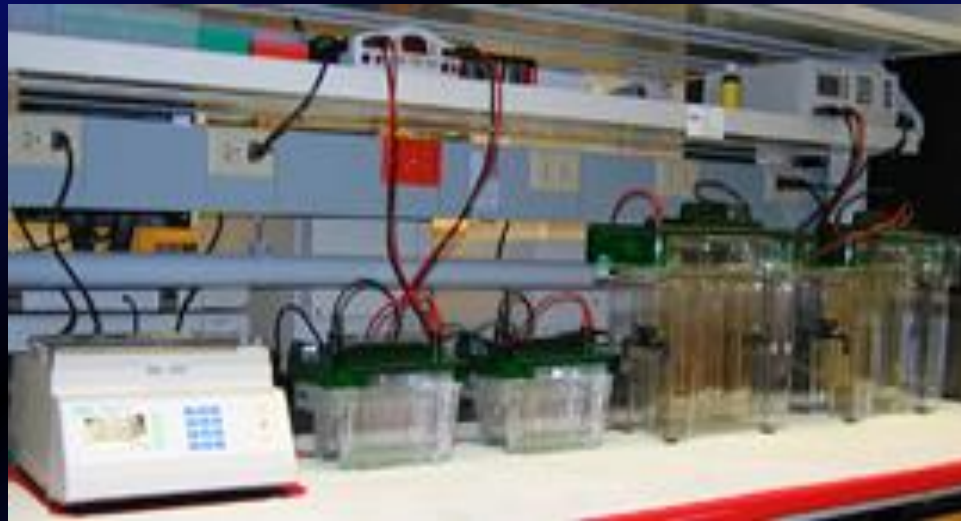


Επειδή το ισοηλεκτρικό σημείο κάθε πρωτεΐνης περιορίζεται σε πολύ στενή και συγκεκριμένη περιοχή pH οι ζώνες διαχωρισμού στην ισοηλεκτρική εστίαση είναι πολύ οξείες.

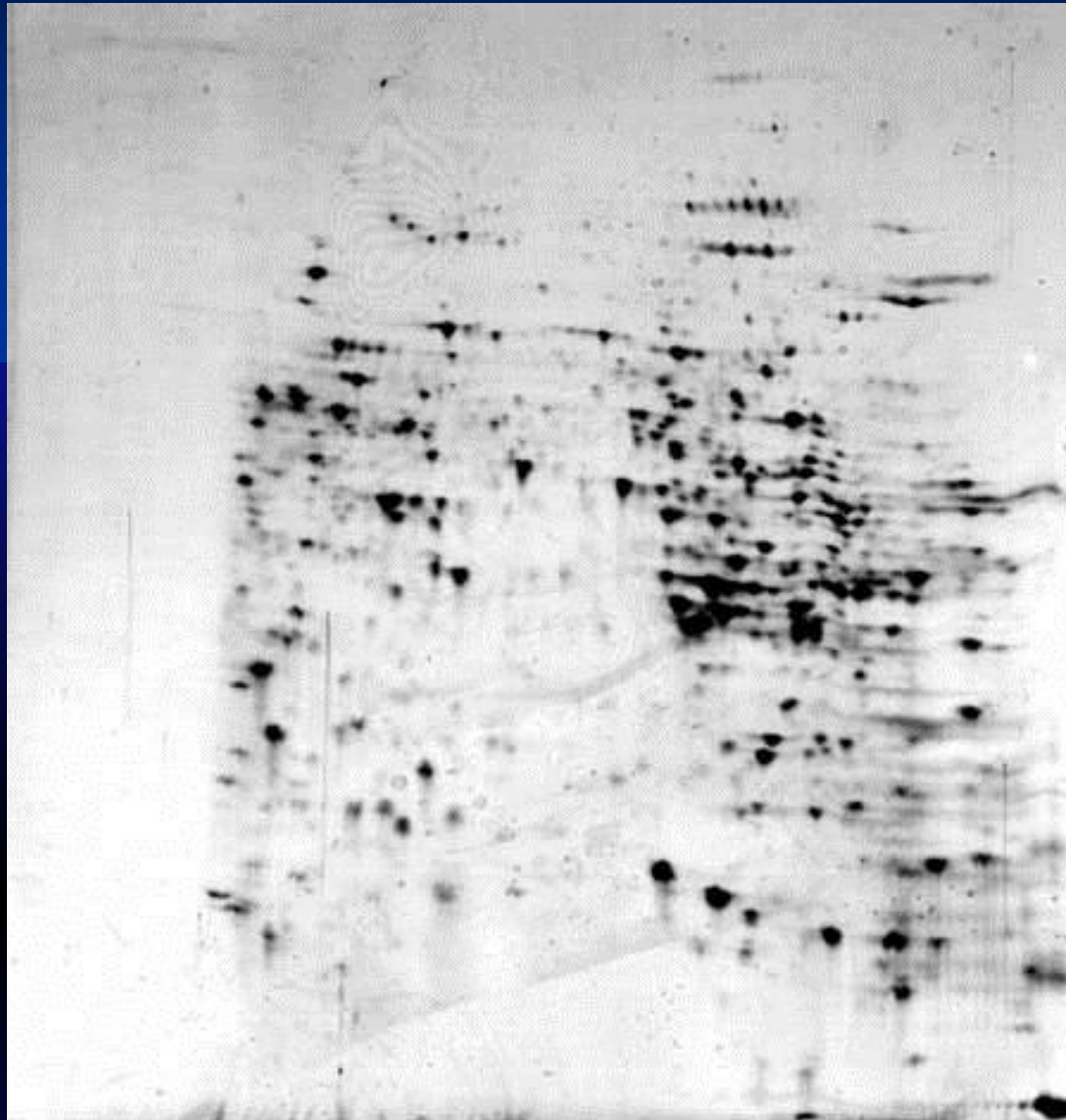
Με την τεχνική αυτή έχουν διαχωρισθεί πρωτεΐνες, των οποίων τα ισοηλεκτρικά σημεία διαφέρουν μόλις κατά 0.02 μονάδες pH.

δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (Two Dimensional Electrophoresis, 2DE).

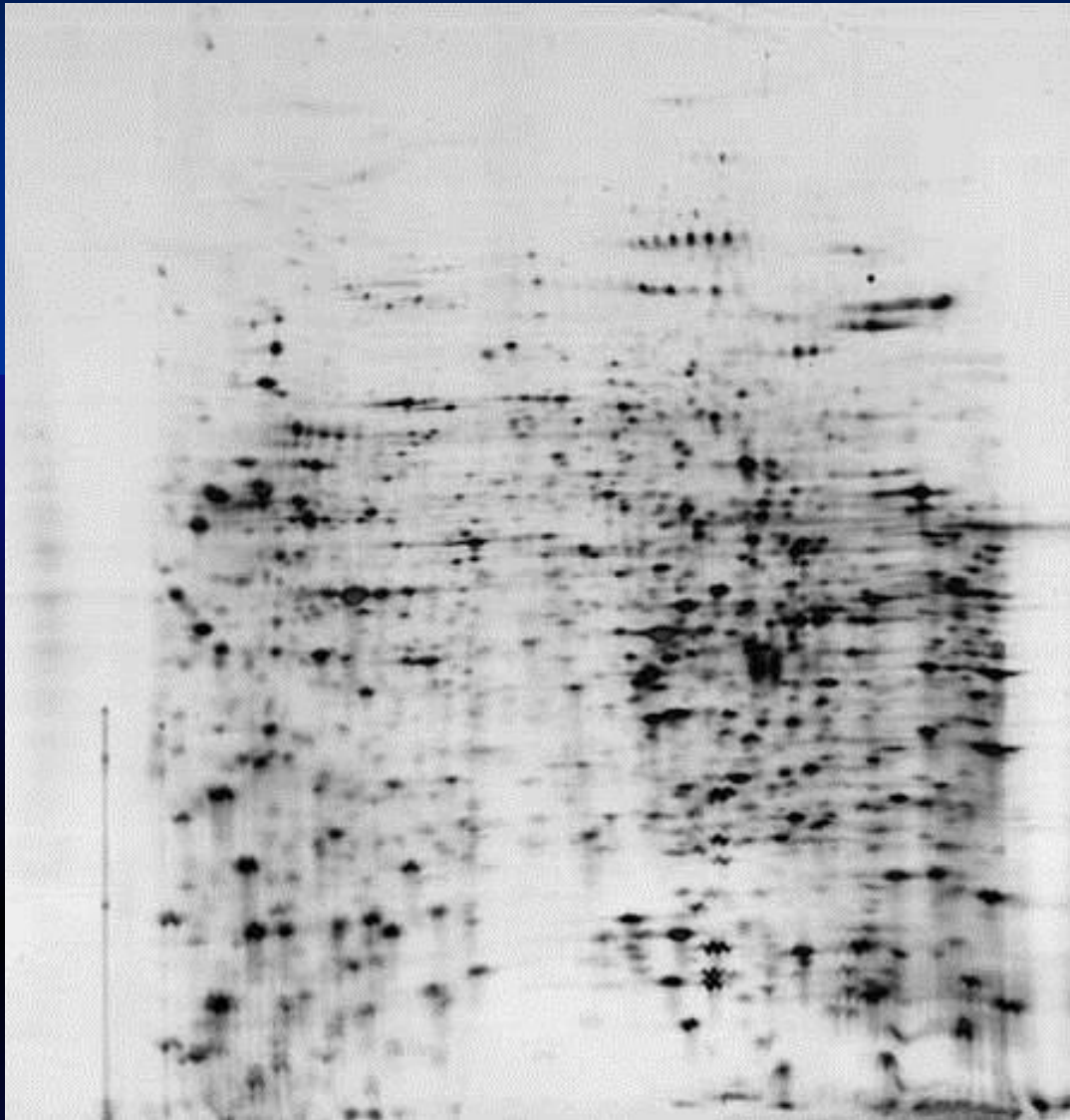
- Συνδυασμός των τεχνικών SDS-PAGE και IEF επιτρέπει τον καλύτερο διαχωρισμό ενός μίγματος πρωτεϊνών με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο pI (ως προς μια κατεύθυνση) και το MW (ως προς άλλη κατεύθυνση).



δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (Two Dimensional Electrophoresis, 2DE).



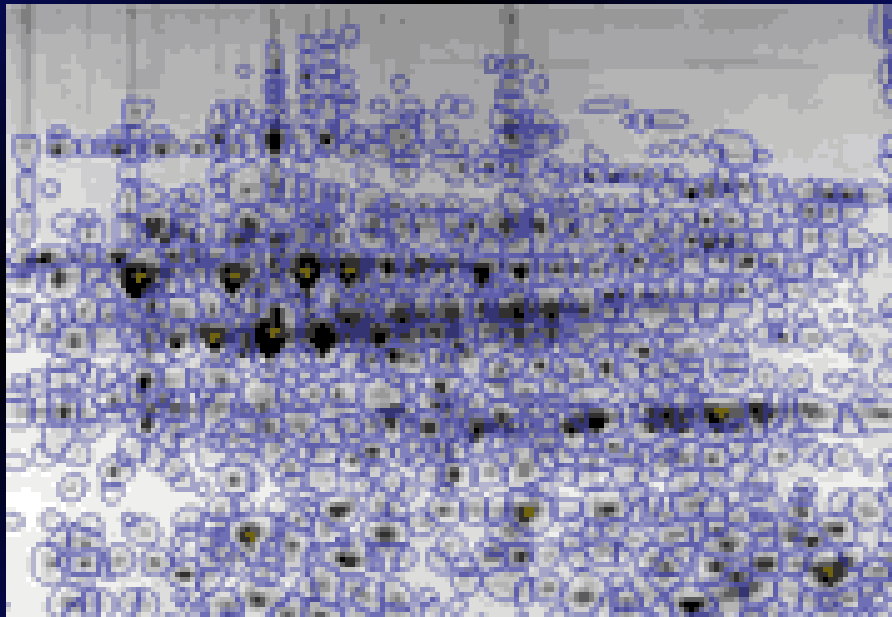
δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (Two Dimensional Electrophoresis, 2DE).



