



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ: «ΒΑΣΙΚΕΣ ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Τίτλος:

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ
ΑΙΜΑΤΟΣ

Της: ΡΙΖΟΥ ΑΝΝΑΣ – ΜΑΡΙΑΣ

Επιβλέπουσα: ΜΠΑΪΡΑΚΤΑΡΗ ΕΛΕΝΗ, Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας

ΙΩΑΝΝΙΝΑ,
Νοέμβριος 2020



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ: «ΒΑΣΙΚΕΣ ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Τίτλος:

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ
ΑΙΜΑΤΟΣ

Της: ΡΙΖΟΥ ΑΝΝΑΣ – ΜΑΡΙΑΣ

Επιβλέπουσα: ΜΠΑΪΡΑΚΤΑΡΗ ΕΛΕΝΗ, Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας

ΙΩΑΝΝΙΝΑ,
Νοέμβριος 2020

Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

ΡΙΖΟΥ ANNA – ΜΑΡΙΑ

**Τίτλος Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης: ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ
ΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ**

Ημερομηνία παρουσίασης: 07/01/2021

Επιβλέπουσα: καθ. ΜΠΑΪΡΑΚΤΑΡΗ ΕΛΕΝΗ

**Εξεταστική επιτροπή: κα. Μαγκλάρα Αγγελική
κα. Μπούμπα Βασιλική**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία δεν θα μπορούσε να υλοποιηθεί χωρίς την στήριξη και βοήθεια της καθηγήτριας Ελένης Μπαϊρακτάρη, στην οποία εκφράζω ειλικρινείς και θερμές ευχαριστίες καθώς με εμπιστεύτηκε και μου προσέφερε γνώσεις και πολύτιμες συμβουλές. Επίσης, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κυρία Χρυσούλα Καλογερά, Δρ. Χημικού του Βιοχημικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για την καθοδήγηση της και τη σημαντική βοήθεια της. Σε όλους τους συμφοιτητές και φίλους, οι οποίοι ήταν πάντα παρόντες και πρόθυμοι να με βοηθήσουν και στηρίξουν. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και στους φίλους μου που με στήριξαν και με υποστηρίζουν.

Στον παππού μου,
Βασίλη

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο κάθε ασθενής είναι μια ξεχωριστή οντότητα και έχει διαφορετικές ανάγκες, ακόμα και όταν συζητά κανείς για κοινές ασθένειες με κοινά χαρακτηριστικά. Έτσι για να επιλεγεί και να εφαρμοστεί η σωστή τεχνική με σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων της θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το ιστορικό του ασθενούς και η θεραπείες που λαμβάνει, να υπάρχει επικοινωνία ανάμεσα σε εργαστηριακούς και κλινικούς γιατρούς. Αυτό σημαίνει ότι μπορούν να αποφευχθούν "λάθη", τα οποία είναι εύκολο να συμβούν λόγω έλλειψης σημαντικών στοιχείων στο ιστορικό του ασθενούς, όπως για παράδειγμα η λήψη φαρμάκων, τα οποία ενδέχεται να παραποιήσουν ιατρικές εξετάσεις και να δώσουν "λάθος διάγνωση". Η παρούσα διπλωματική εργασία επιχειρεί να διερευνήσει το "ενδεχόμενο λάθος", λόγω παρεμβολής διάφορων παραγόντων στην γραφική παράσταση της ηλεκτροφόρησης με αποτέλεσμα τη μη σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Το πρώτο κεφάλαιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αφορά τις πρωτεΐνες στον ορό του αίματος. Συνεχίζει με το δεύτερο κεφάλαιο αναφορικά με τους παράγοντες αύξησης/ μείωσης των πρωτεϊνών και τα αίτια αύξησης/ μείωσης συγκέντρωσης πρωτεϊνών και την κλινική σημασία τους. Έπειτα, στο τρίτο κεφάλαιο γίνεται αναφορά προσδιορισμού των πρωτεϊνών ορού.

Ακολουθεί το τέταρτο κεφάλαιο της ηλεκτροφόρησης, με αναφορά στις μεθόδους προσδιορισμού πρωτεϊνών ορού, την ιστορική αναδρομή ηλεκτροφόρησης και τις διαφορές με την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση. Στο πέμπτο κεφάλαιο παρατίθεται η ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές, οι αρχές αυτής και τα στάδιά της. Ακολουθεί το έκτο κεφάλαιο με τις εφαρμογές της και το σύστημα της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης. Το έβδομο κεφάλαιο περιλαμβάνει τα παραδείγματα χρήσης της ηλεκτροφόρησης στη διάγνωση διαταραχών των πρωτεϊνών του ορού και την παράθεση του πίνακα των φυσιολογικών τιμών ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών ορού. Το τελευταίο κεφάλαιο (όγδοο), πραγματεύεται το ζήτημα των παραγόντων που παρεμβαίνουν στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών και στις παρεμβολές στις καμπύλες ηλεκτροφόρησης από φαρμακευτική αγωγή. Η έρευνα