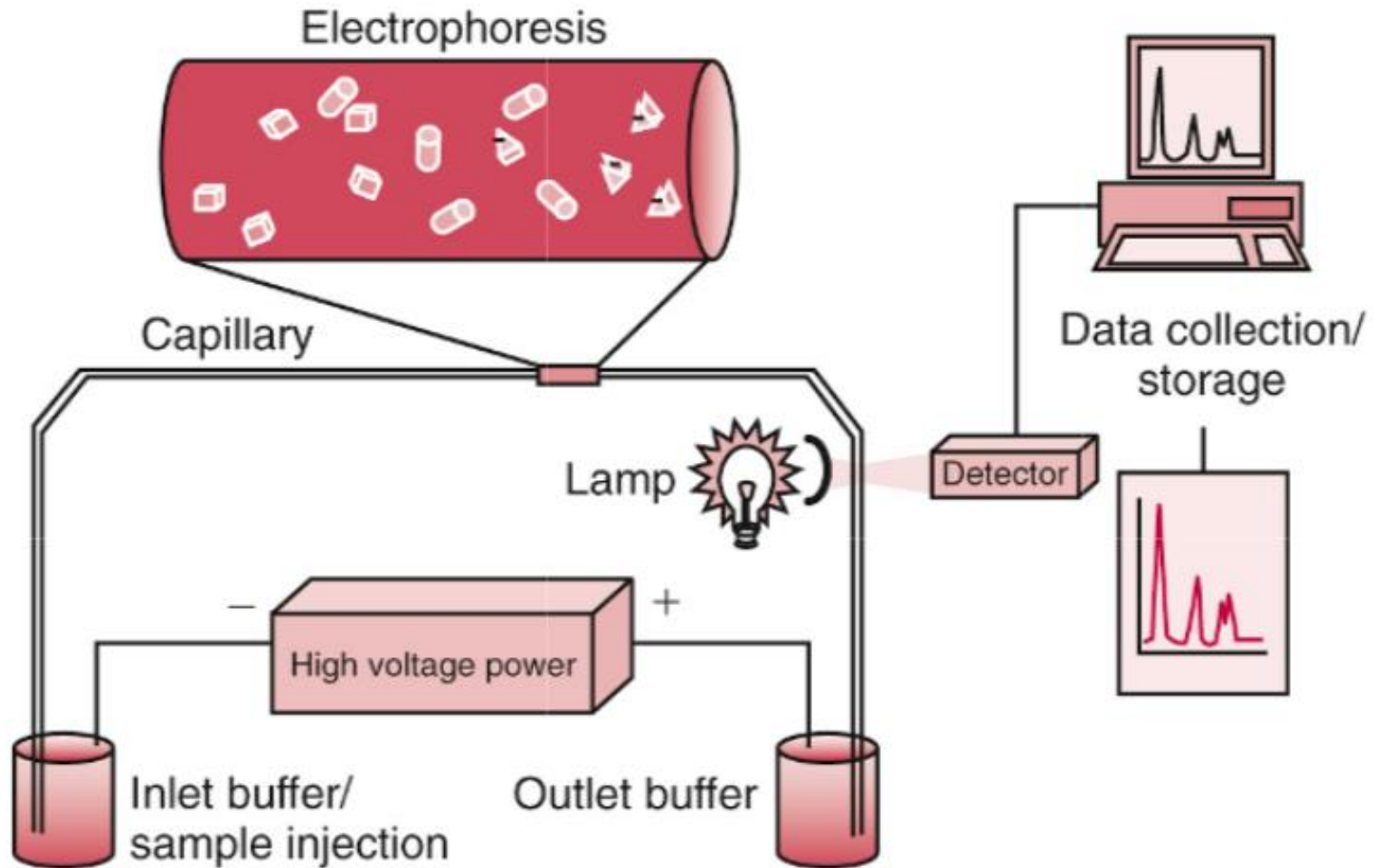
buffer: 7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 66mM DTT and 0.5% ampholytes

δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση 2DE σε συνδυασμό με Mass spectrometry

- Ο συνδυασμός 2DE MS αποτελεί τον βασικό πυρήνα της μεθοδολογίας ανάλυσης πρωτεϊνών στην πρωτεομική.
- Η μεγάλη διαχωριστική ικανότητα των 2D-PAGE gels σε συνδυασμό με την φασματομετρία μάζας οδηγεί στην ταυτοποίηση πρωτεϊνικών συστατικών σε πολύπλοκα δείγματα.



Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis)



Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis)

- Η Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση αποτελεί την πλέον αυτοματοποιημένη και εξελιγμένη ηλεκτροφορητική τεχνική για διαχωρισμό σακχάρων, πεπτιδίων, φαρμακευτικών ουσιών, ανόργανων ιόντων, πρωτεϊνών και νουκλειικών οξέων.
- χαρακτηρίζεται από πολύ μεγάλες δυνατότητες αναλυτικών διαχωρισμών, οι οποίες υπερτερούν ακόμη και έναντι καθιερωμένων χρωματογραφικών μεθόδων, όπως η HPLC.
- Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κυρίως σε ερευνητικό επίπεδο αλλά πρόσφατα άρχισε να χρησιμοποιείται και στην κλινική διάγνωση, ακόμη και για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA (DNA Sequencing).
- Κύρια πλεονεκτήματα της είναι: α) γρήγοροι, ποσοτικοί και επαναλήψιμοι διαχωρισμοί, β) πολλές δυνατότητες αναλυτικών εφαρμογών με ασυναγώνιστη ποικιλία και γ) καταλληλότητα για αυτοματοποιημένη χρήση για πολλαπλά δείγματα, δ) μεγάλη ευαισθησία.

βασική αρχή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης

- Η βασική αρχή της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης είναι η χρησιμοποίηση ενός τριχοειδούς σωλήνα από τηγμένο οξειδιο του πυριτίου (fused silica capillary tube) ως μέσο μεταφοράς.
- Ο σωλήνας έχει συνήθως μήκος μικρότερο των 100 cm και εσωτερική διάμετρο περίπου 50 μm. Ο σωλήνας αυτός μπορεί να είναι κενός ή να περιέχει κατάλληλο ηλεκτροφορητικό υλικό, πχ πολυακρυλαμίδιο.
- Τα άκρα του τοποθετούνται σε δοχεία ηλεκτρολυτών που περιέχουν ηλεκτρόδια.
- Ένα τροφοδοτικό μηχάνημα παρέχει διαφορά δυναμικού στην περιοχή 20.000 - 30.000 Volts για να προκαλέσει μετακίνηση των μορίων.
- Μετά το διαχωρισμό, ο οποίος λαμβάνει χώρα μέσα στον τριχοειδή σωλήνα, τα κλάσματα ανιχνεύονται με οπτικό ανιχνευτή και οι πληροφορίες συλλέγονται από ηλεκτρονικό υπολογιστή υπό μορφή κορυφών σε ηλεκτροφόρημα.

Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση οργανολογία



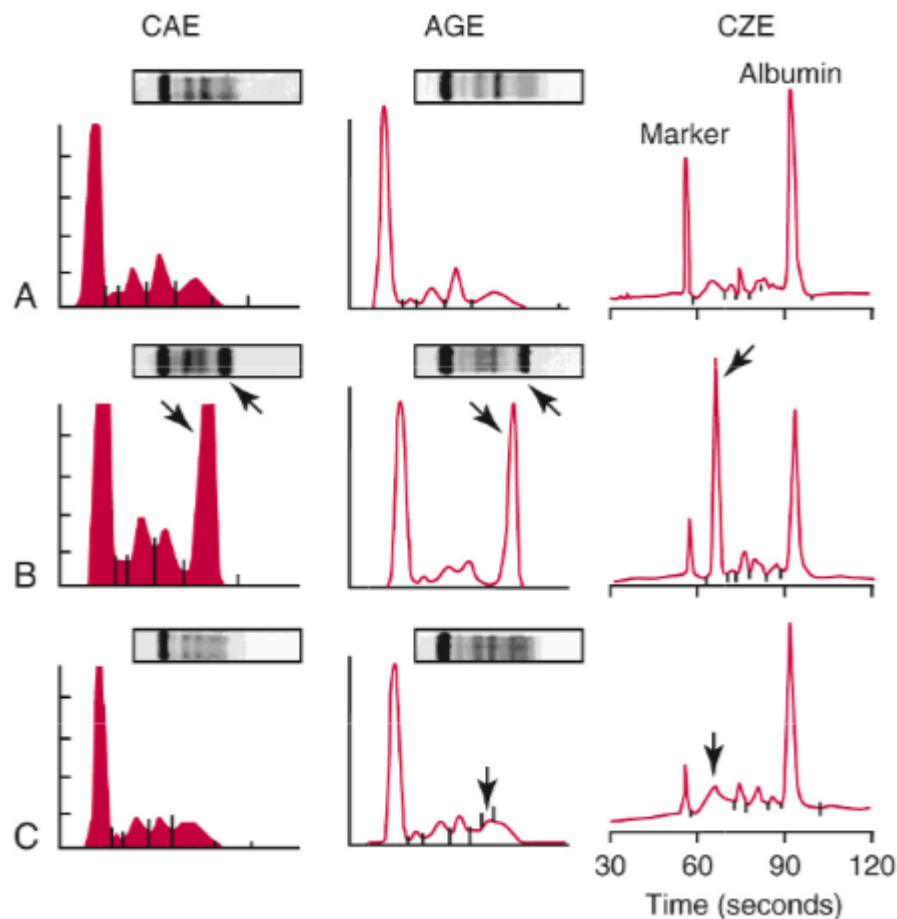


Figure 15.5

Rapid protein electrophoresis of serum protein; comparison with scanning densitometry profiles obtained from cellulose acetate (CAE) and agarose (AGE) electrophoresis. A, Normal serum. B, Patient serum containing a large M-protein. C, Patient serum containing a small monoclonal protein. Arrows indicate the position of the monoclonal proteins. CZE, Capillary zone electrophoresis.

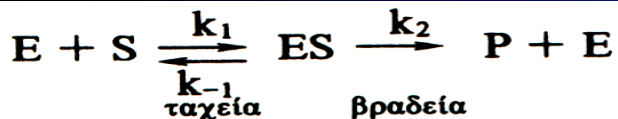
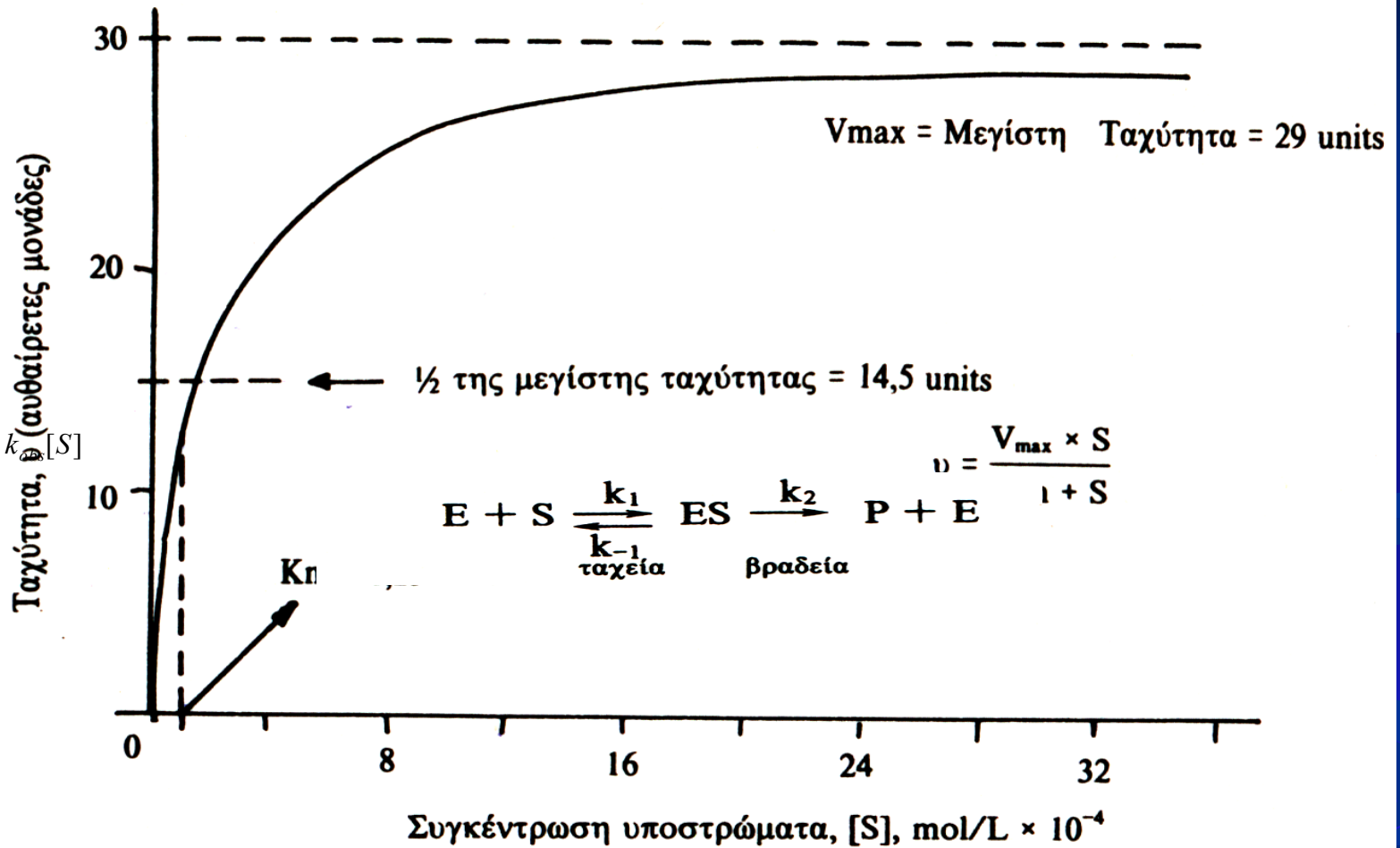
Ενζυμική ανάλυση Διαγνωστική ενζυμολογία