κλείνει με τα συμπεράσματα που προκύπτουν από όλες τις παραπάνω αναφορές για το ερώτημα που καλείται να διερευνήσει η παρούσα βιβλιογραφική έρευνα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|----|
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ | 6 |
| ΠΡΟΛΟΓΟΣ..... | 7 |
| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ | 9 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. | 12 |
| 1.1. Πλάσμα & ορός του αίματος..... | 12 |
| 1.2. Πρωτεΐνες ορού & ένζυμα - φυσιολογικές τιμές | 13 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. | 17 |
| 2.1. Παράγοντες αύξησης - μείωσης των πρωτεϊνών | 17 |
| 2.2. Αιτία αυξομείωσης πρωτεϊνών του αίματος & κλινική σημασία | 17 |
| 2.2.1. Αλβουμίνη..... | 18 |
| 2.2.2. Α1 - αντιθρυψίνη..... | 19 |
| 2.2.3. Α - εμβρυϊκή πρωτεΐνη..... | 20 |
| 2.2.4. Σερουλοπλασμίνη..... | 20 |
| 2.2.5. Απποσφαιρίνη & Α2 μακροσφαιρίνη..... | 21 |
| 2.2.6. C - αντιδρώσα πρωτεΐνη | 21 |
| 2.2.7. Γ' σφαιρίνες - ανοσοσφαιρίνες..... | 22 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. | 25 |
| 3.1. Αναφορά μεθόδων προσδιορισμού πρωτεϊνών ορού | 25 |
| 3.2. Οι χρωματογραφικές & άλλες μέθοδοι μέτρησης | 25 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. | 28 |
| 4.1. Ιστορική αναδρομή ηλεκτροφόρησης & διαφορές με την τριχοειδή Η/Φ..... | 28 |
| 4.2. Βασικές αρχές ηλεκτροφόρησης πηκτής | 30 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. | 32 |
| 5.1. Ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές | 32 |
| 5.2. Αρχές τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης | 33 |

| | |
|--|----|
| 5.3. Στάδια τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης..... | 35 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. | 36 |
| 6.1. Εφαρμογές της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης..... | 36 |
| 6.2. Πλεονεκτήματα & μειονεκτήματα μεθόδου..... | 40 |
| 6.3 Ανοσοκαθήλωση πρωτεϊνών..... | 43 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. | 45 |
| 7.1. Παραδείγματα χρήσης της ηλεκτροφόρησης στη διάγνωση διαταραχών των πρωτεϊνών ορού | 45 |
| 7.1.1. Διαταραχές αλβουμίνης | 45 |
| 7.1.2. Έλλειψη A1 αντιθρυψίνης & χρόνια - οξεία φλεγμονή..... | 48 |
| 7.1.3. Πολυκλωνική - μονοκλωνική υπεργαμμασφαιριναιμία | 49 |
| 7.1.4. Πολλαπλό μυέλωμα & κακοήθης νεοπλασία..... | 51 |
| 7.1.5. Διάγνωση αλκοολικής κίρρωσης (ήπατος)..... | 52 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. | 53 |
| 8.1. Παράγοντες που παρεμβαίνουν στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών | 53 |
| 8.1.1. Θερμικό φαινόμενο Joule..... | 55 |
| 8.1.2. Αλληλεπιδράσεις ουσιών με τα τοιχώματα του τριχοειδούς..... | 55 |
| 8.1.3. Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ορού σε οξική κυτταρίνη..... | 56 |
| 8.1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση διαχωρισμού κατά την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση..... | 57 |
| 8.1.5. Η φύση του ρυθμιστικού διαλύματος | 58 |
| 8.2. Παρεμβολές στις καμπύλες ηλεκτροφόρησης από φαρμακευτική αγωγή | 59 |
| 8.2.1. Μονοκλωνικό αντίσωμα (Siltuximab)..... | 59 |
| 8.2.2. Μονοκλωνικό αντίσωμα (Daratumumab)..... | 63 |
| 8.2.3. Εφαρμογή του ελέγχου Hydrashift 2/4 IVD Daratumumad | 65 |
| 8.2.4. Μονοκλωνικό αντίσωμα (Elotuzumab) | 66 |

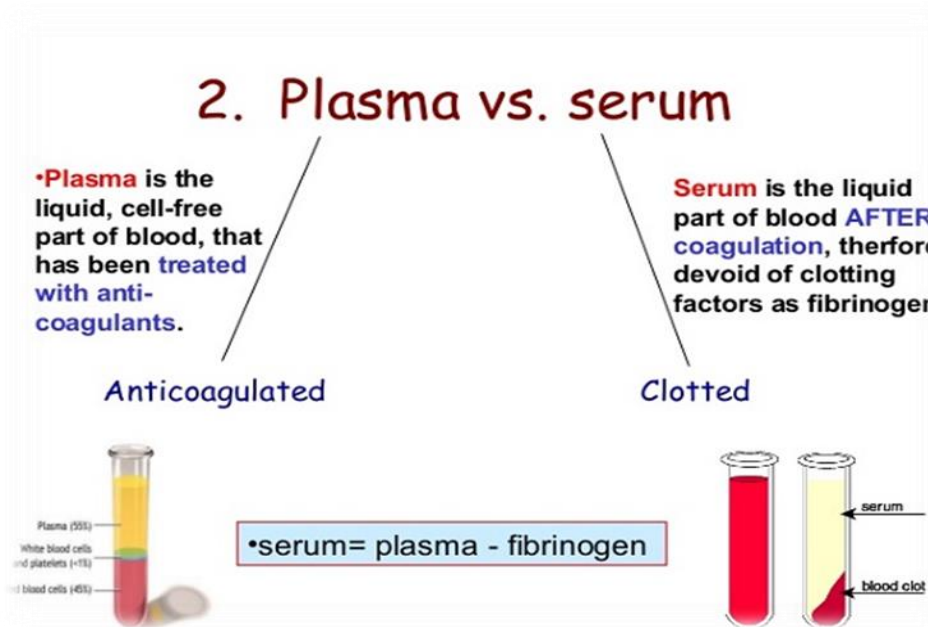
| | |
|---|----|
| 8.3. Παράδειγμα λανθασμένης ερμηνείας αποτελεσμάτων λόγω παρεμβολής | 70 |
| 8.4. Παρεμβολή άλλων φαρμάκων στην ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών | 75 |
| 8.5. Παρεμβολή στις δοκιμασίες βιοχημείας (HIL)..... | 77 |
| ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... | 81 |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 82 |
| ABSTRACT | 83 |
| BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 84 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.

1.1. Πλάσμα & ορός του αίματος

Ως αίμα ονομάζεται ένας υγρός υδατοπληθής ιστός που συνεχώς ανανεώνεται και κυκλοφορεί στα αγγεία του κυκλοφορικού συστήματος, ρέει σε μια κανονική μονόδρομη κατεύθυνση και προωθείται από τις ρυθμικές συστολές της καρδιάς, όπως σημειώνεται από τη καθηγήτρια Π. Βεζυράκη (2016, Παρουσιάσεις BBE). Το αίμα μεταφέρει θρεπτικά υλικά, ηλεκτρολύτες, ορμόνες, βιταμίνες, αντισώματα, θερμότητα και οξυγόνο στους ιστούς και απομακρύνει άχρηστα υλικά και διοξείδιο του άνθρακα. Αποτελείται περίπου κατά 55% από πλάσμα και κατά 45% από κύτταρα.

Το πλάσμα είναι ένα υποκίτρινο υγρό το οποίο αποτελείται κυρίως από νερό, ιόντα, πρωτεΐνες, ορμόνες και λιπίδια. Τα κυτταρικά στοιχεία αποτελούνται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. Ο ορός του αίματος είναι πλάσμα το οποίο δεν περιέχει παράγοντες πήξεως. Οι διαφορές του πλάσματος και του ορού του αίματος δίνονται στην εικόνα 1, παρακάτω.



Εικόνα 1: Διαφορά ορού και πλάσματος
Πηγή: Pokhrel (2015)

1.2. Πρωτεΐνες ορού & ένζυμα – φυσιολογικές τιμές

Πρωτεΐνες βρίσκονται σε όλα τα υγρά του σώματος, ωστόσο εμείς παρακάτω θα επικεντρωθούμε στις πρωτεΐνες του πλάσματος. Υπάρχουν περισσότερες από 100 γνωστές πρωτεΐνες στο πλάσμα με χαρακτηρισμένες λειτουργίες. Επίσης μερικές πλασματικές πρωτεΐνες είναι ένζυμα (ρενίνη, παράγοντες πήξης) (William Marshall, et.al 2008) . Οι τιμές και οι φυσιολογικές λειτουργίες τους παρατίθενται στο παρόν κεφάλαιο.

Η αλβουμίνη είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη που κυκλοφορεί στο πλάσμα. Αντιπροσωπεύει το 50% των ολικών πρωτεϊνών του πλάσματος σε ένα υγιή άτομο με συγκέντρωση που φθάνει τα 3,5-5 g/dL. Συντίθεται στα ηπατοκύτταρα και ταχέως εκκρίνεται στην κυκλοφορία με μία συχνότητα των 10-15 mg την ημέρα. Μόνο μικρή ποσότητα αποθηκεύεται στο ήπαρ και πολύ γρήγορα εκκρίνεται και αυτή στην κυκλοφορία του αίματος. Η ανθρώπινη αλβουμίνη παίρνει μέρος σε πολλές λειτουργίες, όπως στη ρύθμιση της κολλοειδωσμοτικής πίεσης του πλάσματος (κατά 80%) και στη μεταφορά ενδογενών και εξωγενών προσδετών (φάρμακα). Εκτός της αλβουμίνης, που θεωρείται η πιο σημαντική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην ηλεκτροφόρηση, μία άλλη μεγάλη κατηγορία πρωτεϊνών του πλάσματος είναι οι σφαιρίνες, οι οποίες διαχωρίζονται σε τρεις ομάδες : α-, β- και γ- σφαιρίνες. Οι α- σφαιρίνες χωρίζονται στις α1 και α2 σφαιρίνες. Οι α1 σφαιρίνες αποτελούνται από τις : α1 αντιθρυψίνη, α1 όξινη γλυκοπρωτεΐνη και α-εμβρυϊκή πρωτεΐνη. Οι α2 σφαιρίνες αποτελούνται από τις : σερουλοπλασμίνη, απτοσφαιρίνη και α2 μακροσφαιρίνη.

Η α1 αντιθρυψίνη είναι ένας φυσικός αναστολέας πρωτεασών και ανήκει στην υπεροικογένεια της σερίνης (Κριαρά, 2015). Η σφαιρίνη αυτή συντίθεται στο ήπαρ και έχει προστατευτικό ρόλο για τον οργανισμό. Πέρα στο ότι αναστέλλει τις πρωτεάσες, συγκαταλέγεται στις πρωτεΐνες οξείας φάσης. Αυτό σημαίνει πως η συγκέντρωσή της αυξάνει σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Η φυσιολογική συγκέντρωσή της α1 αντιθρυψίνης κυμαίνεται στα 80-220 mg/dl. Η ιδιαίτερη κλινική σημασία της πρωτεΐνης αυτής οφείλεται στις συνέπειες από την έλλειψή της.

Τυχόν έλλειψη της πρωτεΐνης αυτής, που συνήθως οφείλεται σε κληρονομική διαταραχή της σύνθεσής της, οδηγεί σε εμφύσημα και κίρρωση του ήπατος. Υπάρχει επίσης αυξημένος καρδιαγγειακός κίνδυνος που σχετίζεται με μετάλλαξη του γονιδίου SERPINA1 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αυτήν (Fähndrich, 2017). Η έλλειψή της και οι συνέπειες αυτής θα αναλυθούν εκτενέστερα στο δεύτερο κεφάλαιο.

Η α-εμβρυική πρωτεΐνη είναι μία γλυκοπρωτεΐνη και συγκαταλέγεται στις ογκοπρωτεΐνες, καθώς μπορεί να χρησιμεύσει ως καρκινικός δείκτης. Μάλιστα, τυχόν αλλαγές στη συγκέντρωσή της μπορούν να προβλέψουν την επιβίωση, έπειτα από χημειοθεραπείες ή εκτομή του ήπατος στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Η μείωση της συνδέεται με απάντηση των ασθενών στη θεραπεία (Chao, 2017).