ένζυμα

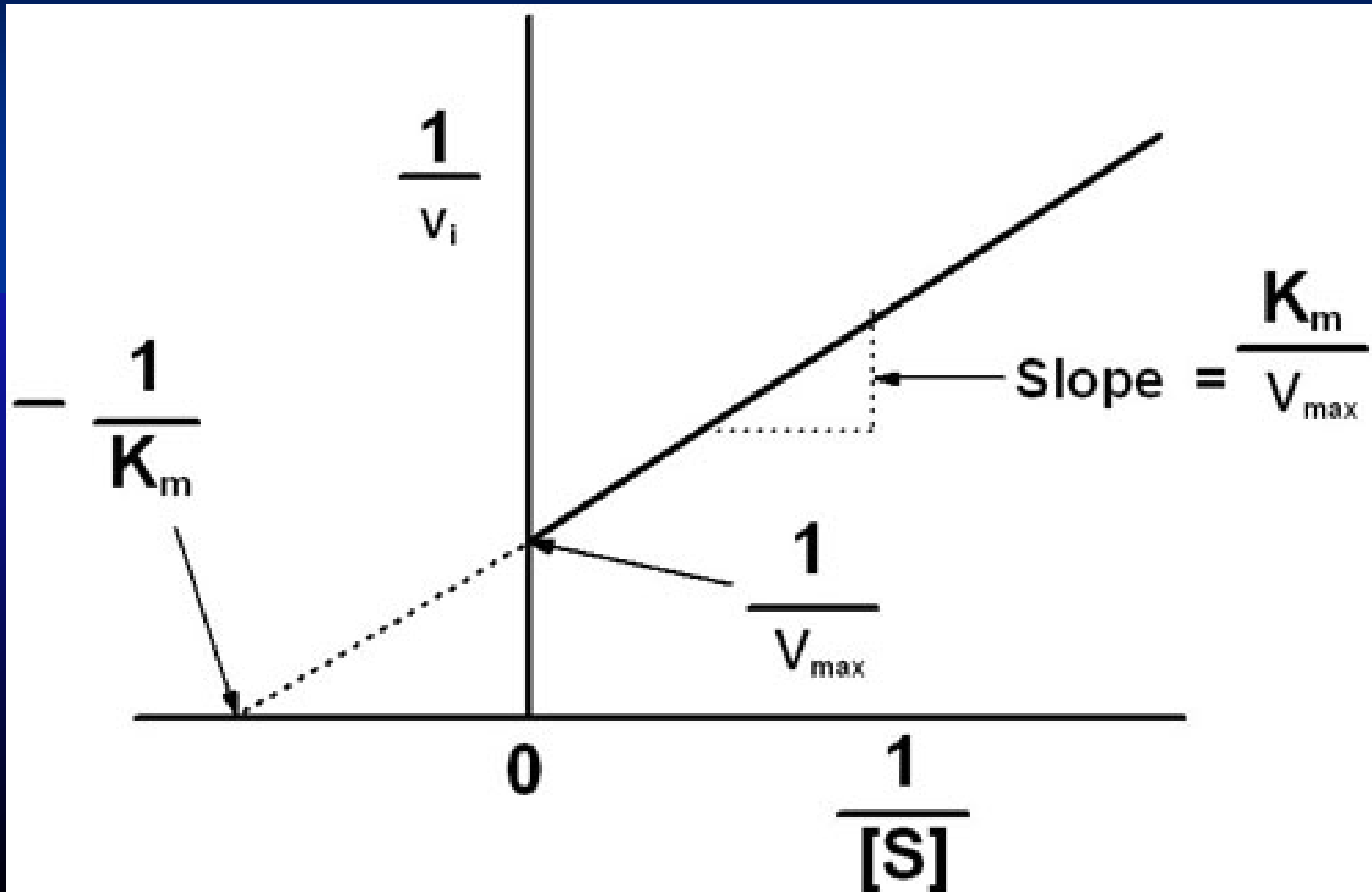
- Η *κλινική ή διαγνωστική ενζυμολογία* είναι η εφαρμογή της επιστήμης των ενζύμων στη διάγνωση και τη θεραπεία των ασθενειών, προσδιορίζοντας τις συγκεντρώσεις ή τις ενεργότητες των ενζύμων στα βιολογικά υγρά των ασθενών.
- Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες με καταλυτικές ιδιότητες, οι οποίες εκδηλώνονται με ειδική ενεργοποίηση των αντιστοίχων υποστρωμάτων τους.
- Βάση για την ανάπτυξη των μεθόδων ενζυμικής ανάλυσης αποτελούν οι χαρακτηριστικές αυτές καταλυτικές ιδιότητες των ενζύμων.

ένζυμα

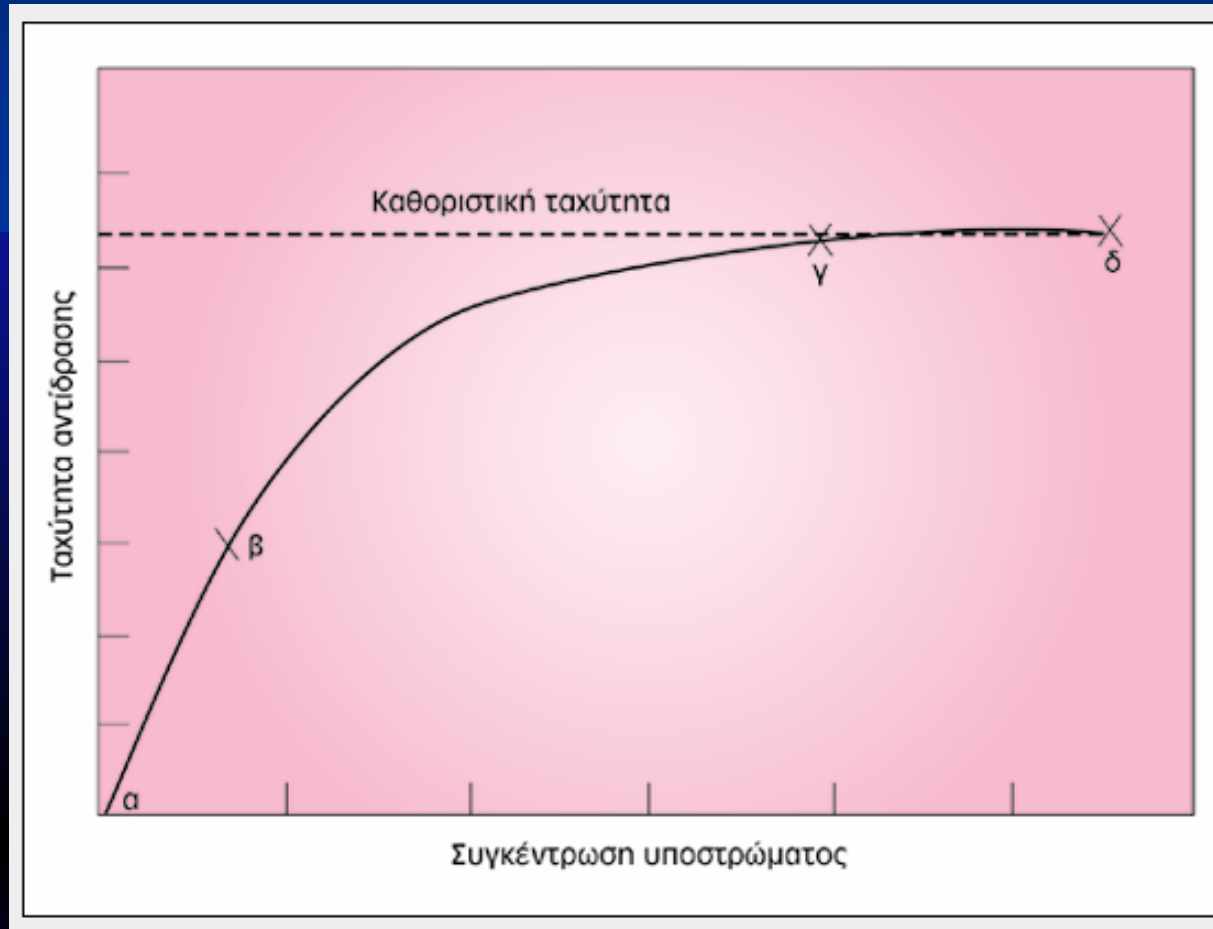


$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + K_m} = V_{max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

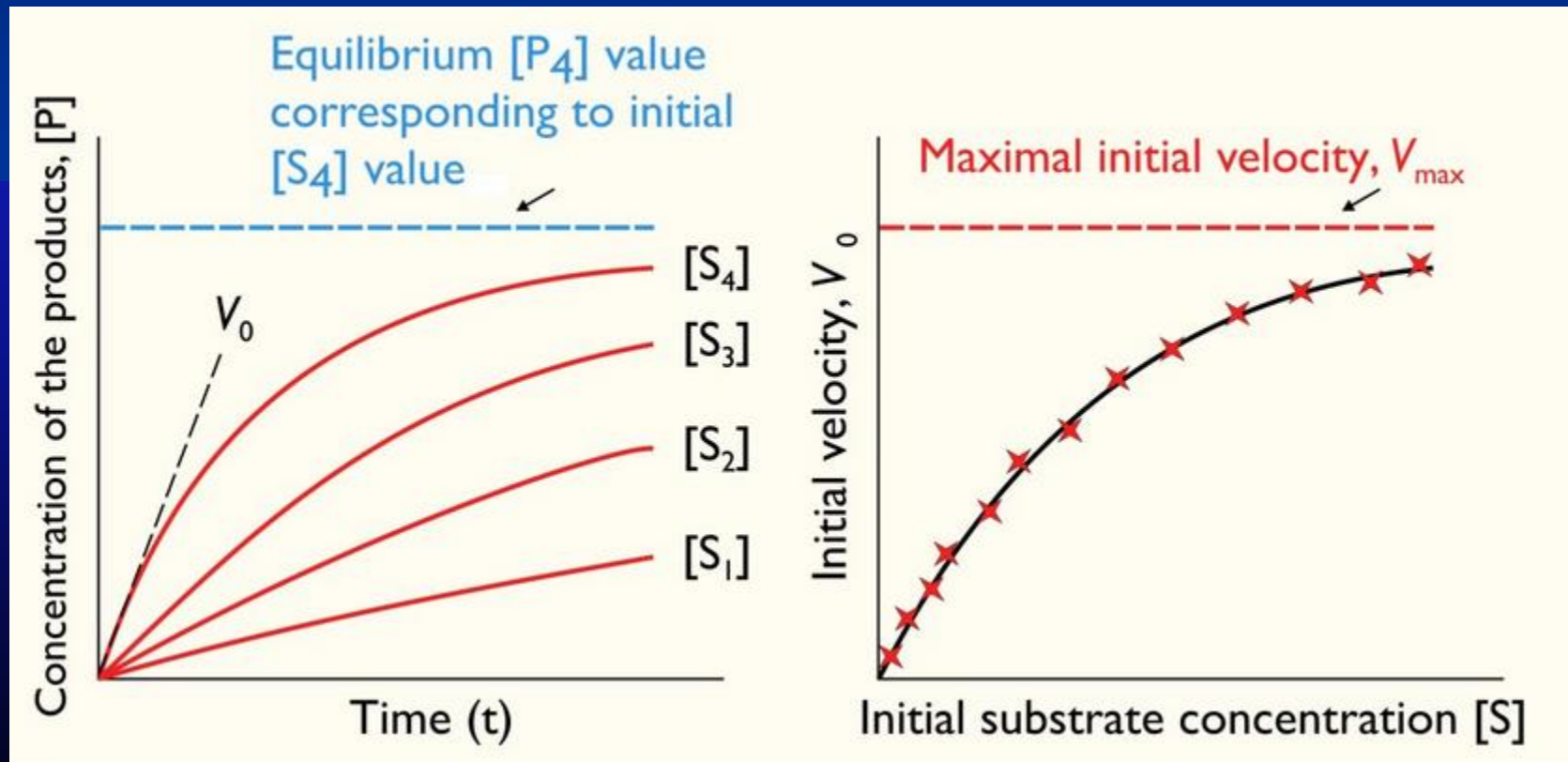
ένζυμα



Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης



Ένζυμα: επίδραση συγκέντρωσης υποστρώματος στην αρχική ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