Όπως και η αντιθρυψίνη, έτσι και **η α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη** συγκαταλέγεται στις πρωτεΐνες οξείας φάσης. Συνεπώς η συγκέντρωσή της αυξάνεται ραγδαία έπειτα από κάποια φλεγμονώδη απάντηση του οργανισμού. Η α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη συντίθεται στο ήπαρ, αλλά και εξωηπατικά από κύτταρα του μαστού και του εντέρου. Πειραματικά έχει αποδειχθεί πως αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων και μορίων κολλαγόνου (Βασιλειάδου, 2015).

Ξεκινώντας με τις α2 σφαιρίνες, **η σερουλοπλασμίνη** θεωρείται και αυτή πρωτεΐνη οξείας φάσης. Οι φυσιολογικές τιμές κυμαίνονται μεταξύ 15,5-59,2 mg/dl. Η σερουλοπλασμίνη συντίθεται στο ήπαρ, αλλά και από ενεργοποιημένα μονοκύτταρα και μακροφάγα. Ευρίσκεται στο πλάσμα, ωστόσο συγκεντρώσεις της μπορούν να βρεθούν και σε άλλα σωματικά υγρά, όπως το αμνιακό υγρό και το γάλα. Η σερουλοπλασμίνη είναι η κύρια πρωτεΐνη η οποία δεσμεύει χαλκό και σχετίζεται με πολλές λειτουργίες. Είναι υπεύθυνη για την οξείδωση Fe^{2+} και την εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών, οι οποίες δημιουργούν δυσμενή αποτελέσματα στον οργανισμό (οξειδωτικό στρες) (Dannay, 2016).

Η αποσφαιρίνη είναι μία α2 σφαιρίνη της οποίας οι φυσιολογικές τιμές κυμαίνονται μεταξύ 30-200 mg/dl. Είναι επίσης πρωτεΐνη οξείας φάσης. Ο ρόλος της είναι να δεσμεύει την αιμοσφαιρίνη κατά τη διάρκεια ενδαγγειακής αιμόλυσης και προφανώς η κλινική χρησιμότητά της υπόκειται στην επιβεβαίωση αυτής της παθολογικής κατάστασης.

Τελευταία α2 σφαιρίνη είναι η **α2 μακροσφαιρίνη**. Το όνομα της οφείλεται στο μεγάλο μοριακό της βάρος (820 KD) και το φυσιολογικό εύρος τιμών της είναι 130-300 mg/dl. Η α2 μακροσφαιρίνη, όπως και η α1 αντιθρυψίνη είναι αναστολέας πρωτεασών. Παράγεται και καταβολίζεται στο ήπαρ.

Οι β-σφαιρίνες αποτελούνται από τέσσερις υποκατηγορίες την τρανφερρίνη, τα συστατικά του συμπληρώματος C3-C4, τη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη και τη CRP (C-αντιδρώσα πρωτεΐνη).

Η τρανφερρίνη είναι η κύρια πρωτεΐνη που μεταφέρει σίδηρο στο πλάσμα. Είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που προέρχεται από το ήπαρ και οι φυσιολογικές της τιμές βρίσκονται μεταξύ 1,8-3,5 g/l ορού. Η τρανσφερρίνη είναι κορεσμένη με σίδηρο κατά 30%, ενώ εάν ο κορεσμός της φτάσει το 100% τότε πρόκειται για μία κληρονομική νόσο, την αιμοχρωμάτωση. Αυτή θεωρείται και η κλινική της χρησιμότητα.

Ως συμπλήρωμα ορίζονται οι πρωτεΐνες που συμπληρώνουν τη δράση των αντισωμάτων. Τα συστατικά του συμπληρώματος ξεκινούν με το C1 έως και το C9 και είναι υπεύθυνα για την οψωνινοποίηση, τη φλεγμονή και τη λύση. **Ειδικά τα συστατικά C3-C4** είναι υπεύθυνα και για την ενεργοποίηση των βασεόφιλων ιστοκυττάρων. Η κλινική τους χρησιμότητα έγκειται στη διάγνωση κάποιας ανοσολογικής νόσου, όπως βακτηριακές λοιμώξεις, αυτοάνοσα νοσήματα. Οι φυσιολογικές τιμές βρίσκονται μεταξύ 75-135 mg/dl.

Τελευταία β σφαιρίνη συγκαταλέγεται **η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)**. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη χρησιμοποιείται για την ανίχνευση φλεγμονών και θεωρείται πιο ειδική από την ταχύτητα καθίζησης ερυθρών. Πέρα από φλεγμονώδεις απαντήσεις του οργανισμού έχει κλινική χρησιμότητα ως δείκτης καρδιαγγειακού κινδύνου. Για το λόγο αυτό τη θεωρούμε αμυντική πρωτεΐνη. Επίσης ενεργοποιεί τα συστατικά του συμπληρώματος, έτσι μπορούμε να πούμε πως παίζει κάποιο ρόλο στην οψωνινοποίηση.

Οι γ σφαιρίνες ή αλλιώς ανοσοσφαιρίνες (Igs) είναι πρωτεΐνες του πλάσματος, που παράγονται ως απάντηση του οργανισμού σε ένα ερέθισμα (αντιγόνο). Το κάθε αντίσωμα είναι ειδικό για ένα αντιγόνο, σαν το κλειδί για την κλειδαριά. Κάθε αντίσωμα διαθέτει δύο θέσεις πρόσδεσης με ένα αντιγόνο. Ένα τυπικό αντίσωμα αποτελείται από 2 ελαφριές και 2 βαριές αλυσίδες, οι οποίες

ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Υπάρχουν πέντε τάξεις ανοσοσφαιρινών (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE), η καθεμία από τις οποίες έχει διαφορετικό ρόλο σε μία ανοσολογική απάντηση. [Η IgG ανοσοσφαιρίνη](#) αποτελεί περίπου το 80% των ανοσοσφαιρινών στον ορό. Είναι μονομερές και αυτό της προσδίδει την ικανότητα να διαπερνά με ευκολία τα τοιχώματα των αγγείων. Ο ρόλος και η κλινική της χρησιμότητα είναι να ενισχύει τη φαγοκυττάρωση, να εξουδετερώνει ιούς και τοξίνες, καθώς και να παρέχει προστασία στο έμβρυο και το νεογέννητο. Αυτό το χαρακτηριστικό την κάνει να είναι η σημαντικότερη ανοσοσφαιρίνη για την παθητική ανοσία του εμβρύου από τη μητέρα, διαμέσου του πλακούντα. [Η IgM](#) έχει μεγαλύτερο μέγεθος, συνεπώς δεν έχει την ικανότητα να διαπερνά τα τοιχώματα. Όμως είναι η πρώτη ανοσοσφαιρίνη που παράγεται κατά την έναρξη μιας λοίμωξης. Άρα μεγάλη ποσότητα IgM στον ορό ενός ασθενή για έναν παθογόνο μικροοργανισμό, υποδεικνύει ότι ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός οφείλεται για την λοίμωξη. [Η IgA](#) είναι η αφθονότερη ανοσοσφαιρίνη στον οργανισμό. Ανιχνεύεται σε όλες τις εκκρίσεις του σώματος (σίελος, δάκρυα, βλέννη, γάλα, εντερικές εκκρίσεις) και παρέχει τοπική προστασία ενάντια σε μικροοργανισμούς. Χαρακτηριστικό αυτής της ανοσοσφαιρίνης είναι η προστασία που παρέχει στο νεογνό από λοιμώξεις του γαστρεντερικού.

Η κλινική χρησιμότητα της [IgD ανοσοσφαιρίνης](#) φαίνεται πως είναι η διάγνωση μυελωμάτων. Επίσης, ίσως παίζει ρόλο και στην καταστροφή των αυτοαντισωμάτων, που είναι υπεύθυνα για τα αυτοάνοσα νοσήματα, μία μάστιγα της εποχής μας.

Τέλος, [η IgE ανοσοσφαιρίνη](#) έχει διαγνωστικό ρόλο σε κάποια αλλεργική αντίδραση του οργανισμού και την καταστροφή παρασιτικών σκωλήκων. Είναι και αυτή μονομερές όπως η IgG, αλλά έχει μεγαλύτερο μέγεθος (Tortora, 2009).

Στο παρακάτω κεφάλαιο θα εξεταστούν οι παράγοντες που επηρεάζουν τις τιμές των προαναφερθέντων πρωτεϊνών, τα αίτια αύξησης και μείωσης των τιμών αυτών, καθώς και η κλινική τους σημασία και ερμηνεία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.

2.1. Παράγοντες αύξησης – μείωσης των πρωτεϊνών

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που συμβάλλουν στις τιμές των πρωτεϊνών του πλάσματος, όπως είναι η ηλικία, η θερμοκρασία του περιβάλλοντος και ορισμένες παθολογικές καταστάσεις. Η ποσότητα των πρωτεϊνών από την άλλη συνδέεται άμεσα με τους μύες καθώς και την ενυδάτωση ή αφυδάτωση ενός οργανισμού. Όσο η ηλικία ενός ατόμου αυξάνει, τόσο επέρχεται μείωση των μυών και αφυδάτωση αυτών. Συνεπώς με την αύξηση της ηλικίας επέρχεται αύξηση στην ποσότητα των πρωτεϊνών του πλάσματος. Άλλοι παράγοντες αύξησης ή μείωσης των πρωτεϊνών του πλάσματος είναι το είδος της εργασίας ενός ατόμου, η θερμιδική πρόσληψη, ο ρυθμός και το είδος της φυσικής δραστηριότητας και φυσικά το άγχος.

Σε γενικές γραμμές, η μεταβολή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών πλάσματος, μπορεί να οφείλεται σε τρεις παράγοντες : το ρυθμό της σύνθεσης των πρωτεϊνών, το ρυθμό της απομάκρυνσής τους και τον όγκο κατανομής (William Marshall, et.al 2008). Υπάρχουν όμως και άλλες παράμετροι που οδηγούν σε αύξηση ή μείωση των πρωτεϊνών.

2.2. Αιτία αυξομείωσης πρωτεϊνών του αίματος & κλινική σημασία

Η αύξηση στην ολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών μπορεί να οφείλεται και σε τεχνητά. Με τον όρο τεχνητά, εννοείται κάποιο λάθος στην τεχνική λήψης του δείγματος πριν, μετά ή κατά την αιμοληψία. Η παρατεταμένη στάση του αίματος με σφικτή περίδεση είναι ικανή να οδηγήσει σε μία αύξηση των πρωτεϊνών κατά 20%, λόγω αιμοσυμπύκνωσης. Αιτίες που οδηγούν σε αύξηση της ολικής συγκέντρωσης των πρωτεϊνών του πλάσματος είναι, όπως έχει προαναφερθεί, η αφυδάτωση. Με την αφυδάτωση μειώνεται ο όγκος κατανομής και συνεπώς υπόκειται αύξηση των ολικών πρωτεϊνών. Ένας άλλος προφανής λόγος είναι η αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης. Ενδιαφέρον προκαλούν η Υπεργαμμασφαιριναιμία και η Παραπρωτεϊναιμία οι οποίες με τη σειρά τους αυξάνουν τον ολικό αριθμό των πρωτεϊνών. Οι παραπρωτεΐνες είναι ανοσοσφαιρίνες, οι οποίες παράγονται από

ένα μοναδικό κλώνο Β λεμφοκυττάρων, τα πλασματοκύτταρα. Συνήθως ανιχνεύονται στο πολλαπλό μύελωμα. Χαρακτηριστικές είναι οι παραπρωτεΐνες Bence-Jones, που ανιχνεύονται στα ούρα των ασθενών με πολλαπλό μύελωμα (William Marshall, et.al 2008).