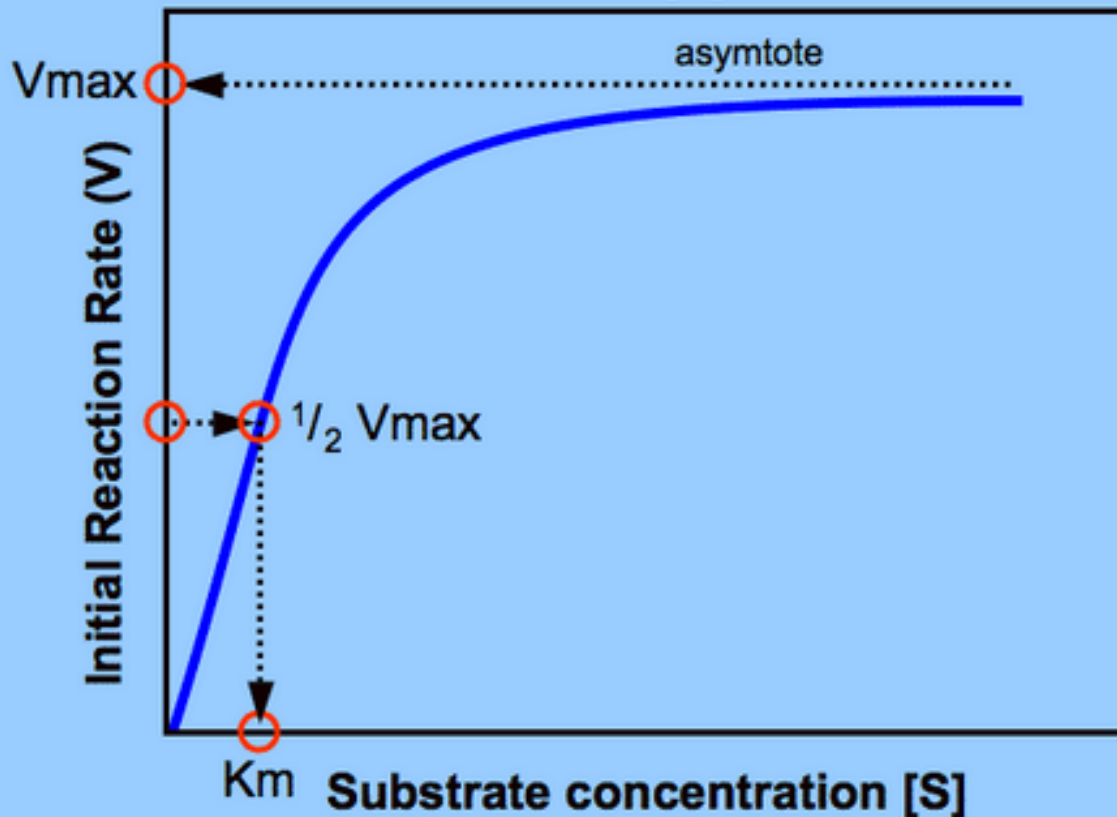


Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

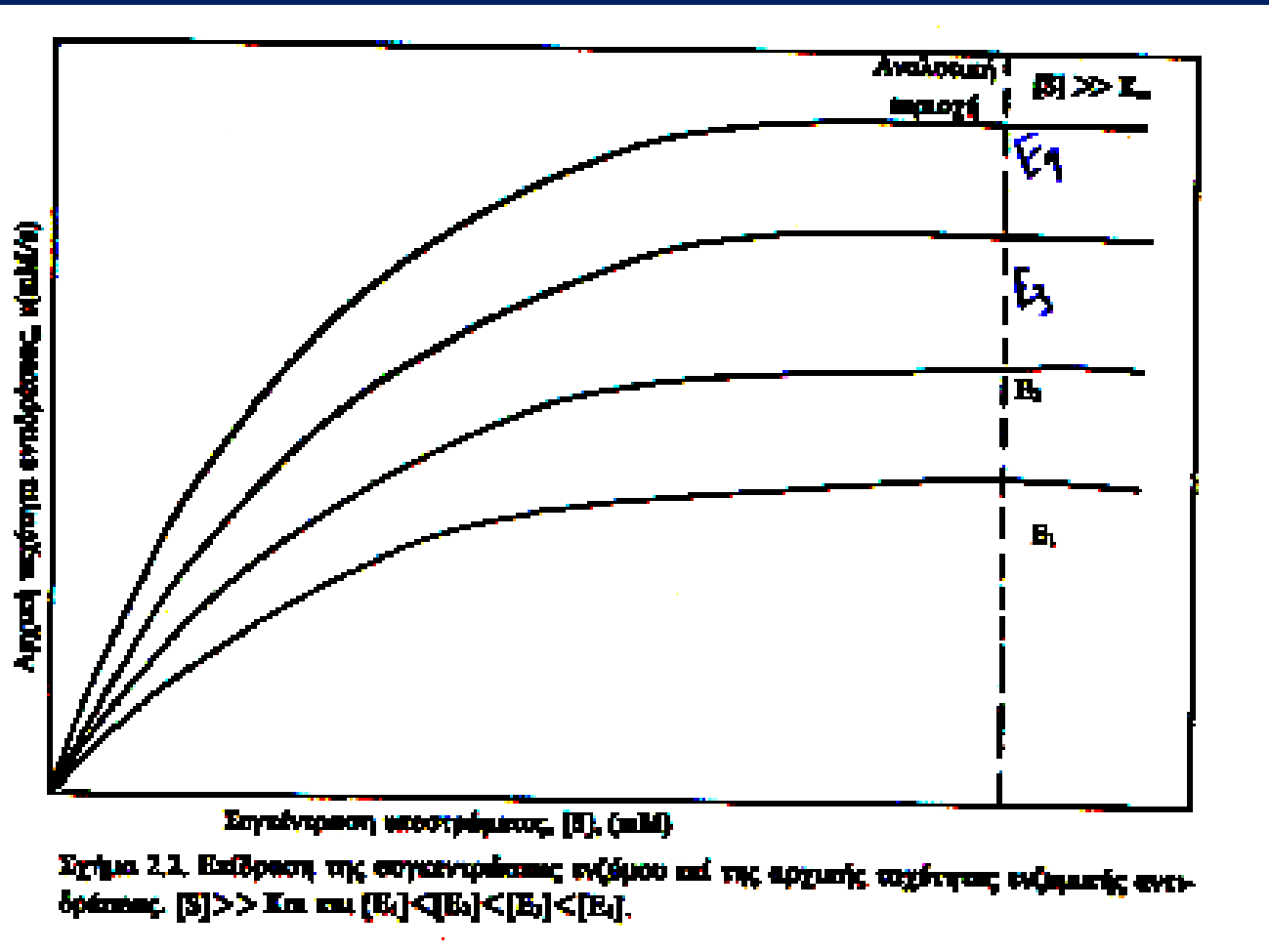
K_m = Σταθερά Michaelis – Menten

Michaelis Menten Plot

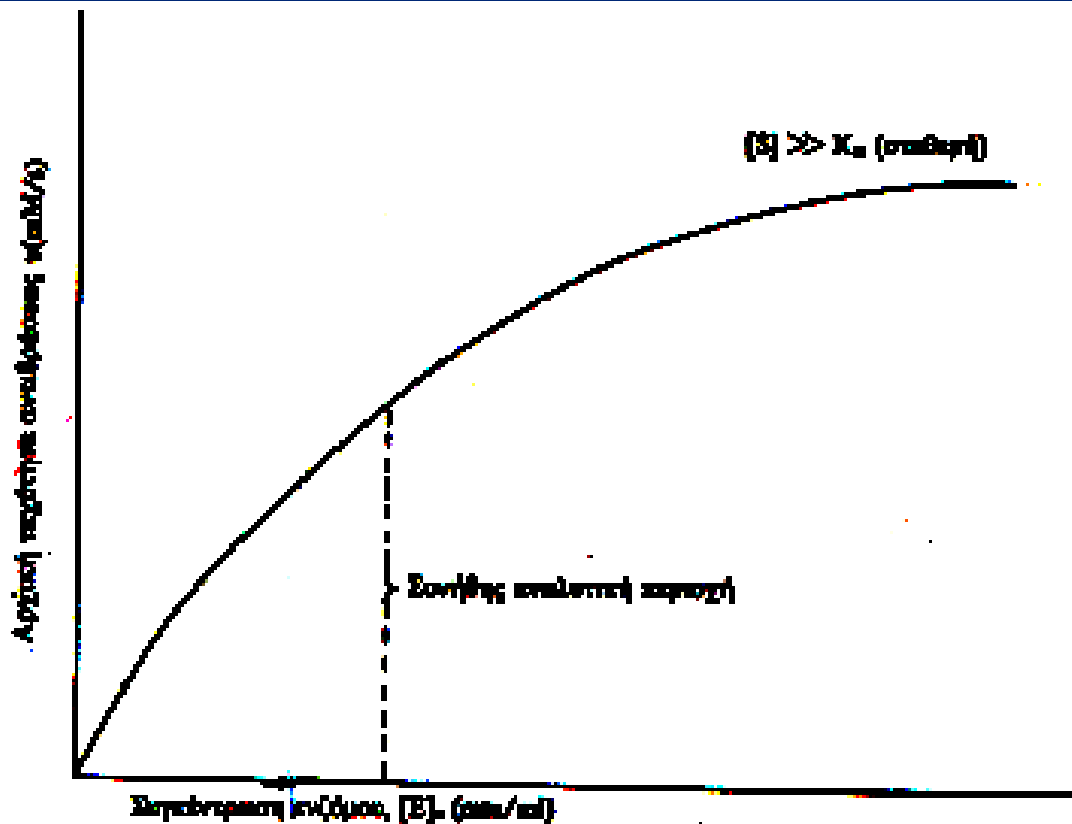
$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$



ένζυμα



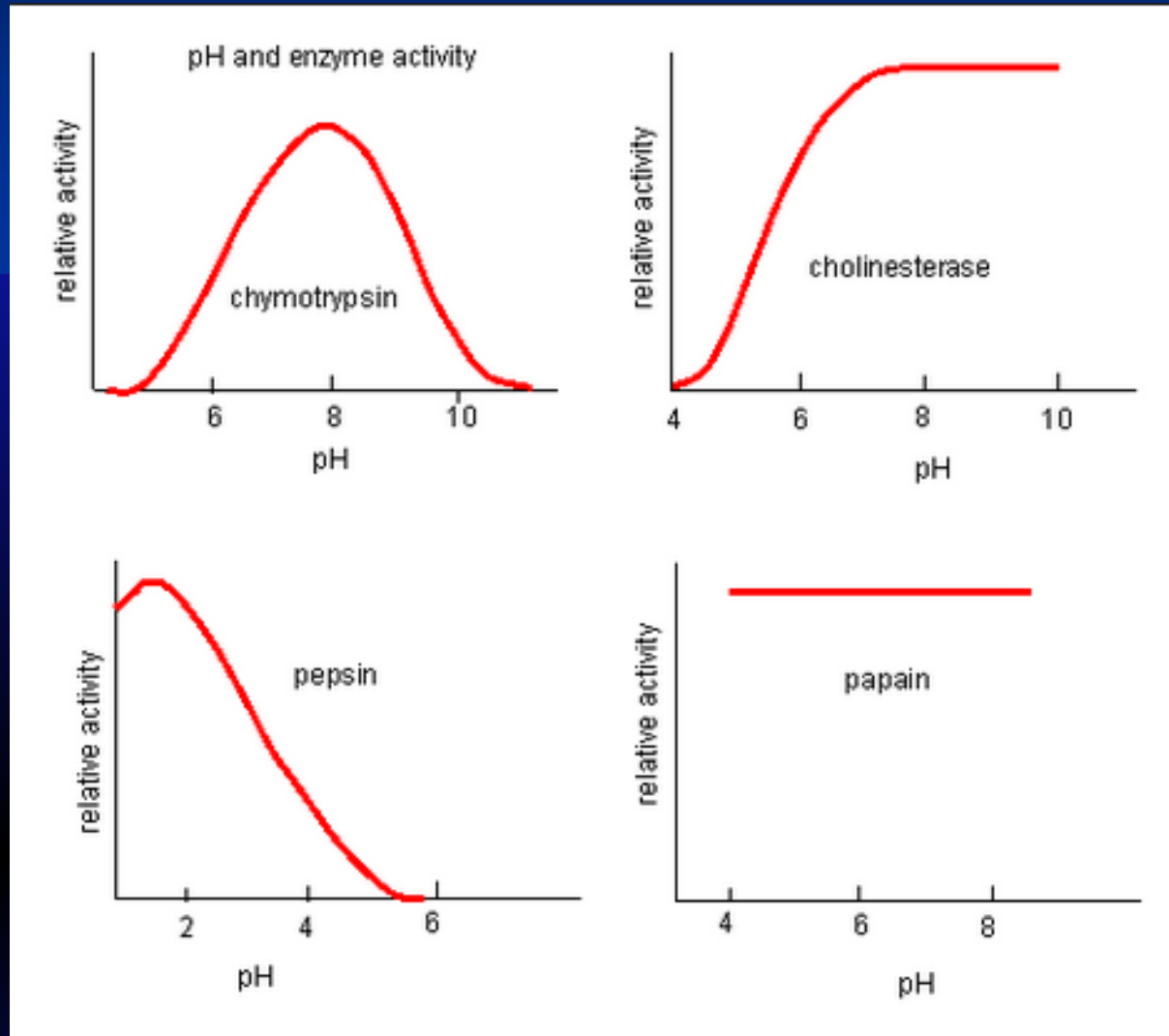
ένζυμα



Έγγραφο 2.3. Μεταβολή της αρχικής ταχύτητας αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του ενζύμου, $[S] \gg K_m$ (σταθερό).