Στο προηγούμενο υποκεφάλαιο αναφέρθηκε πως οι διαιτητικές συνήθειες, αποτελούν ένα σημαντικό κομμάτι στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών του πλάσματος. Πράγματι, ο υποσιτισμός, όπως και η χαμηλή πρόσληψη μέσω της διατροφής, κατάλληλων αποθεμάτων πρωτεϊνών οδηγούν σε μείωση της ολικής συγκέντρωσης. Ένα άλλο αίτιο είναι η υπερυδάτωση και κατά συνέπεια η αύξηση του όγκου κατανομής, καθώς και η αυξημένη διαπερατότητα των τριχοειδών. Ωστόσο, πέρα από τη μειωμένη πρόσληψη, παράγοντας μείωσης της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών είναι και η αυξημένη απέκκριση και ο καταβολισμός. Σε καταστάσεις απώλειας πρωτεϊνών από τα ούρα, το δέρμα και το γαστρεντερικό, αυξάνεται η απέκκριση των πρωτεϊνών και επέρχεται μείωση στην ολική συγκέντρωσή τους. Επίσης σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως ηπατοπάθειες και χυμική ανοσοανεπάρκεια. Είναι γνωστό πως οι περισσότερες πρωτεΐνες συντίθενται στο ήπαρ.

Συνεπώς, όταν το ήπαρ προσβάλλεται από κάποια νόσο, μειώνεται η πρωτεϊνοσύνθεση και αντίστοιχα η συγκέντρωση όλων των πρωτεϊνών. Η αλκοολική κίρρωση του ήπατος είναι μία από τις αιτίες, τις οποίες το ήπαρ αδυνατεί να δημιουργήσει πρωτεΐνες. Ορισμένες τοξίνες, από την άλλη, προκαλούν οξεία νέκρωση των ηπατοκυττάρων, με δυσμενείς επιπτώσεις. Τοξίνες μανιταριών, ενδοτοξίνες τετραχλωράνθρακα και ιογενείς λοιμώξεις, προσβάλλουν τα ηπατοκύτταρα, με αποτέλεσμα τη μείωση των πρωτεϊνών (Loffler, 2007).

2.2.1. Αλβουμίνη

Η αλβουμίνη εκπροσωπεί το 50% των ολικών πρωτεϊνών του πλάσματος. Η μείωση της αλβουμίνης (υπαλβουμιναιμία) οφείλεται σε μία πλειάδα συνιστωσών. Η μειωμένη σύνθεση, ο αυξημένος όγκος κατανομής και η αυξημένη απέκκριση οδηγούν σε μείωση των τιμών της. Όπως αναφέρθηκε, ο ρόλος της στην κολλοειδωσμοτική πίεση είναι κρίσιμος. Μείωση στην τιμή της αλβουμίνης,

διαταράσσει την ισορροπία μεταξύ πλάσματος και μεσοκυττάριου υγρού, με αποτέλεσμα τη μετακίνηση και τη συσσώρευση του τελευταίου. Η κλινική εικόνα αυτού εμφανίζεται ως οίδημα. Επακόλουθο της κατάστασης αυτής είναι και η κατακράτηση νατρίου, που με τη σειρά της επαυξάνει την εικόνα του οιδήματος.

Ο υποσιτισμός, η ηπατοπάθειες και η δυσαπορρόφηση είναι μερικές από τις αιτίες που ευθύνονται για τη μειωμένη σύνθεση της αλβουμίνης. Η νόσος του Crohn, η οποία είναι μία φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, προκαλεί βλάβες και εξελκώσεις σε όλο το τμήμα του βλεννογόνου του εντέρου, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η απορρόφηση των πρωτεϊνών, οδηγώντας σε μείωσή τους. Μειωμένη σύνθεση της αλβουμίνης προκαλεί και η ηπατοπάθεια, η οποία προέρχεται είτε εξαιτίας τοξινών και ιών είτε σε φλεγμονή ή σε δίαιτα πτωχή σε πρωτεΐνες.

Τέλος, από τις κύριες αιτίες υπαλβουμιναιμίας, είναι και η αυξημένη απέκκριση αυτής. Αυτό μπορεί να συμβεί κατευθείαν από το γαστρεντερικό, μέσω κάποιας βλάβης του βλεννογόνου (νόσος Crohn), από τα ούρα ή από το δέρμα. Κύρια αιτία απώλειας αλβουμίνης, αλλά και άλλων πρωτεϊνών, από τα ούρα, είναι το Νεφρωσικό σύνδρομο και άλλες νεφρικές παθήσεις. Αιμορραγία, εγκαύματα, σήψη και διάφορες καταβολικές καταστάσεις οδηγούν σε απώλεια αλβουμίνης από το δέρμα (William Marshall, et.al 2008).

Η υπεραλβουμιναιμία μπορεί να προκύψει από κάποιο σφάλμα, όπως είναι η παρατεταμένη στάση του αίματος κατά τη διάρκεια της αιμοληψίας, ή σε αφυδάτωση εξαιτίας εμέτου, διάρροιας ή ακόμη νεφρικής δυσλειτουργίας.

Η αλβουμίνη έχει ιδιαίτερη κλινική χρησιμότητα χρησιμοποιείται για τη διάγνωση νόσου του ήπατος, καθώς και κάποιας βλάβης της σύνθεσης των πρωτεϊνών, οι οποίες είναι κρίσιμες στη διατήρηση της ομοιόστασης.. Για την αξιολόγηση της σωστής λειτουργίας του ήπατος και της ικανότητας να συνθέτει πρωτεΐνες, η αλβουμίνη συσχετίζεται με το χρόνο προθρομβίνης

2.2.2. A1 – αντιθρυψίνη

Η α1 σφαιρίνη είναι ένας φυσικός αναστολέας πρωτεασών. Επίσης συγκαταλέγεται στις πρωτεΐνες οξειάς φάσης, που σημαίνει πως η συγκέντρωσή της

αυξάνει σε περιπτώσεις φλεγμονών. Μείωση της α1 αντιθρυψίνης συνδέεται κληρονομικά με τη μετάλλαξη του γονιδίου SERPINA1. Σε αυτή την περίπτωση η συγκέντρωση της αντιθρυψίνης μειώνεται στο 15% του φυσιολογικού. Στην ηλεκτροφόρηση, επίσης, υπάρχει απουσία ζώνης στην περιοχή των α1 σφαιρινών. Η κλινική χρησιμότητα της πρωτεΐνης αυτής έγκειται σε εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις κινδύνου εμφάνισης εμφυσήματος, σε νεανική ηλικία, σε άτομα τα οποία διαθέτουν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο ZZ, για την αντιθρυψίνη. Τα άτομα αυτά έχουν πιθανότητες να αναπτύξουν εμφύσημα, νεογνική ηπατίτιδα, που αργότερα είναι ικανή να οδηγήσει σε κίρρωση του ήπατος, αλλά ακόμη προσβάλλει και άλλα όργανα, όπως το δέρμα, τα νεφρά και τους πνεύμονες. Στο δέρμα είναι ικανή να προκαλέσει φλεγμονές του υποδόριου ιστού, ψωρίαση, αγγειόδερμα και διάφορες παθήσεις που σχετίζονται με τις νευρικές ίνες και τα αγγεία. Στους πνεύμονες πέρα από το εμφύσημα που προκαλεί η ανεπάρκεια της α1 σφαιρίνης, μπορεί να οδηγήσει σε άσθμα και βρογχεκτασία. Σε όλα τα παραπάνω, το κάπνισμα επιδεινώνει τις καταστάσεις.

2.2.3. Α – εμβρυϊκή πρωτεΐνη

Πρόκειται για μία α1 σφαιρίνη που ανήκει στην οικογένεια των ογκοπρωτεϊνών. Είναι ένας πολύτιμος καρκινικός δείκτης και χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση των ασθενών. Ειδικεύεται στη διάγνωση του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος και στα τερατώματα των όρχεων. Φυσιολογικά η συγκέντρωση της πρωτεΐνης αυτής στο έμβρυο είναι αρκετά υψηλή, σε σχέση με του ενήλικες που δεν ξεπερνά τα 10μg/L. Η αύξηση της συγκέντρωσης της α εμβρυϊκής πρωτεΐνης, αντανακλά, είτε δημιουργία όγκου, είτε υποτροπή του ήδη υπάρχοντος.

2.2.4. Σερουλοπλασμίνη

Η πρωτεΐνη αυτή ανήκει στις α2 σφαιρίνες. Έχει την ικανότητα να δεσμεύει χαλκό, να οξειδώνει το δισθενή σίδηρο και να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου. Πρόκειται για μία πρωτεΐνη οξειδίας φάσης, που σημαίνει πως η συγκέντρωσή της αυξάνει σε κάποια φλεγμονώδη απάντηση του οργανισμού. Έχει αποδειχθεί πως η σερουλοπλασμίνη διαθέτει προστατευτικό ρόλο στον οργανισμό έπειτα από κάποια φλεγμονή ή τραύμα. Η κλινική χρησιμότητα της α2 σφαιρίνης

έγκειται στο γεγονός πως η μείωση της κάτω από 10 mg/dL, υποδηλώνει νόσο του Wilson. Η νόσος αυτή έχει ως αποτέλεσμα χαλκός να συσσωρεύεται στο ήπαρ και τον εγκέφαλο, με νευροψυχιατρικές εκδηλώσεις. Παντελής έλλειψη σερούλοπλασμίνης βρίσκεται σε μία σπάνια γενετική διαταραχή, κατά την οποία υπάρχει εναπόθεση χαλκού στο ήπαρ και το σπλήνα, με αποτέλεσμα εικόνα αναιμίας(Bakhautdin, 2012).

2.2.5. Απτοσφαιρίνη & A2 μακροσφαιρίνη

Η α2 σφαιρίνη αυτή, όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, είναι πρωτεΐνη οξείας φάσης. Συνεπώς η αύξησή της οδηγεί στο συμπέρασμα μιας υπάρχουσας φλεγμονής. Αυξημένη μπορεί να βρεθεί και σε περιπτώσεις νεφρωσικού συνδρόμου ή σε θεραπεία με κορτικοστεροειδή. Η απτοσφαιρίνη δεσμεύει την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη, κατά τη διάρκεια ενδαγγειακής αιμόλυσης. Αυτή είναι και η κλινική της σημασία. Βρίσκεται μειωμένη παρουσία κάποιας αιμολυτικής νόσου (αιμολυτική αναιμία), αλλά και στην αναποτελεσματική ερυθροποίηση. Η απτοσφαιρίνη μαζί με την α2 μακροσφαιρίνη, χρησιμοποιούνται ερευνητικά ως βιοδείκτες, για τη διάγνωση και την πρόγνωση, έπειτα από προσβολή με το μυκοβακτηρίδιο της πνευμονίας(Barat, 2015).

Η α2 μακροσφαιρίνη, όπως και η α1 αντιθρυψίνη, είναι φυσικός αναστολέας πρωτεασών. Η κλινική χρησιμότητα της πρωτεΐνης αυτής βρίσκεται στη διάγνωση της παγκρεατίτιδας και του νεφρωσικού συνδρόμου. (William Marshall,et.al 2008)

Στο νεφρωσικό σύνδρομο, η συγκέντρωσή της βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα. Επιπρόσθετα, αυξημένη βρίσκεται στην κύηση, τη λήψη αντισυλληπτικών, το διαβήτη και στην κίρρωση του ήπατος. η εκτίμηση της παγκρεατίτιδας καθορίζεται με τη μείωση α2 μακροσφαιρίνης. Το μέγεθος της μείωσης, καθορίζει και τη σοβαρότητα της νόσου. Επίσης σε κάποιες σοβαρές χειρουργικές επεμβάσεις ή σε σφαιμία τα επίπεδά της είναι χαμηλά.