Επίδραση του pH στην ταχύτητα μιας ενζυμικής αντιδράσεως

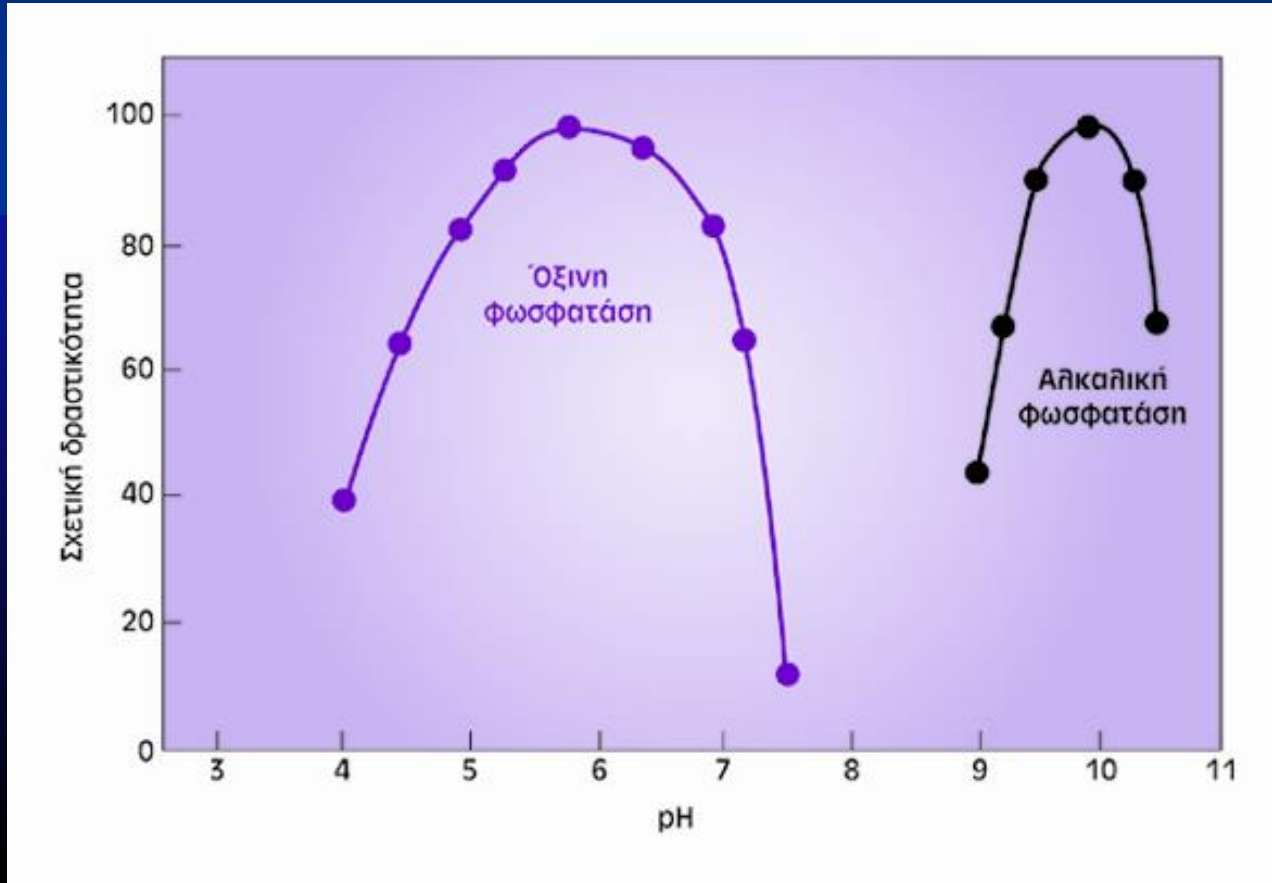
Τεταγμένη: ταχύτητα εμφάνισης των προϊόντων
Τετμημένη: pH



Επίδραση του pH στην ταχύτητα μιας ενζυμικής αντιδράσεως

Τεταγμένη: ταχύτητα εμφάνισης των προϊόντων

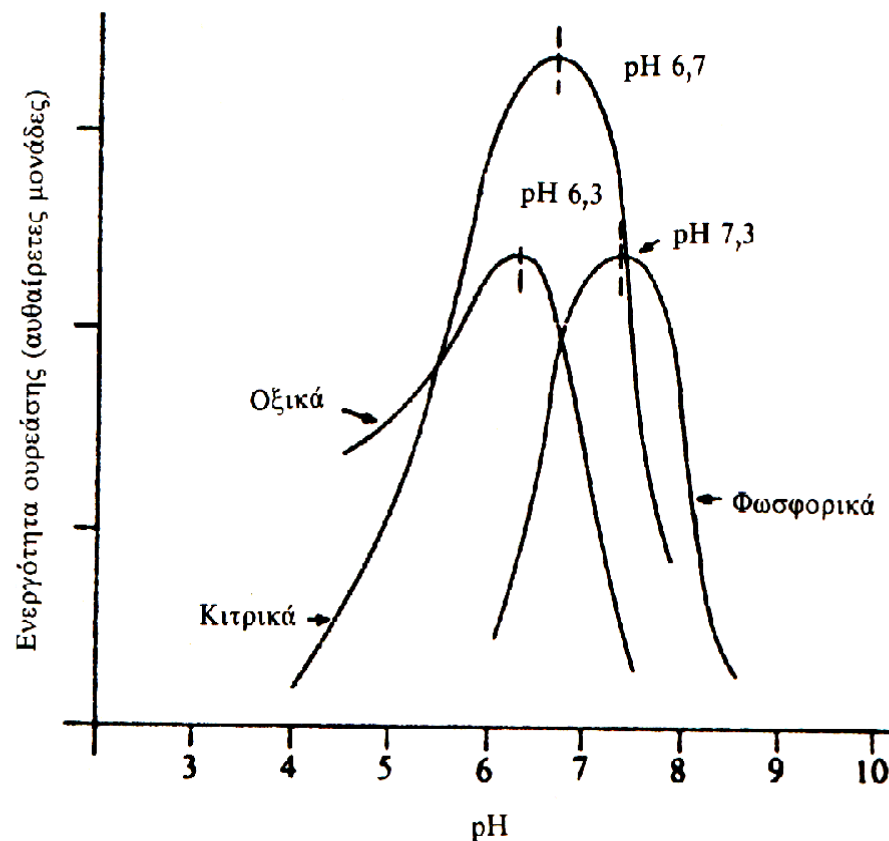
Τετμημένη: pH



Επίδραση του ρυθμιστικού διαλύματος στην ταχύτητα μιας ενζυμικής αντιδράσεως

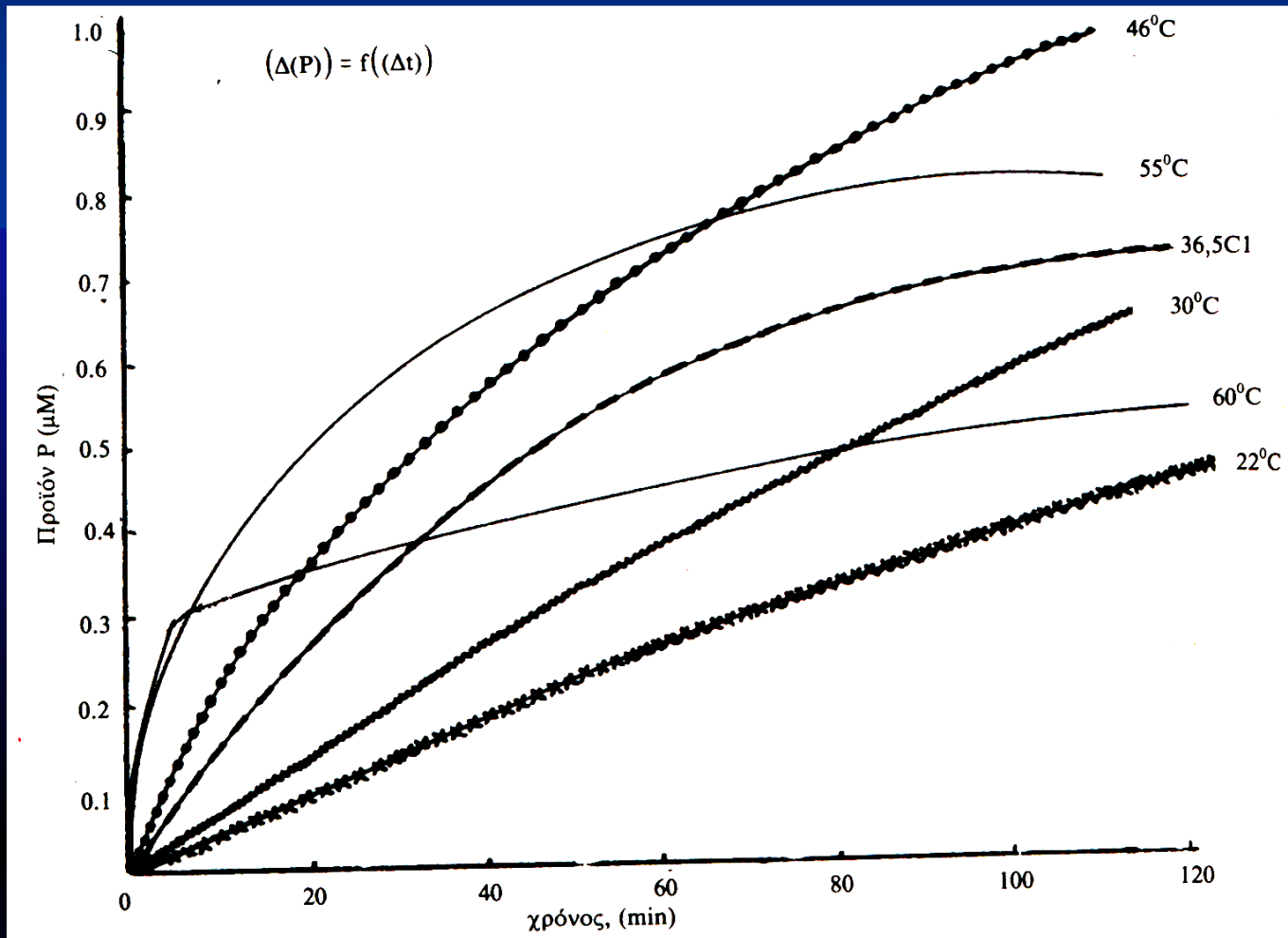
Τεταγμένη: ταχύτητα εμφάνισης των προϊόντων

Τετμημένη: pH

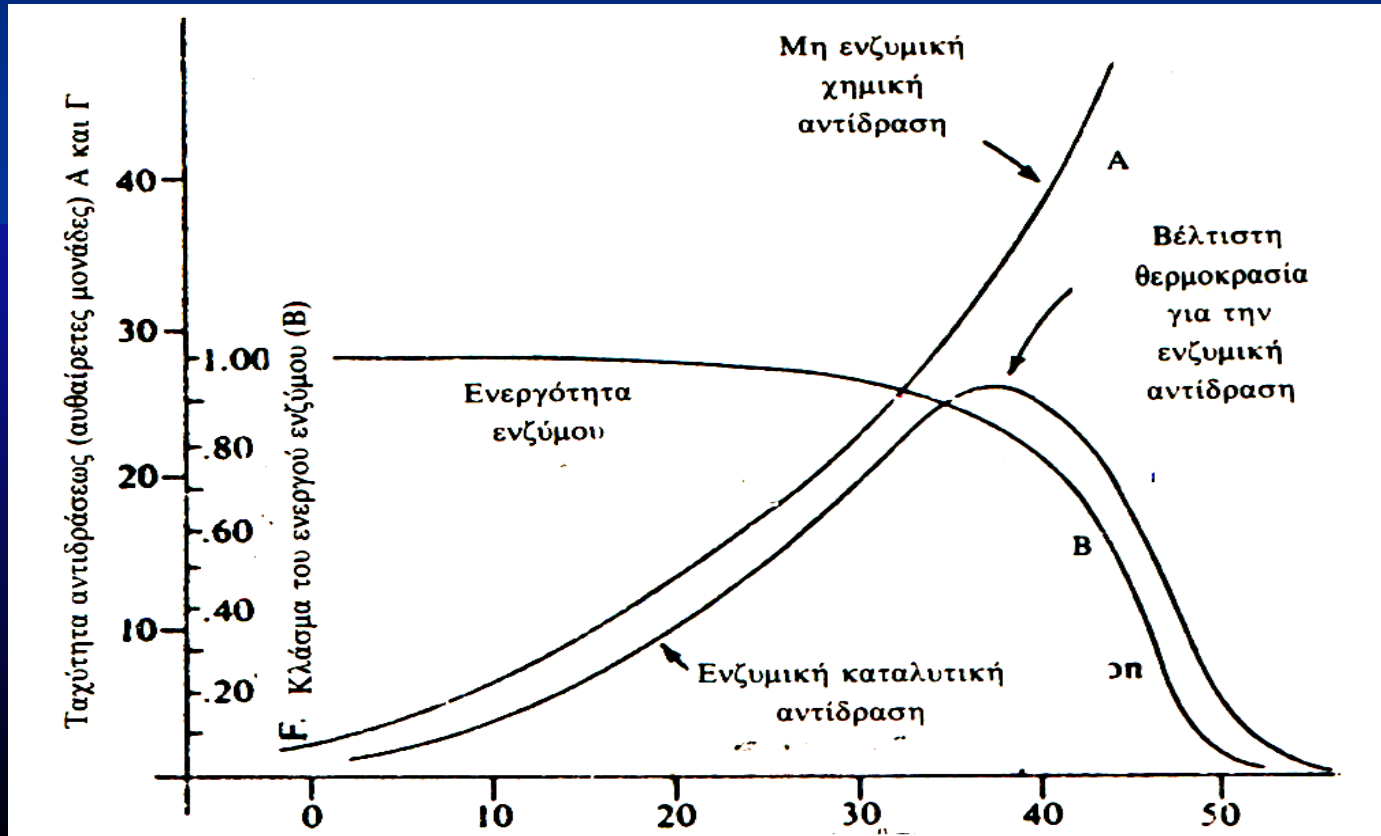


Σχήμα 2.6. Καμπύλες ενεργότητας της ουρεάσης σε συνάρτηση του pH για διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα.

Επίδραση της θερμοκρασίας επί των καμπυλών ταχύτητας ενζυμικής αντιδράσεως



επίδραση της θερμοκρασίας επί της ταχύτητας της μη ενζυμικής και της ενζυμικής - καταλυτικής αντίδρασης.



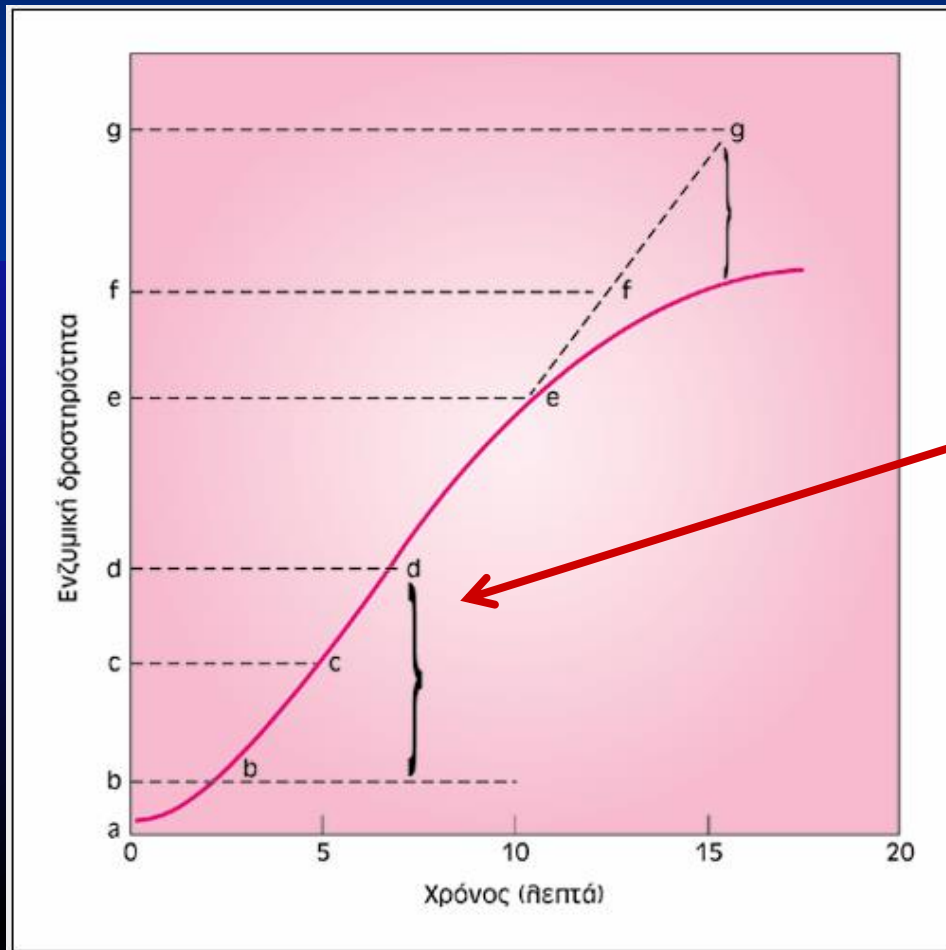
Ενζυμική ενεργότητα και μονάδες εκφράσεως της

- Η ποσότητα ενός ενζύμου που υπάρχει σ' ένα βιολογικό δείγμα ορισμένου όγκου (π.χ. ορού) μπορεί να υπολογιστεί κυρίως μετά τη μέτρηση της ενεργότητάς του, δηλ. την επίδραση του πάνω στην ταχύτητα της συγκεκριμένης αντιδράσεως που καταλύει.
- Η ενζυμική ενεργότητα εξαρτάται σημαντικά από παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH, η φύση και η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος, η συγκέντρωση του υποστρώματος (καθώς και η φύση του, όπου η εξειδίκευση του ενζύμου επιτρέπει ποικιλία υποστρωμάτων) και η παρουσία ενεργοποιητών ή αναστολέων.
- Έτσι η σημασία των μονάδων εκφράσεως της ενζυμικής ενεργότητας και ο αριθμός των μονάδων που καταγράφονται για ορισμένο δείγμα μπορούν να ερμηνευθούν μόνο αν είναι γνωστή η μέθοδος προσδιορισμού που χρησιμοποιείται.

Ενζυμική ενεργότητα και μονάδες εκφράσεως της

- Η συνηθέστερη ενζυμική μονάδα είναι η Διεθνής Μονάδα (IU) που δείχνει τον «αριθμό των (μmol) του υποστρώματος, που μετατρέπονται ανά λεπτό (min), κάτω από καθορισμένες συνθήκες της αντιδράσεως».
- Ο ανωτέρω ορισμός της IU δεν αναφέρεται σε συγκεκριμένο όγκο βιολογικού δείγματος, γιαυτό όταν είναι αναγκαίο να εκφραστεί η συγκέντρωση της ενζυμικής ενεργότητας (όπως συνήθως γίνεται στην κλινική χημεία) πρέπει να προστεθεί ο όρος του όγκου, π.χ. IU/L ή mIU/mL.
- η διεθνής μονάδα δεν υπονοεί καμία συγκεκριμένη θερμοκρασία για τον προσδιορισμό, που πρέπει να αναφέρεται ούτε ακόμα υπάρχει συμφωνημένη πρότυπη θερμοκρασία για τις συνήθεις μετρήσεις που γίνονται στην κλινική ενζυμολογία.
- Μια μονάδα ενζυμικής ενεργότητας, σύμφωνα με το Διεθνές Σύστημα Μονάδων (SI), είναι το katal (Kat): «η ποσότητα της ενεργότητας του ενζύμου που μετατρέπει ένα γραμμομόριο (mol) υποστρώματος ανά δευτερόλεπτο (s) κάτω από ορισμένες συνθήκες». $1 \text{ kat} = 6 \times 10^7 \text{ IU}$ ή $1 \text{ IU} = 16,67 \text{ nkat}$

Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας



Κινητικές
αντιδράσεις

Το υπόστρωμα
είναι σε περίσσεια

Προϋποθέσεις για τη χρήση ενζυμικού προσδιορισμού στην κλινική διαγνωστική, (μέθοδος ρουτίνας)

- 1. Η μέθοδος προσδιορισμού να είναι τεχνικά απλή, ικανοποιητικής ακρίβειας και επαναληπτικότητας, και να μην απαιτεί πολύ χρόνο, για να μπορεί να γίνεται μεγάλος αριθμός αναλύσεων σε λογικό χρόνο.
- 2. Τα αποτελέσματα πρέπει να είναι καθορισμένα, με όσο το δυνατό μικρότερη επικάλυψη μεταξύ φυσιολογικών και παθολογικών τιμών.
- 3. Το ένζυμο πρέπει να βρίσκεται στο αίμα, στα ούρα ή σε άλλο υγρό του σώματος, απ' όπου να είναι εύκολο να ληφθεί μη επεμβατικά
- 4. Η μέθοδος προσδιορισμού δεν πρέπει ν' απαιτεί πολύπλοκα όργανα.

Προϋποθέσεις για τη χρήση ενζυμικού προσδιορισμού στην κλινική διαγνωστική, (μέθοδος ρουτίνας)

- Α) Μέθοδος προσδιορισμού:
- Απλή - ταχεία
- Ακρίβεια
- Επαναληψιμότητα
- Απλή οργανολογία (πχ φασματοφωτομετρική)
- Β) μικρή αλληλεπικάλυψη φυσιολογικών - παθολογικών τιμών

Distribution of clinically important enzymes

Enzyme	Principal Sources of Enzyme in Blood	Principal Clinical Applications
Alanine aminotransferase	Liver	Hepatic parenchymal disease
Alkaline phosphatase	Liver, bone, intestinal mucosa, placenta	Hepatobiliary disease, bone disease
Amylase	Salivary glands, pancreas	Pancreatic disease
Aspartate aminotransferase	Heart, liver, skeletal muscle, erythrocytes	Hepatic parenchymal disease
Creatine kinase	Skeletal muscle, heart	Muscle disease, myocardial infarction
γ -Glutamyltransferase	Liver, pancreas, kidney	Hepatobiliary disease
Lactate dehydrogenase	Heart, erythrocytes, lymph nodes, skeletal muscle, liver	Hemolytic and megaloblastic anemias, leukemia and lymphomas, oncology
Lipase	Pancreas	Pancreatic disease
5'-Nucleotidase	Liver	Hepatobiliary disease

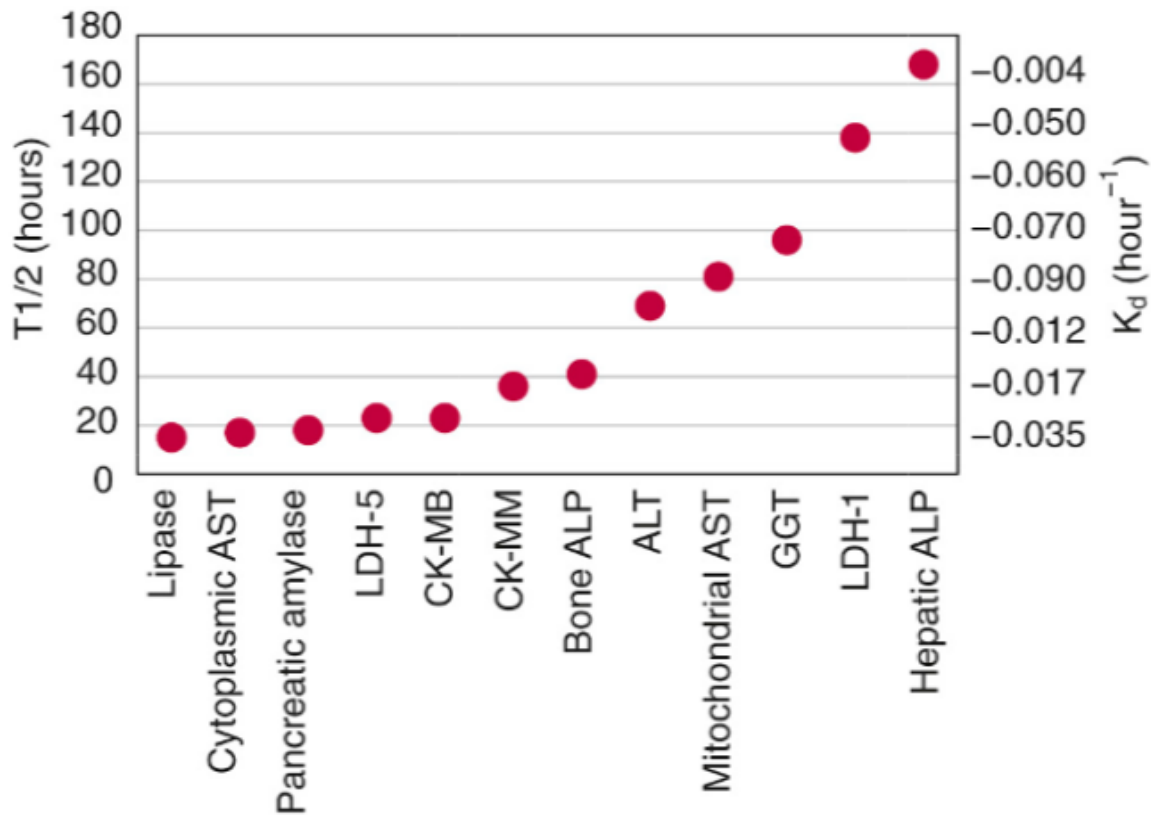
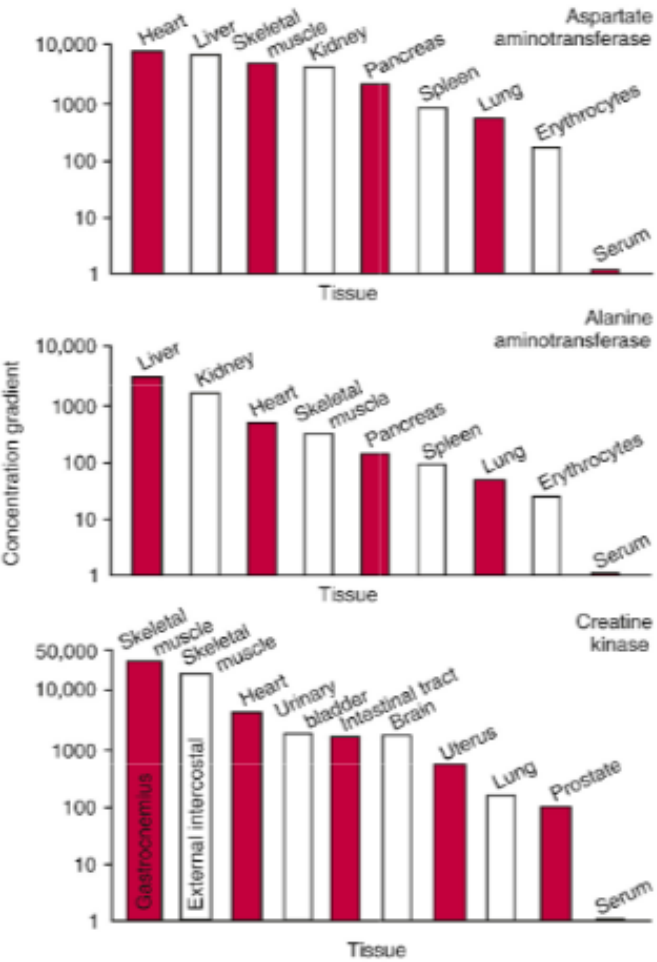


Figure 29.1

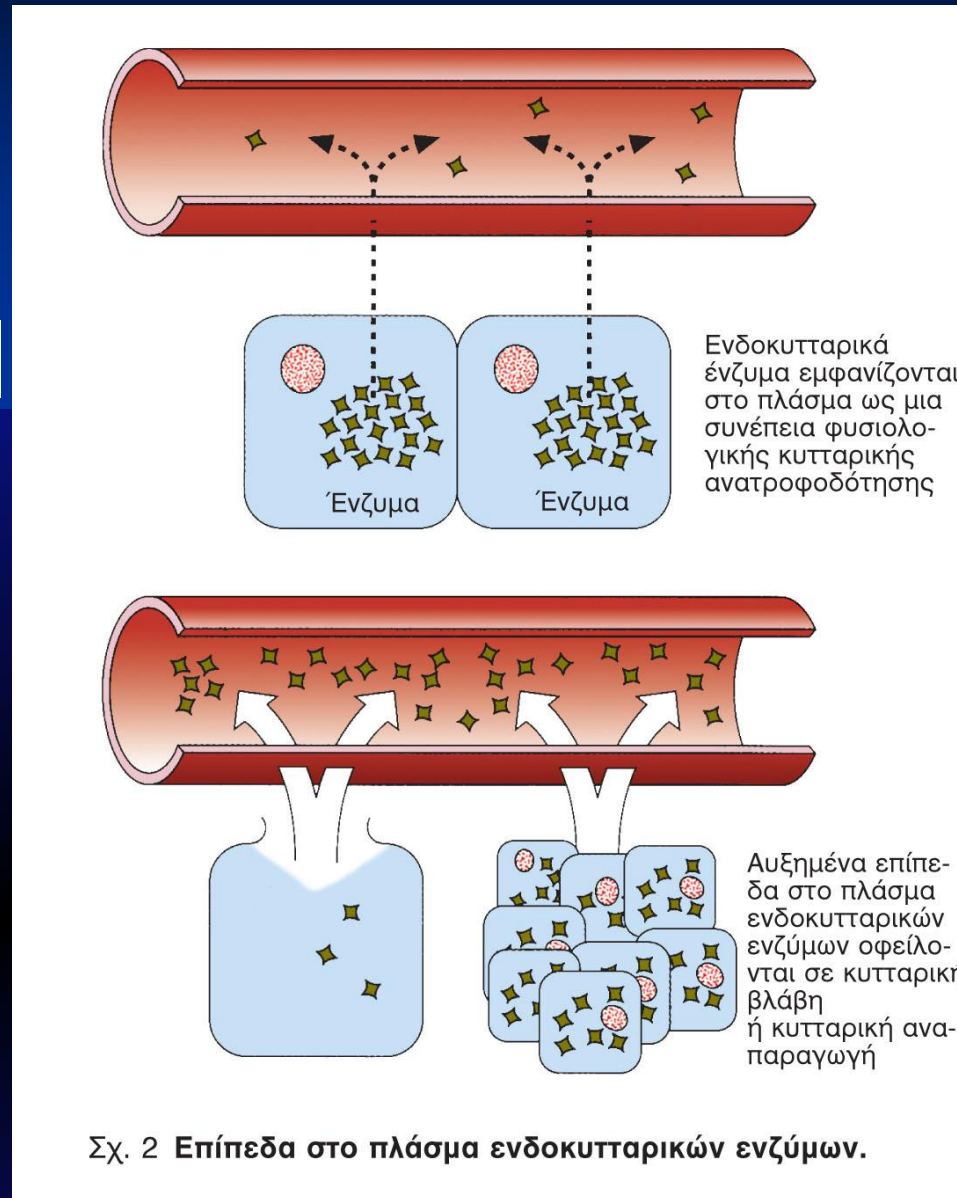
Fractional disappearance rates (k_d , in hour^{-1}) from human blood of the most important enzymes. ALP, Alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; CK-MB, creatine kinase isoenzyme MB; CK-MM, creatine kinase isoenzyme MM; GGT, γ -glutamyltransferase; LDH, lactate dehydrogenase.

Figure 29.2



The concentration gradients between some human tissues and serum for aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and creatine kinase. The concentration gradient axis is logarithmic.

Ανίχνευση κυτταρικών ενζύμων στο αίμα



Αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας στα βιολογικά υγρά (ορός πλάσμα)

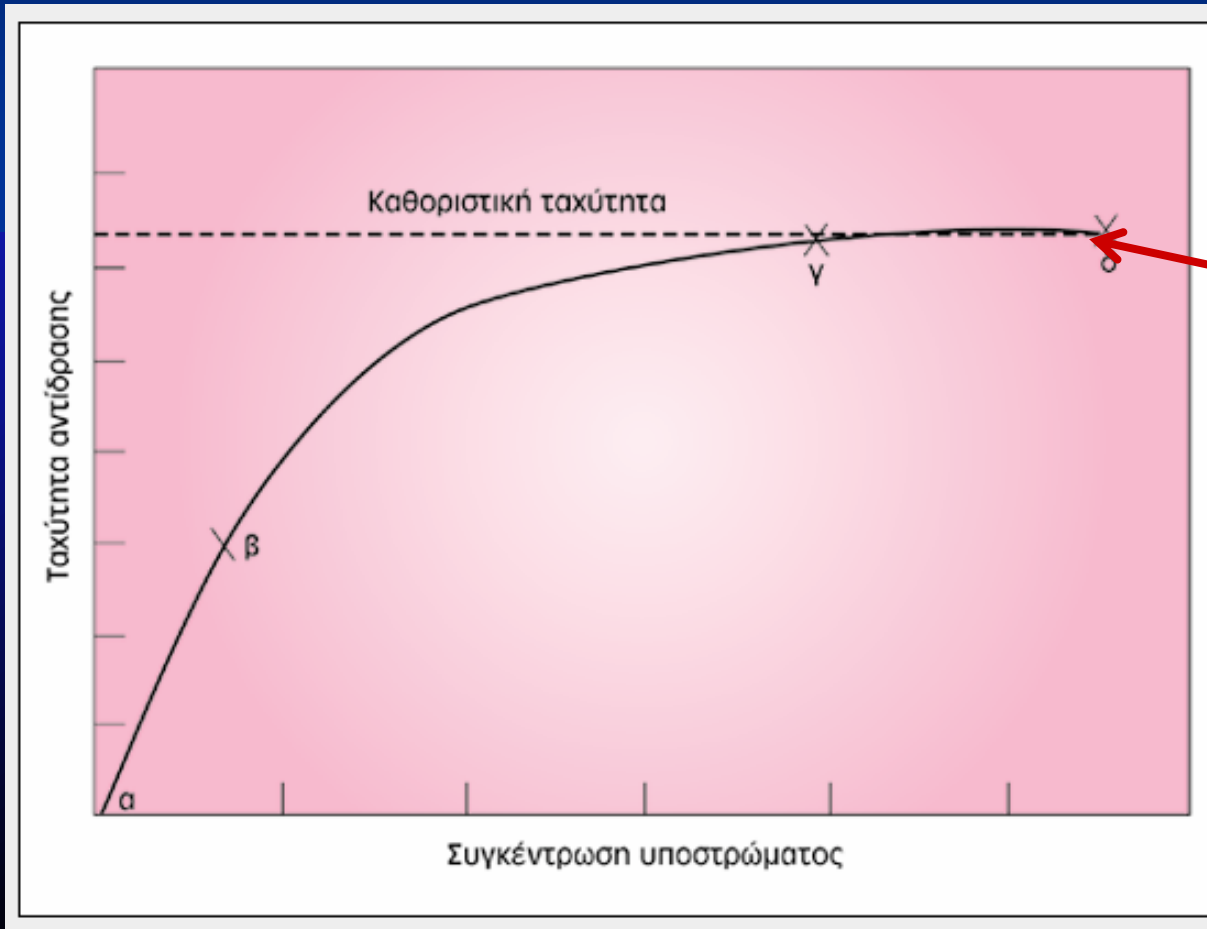
Μπορεί να οφείλεται σε :

- Ηλικία, φύλο, βάρος
- Νεογνά-παιδιά 3-6 ετών ALP αύξηση κατά 2-3 φορές
- Μεταβολική καταστροφή ---- αναγέννηση κυττάρων
- Παθολογικές καταστάσεις:
 - Διαπερατότητα κυτταρικής μεμβράνης
 - Ανοξία
 - Φάρμακα
 - Άυξηση K^+
 - Φλεγμονή (μικρού ΜΒ ένζυμα)

Εξέταση ομάδων ενζύμων για τη διάγνωση ασθενειών οργάνων ή συστημάτων.

Όργανο ή Σύστημα	Ασθένεια / ομάδα διαγνωστικών ενζύμων
Καρδιά και κυκλοφοριακό σύστημα	οξεία εμφράγματα μυοκαρδίου: • Διάγνωση: CK, CK-MB, AST, LDH, Τροπονίνη καρδιακή ανεπάρκεια : BNP/proBNP
Πάγκρεας	Οξεία παγκρεατίτιδα, παροξυσμός παγκρεατίτιδας: • α-αμυλάση • Λιπάση, φωσφολιπάση α. • θρυψίνη
Οστά	Οστικές ασθένειες: ALP
Ουροποιητικό σύστημα Καρκίνος Προστάτη	▪ ACP, PSA, PAP • Η ACP στα ούρα 50 φορές μεγαλύτερη από τον ορό. • Μετά τον ευνουχισμό ή αφαίρεση προστάτη η ACP είναι χαμηλή
Ήπαρ	• ALT, ALP, AST, χολινεστεράση GGT, LDH, 5NT

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΠΟΥ ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΩΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ



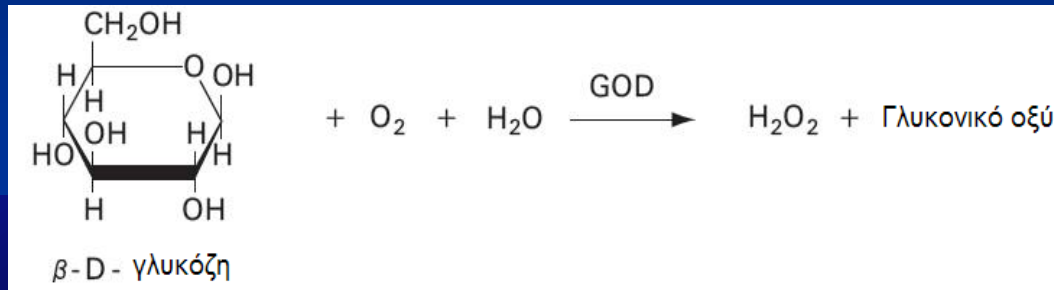
Τελικού σημείου
αντιδράσεις

Το ένζυμο είναι σε
περίσσεια

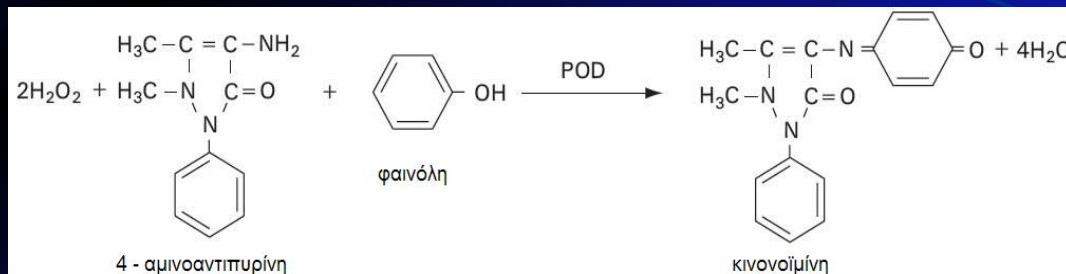
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ

Οξειδάση της γλυκόζης (Glucose oxidase, E.C.1.1.3.4)

Η οξειδάση της γλυκόζης (GOD) είναι ένζυμο που καταλύει την οξείδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ και H_2O_2 σύμφωνα με την αντίδραση



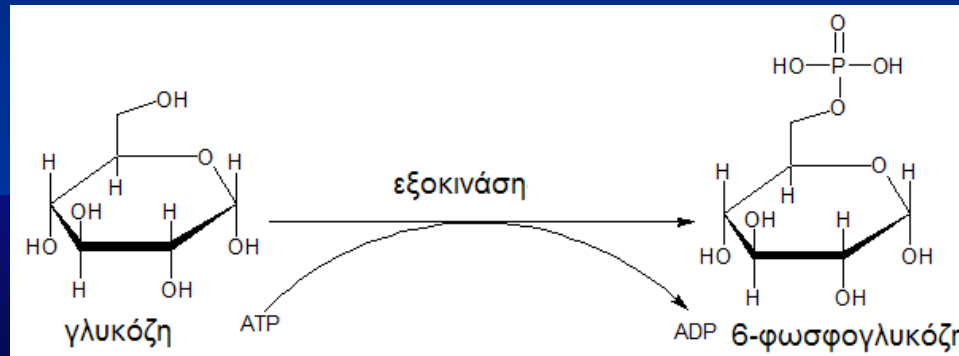
Η παραγωγή H_2O_2 είναι ευθέως ανάλογη της συγκεντρώσεως της γλυκόζης. Με προσθήκη του ενζύμου υπεροξειδάση (POD) και κατάλληλου χρωμογόνου δέκτη O_2 παράγεται έγχρωμο προϊόν, το οποίο μετράται ποσοτικά σε μια δεύτερη ενδεικτική αντίδραση φασματοφωτομετρικώς



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ

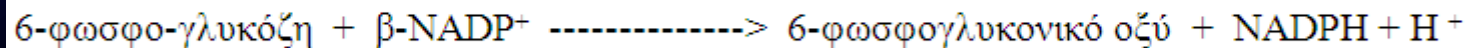
Εξοκινάση (Hexokinase, E.C.2.7.10.1). Μέθοδος αναφοράς (Reference Method)

Η εξοκινάση (HK) είναι ένζυμο που καταλύει την αντίδραση φωσφορυλίωσης της γλυκόζης από το ATP προς σχηματισμό 6-φωσφο-γλυκόζης και ADP σύμφωνα με την αντίδραση

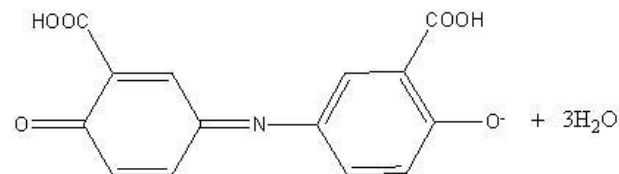
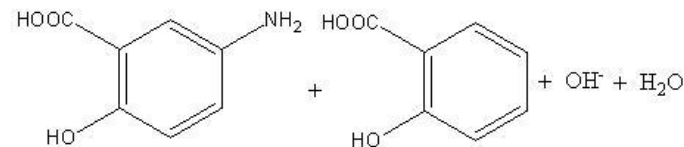
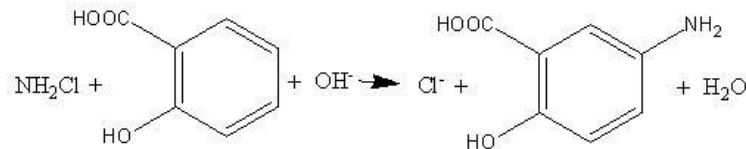
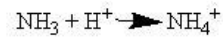
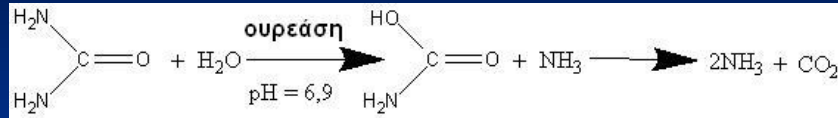


Ακολούθως η αφυδρογονάση της 6-φωσφο-γλυκόζης (Glucose 6 phosphate dehydrogenase G-6PDH) καταλύει την οξειδωση της 6-φωσφορικής γλυκόζης από το β-NADP⁺ σε 6-φωσφογλυκονικό οξύ και β-NADPH, το οποίο μπορεί να παρακολουθηθεί φασματοφωτομετρικά στα 340 nm ή φθορισμομετρικά (lex.340 nm, lem.455 nm),

(G-6PDH)

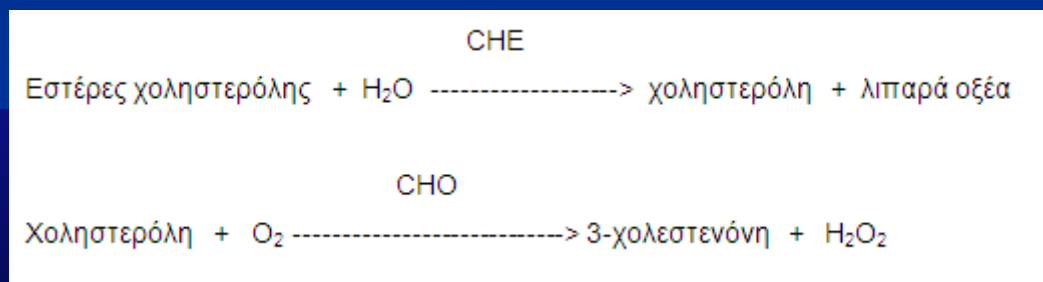


ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΥΡΙΑΣ ΣΤΟΝ ΟΡΟ (Μέθοδος ουρεάσης - Αντίδραση Berthelot)

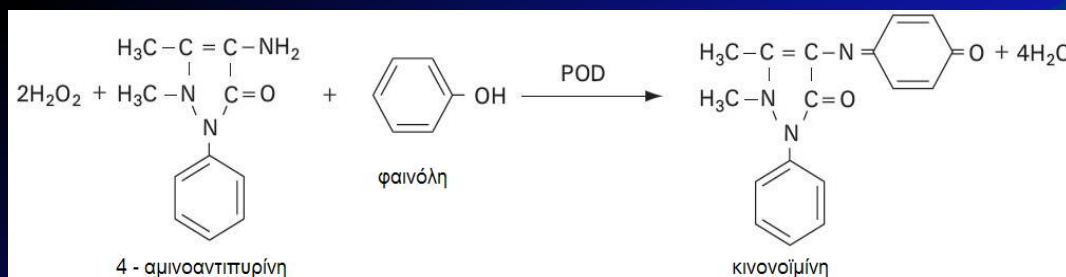


ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ (ΜΕΘΟΔΟΣ CHOD-PAP)

Η χοληστερόλη του ορού προσδιορίζεται μετά από ενζυμική υδρόλυση των εστέρων της από την εστεράση της χοληστερόλης, CHE (Cholesterol esterase, E.C. 3.1.1.13) και οξειδωσή της από την οξειδάση της χοληστερόλης, CHO (Cholesterol oxidase, E.C. 1.1.3.6).

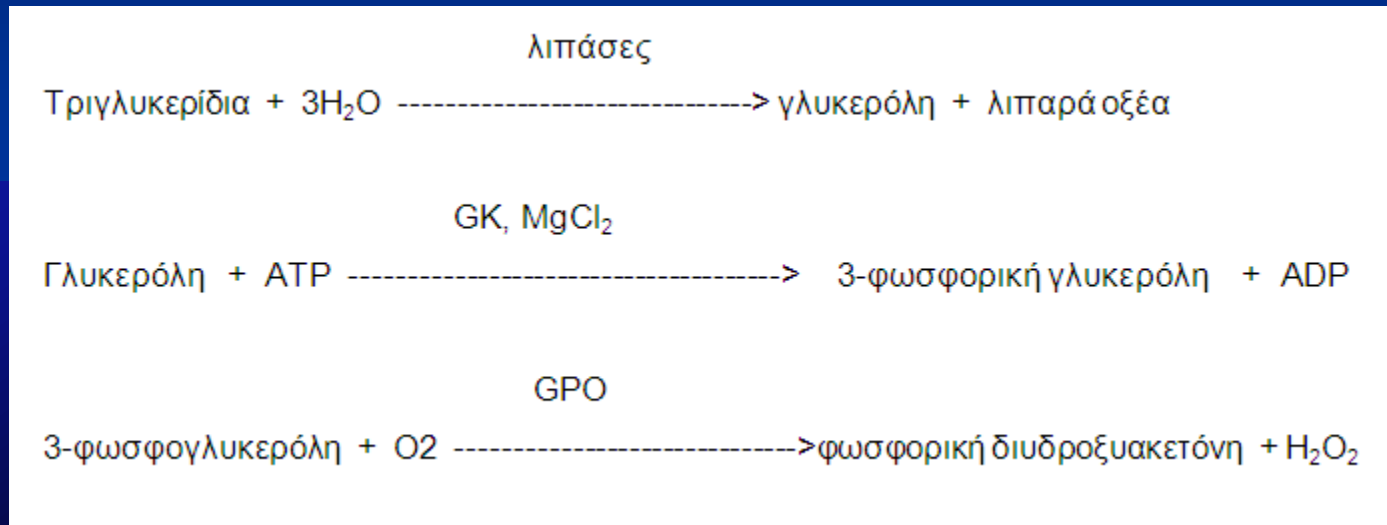


Η παραγωγή H_2O_2 είναι ευθέως ανάλογη της συγκεντρώσεως της χοληστερόλης. Με προσθήκη του ενζύμου υπεροξειδάση (POD) και κατάλληλου χρωμογόνου δέκτη O_2 παράγεται έγχρωμο προϊόν, το οποίο μετράται ποσοτικά σε μια δεύτερη ενδεικτική αντίδραση φασματοφωτομετρικώς

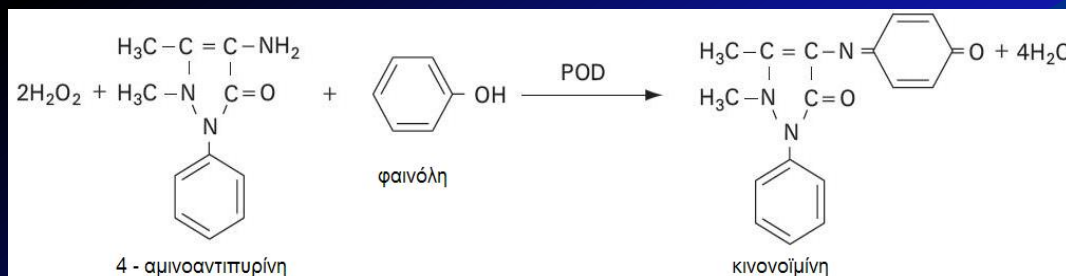


ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ, (GPO-PAP).

Τα τριγλυκερίδια προσδιορίζονται μετά από ενζυμική υδρόλυσή τους από λιπάσες και η γλυκερόλη που προκύπτει, προσδιορίζεται με ενζυμική μέθοδο. Η γλυκερόλη με τη δράση της γλυκερινοκινάσης (GK, Glycerol kinase, E.C.2.7.1.30) και φωσφορικής γλυκερινοοξειδάσης (GPO, Glycerol phosphate oxidase, E.C.1.1.3.21), παράγει H_2O_2



Η παραγωγή H_2O_2 είναι ευθέως ανάλογη της συγκεντρώσεως. Με προσθήκη του ενζύμου υπεροξειδάση (POD) και κατάλληλου χρωμογόνου δέκτη O_2 παράγεται έγχρωμο προϊόν, το οποίο μετράται ποσοτικά σε μια δεύτερη ενδεικτική αντίδραση φασματοφωτομετρικώς



Δραστηκότητα της αλκαλικής φωσφατάσης ως συνάρτηση της ηλικίας στα παιδιά και στους εφήβους