2.2.6. C – αντιδρώσα πρωτεΐνη

Θεωρείται αμυντική πρωτεΐνη, καθώς είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και προάγει τη δράση των φαγοκυττάρων. Παράλληλα,

χρησιμοποιείται στο διαχωρισμό φλεγμονωδών ή μη νόσων και την πρόγνωση μίας παθολογικής κατάστασης. Η ΤΚΕ (Ταχύτητα Καθίζησης Ερυθρών), επίσης χρησιμοποιείται στη διάγνωση κάποιας φλεγμονώδους απάντησης του οργανισμού, όμως η μέτρηση επιπέδων της CRP φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητη και ακριβής τεχνική. Μικρή αύξηση της c-αντιδρώσας πρωτεΐνης, που δεν οφείλεται σε οξεία αίτια, έχει προταθεί ως δείκτης καρδιαγγειακού κινδύνου. Η συγκέντρωση της δεν μεταβάλλεται σε όλες τις φλεγμονές. Στην ελκώδη κολίτιδα, σε ιογενείς λοιμώξεις και στον Συστηματικό Ερυθρηματώδη Λύκο, που είναι μία αυτοάνοση νόσος, παραμένει σε φυσιολογικά επίπεδα. Αύξηση αυτής παρατηρείται περίπου 6 ώρες μετά την προσβολή του οργανισμού. Τα αίτια της παρακείμενης αύξησης είναι κάποια συγγενής ή επίκτητη φλεγμονώδης νόσος, τραύματα, ιστική νέκρωση (όπως συμβαίνει σε ένα έμφραγμα του μυοκαρδίου και την οξεία παγκρεατίτιδα) και σε νεοπλασίες (λέμφωμα και λευχαιμίες). Εξίσου αξιοσημείωτη κλινική χρησιμότητα, είναι και η παρακολούθηση ασθενών με νόσο Crohn ή ρευματοειδής αρθρίτιδα.

2.2.7. Γ' σφαιρίνες – ανοσοσφαιρίνες

Οι ανοσοσφαιρίνες ή αλλιώς αντισώματα είναι πρωτεΐνες, οι οποίες αναγνωρίζουν και δεσμεύουν ξένες ουσίες που εισβάλλουν στον οργανισμό. Παράγονται ως απάντηση του οργανισμού στην είσοδο μιας ξένης, προς αυτόν, ουσίας. Οι γ-σφαιρίνες, φυσιολογικά, καθυστερούν να παραχθούν στο έμβρυο, έτσι υπάρχει μια φυσιολογική υπογαμμασφαιριναιμία. Υπάρχουν δύο περιπτώσεις υπογαμμασφαιριναιμίας. Η πρώτη, οφείλεται σε κληρονομική ανεπάρκεια ανοσοσφαιρινών και η δεύτερη σε επίκτητη. Στην χ-φυλοσύνδετη αγαμμασφαιριναιμία υπάρχει παντελής έλλειψη ανοσοσφαιρινών, που οδηγεί σε μηδενική προστασία των ατόμων από λοιμώξεις,. Σε αυτά τα άτομα υπάρχουν πρόδρομα Β-λεμφοκύτταρα, όμως καθίστανται αδύνατο να ωριμάσουν (νόσος Bruton).

Οι επίκτητες υπογαμμασφαιριναιμίες μπορούν να δημιουργηθούν από το νεφρωσικό σύνδρομο, από φάρμακα, από αυξημένο καταβολισμό πρωτεϊνών, αλλά και να είναι απόρροια μιας αιματολογικής κακοήθειας. Στο πολλαπλό μυέλωμα, τη νόσο Hodgkin και ορισμένες μορφές λευχαιμιών, οι ανοσοσφαιρίνες είναι πιθανό να παρουσιάσουν σημαντική μείωση.

Η δυσγαμμασφαιριναιμία είναι νόσος στην οποία υπάρχει μερική βλάβη σε μια ή δύο ανοσοσφαιρίνες και όχι σε όλες(William Marshall,et.al 2008).

Σε όλους τους οργανισμούς όταν υπάρχει κάποια λοίμωξη, χρόνια ή οξεία, υπάρχει αύξηση των αντισωμάτων, με σκοπό να καταπολεμήσουν το ξένο σώμα. Αυτή η αύξηση ονομάζεται υπεργαμμασφαιριναιμία. Ωστόσο, μία υπέρμετρη αύξηση οδηγεί στο συμπέρασμα μιας υποβόσκουσας παθολογίας. Άλλος ένας λόγος υπέρμετρης αύξησης αντισωμάτων είναι οι αυτοάνοσες νόσοι. Σε αυτές, ο οργανισμός αναγνωρίζει τους ιστούς του ως ξένα σώματα και δημιουργεί αντισώματα για να τους καταστρέψει. Επίσης σε χρόνιες ηπατοπάθειες, αυτοάνοσης αιτιολογίας, αυξάνονται οι γ-σφαιρίνες. Στον πίνακα 1 παρακάτω, δίνονται τα ποσοστά των πρωτεϊνών στο αίμα που έχουν αναλυθεί προηγουμένως.

| Πρωτεΐνες ορού | | Όργανο σύνθεσης | Ποσοστό % |
|--------------------------------|--|-----------------|--------------|
| Αλβουμίνη (λευκωματίνη) | Ρύθμιση ωσμωτικής πίεσης στο πλάσμα μεταφορά μορίων π.χ. χολερυθρίνης | ήπαρ | 52-65% |
| α1 σφαιρίνες | α1 αντιτρυψίνη (90% των α1 σφαιρινών) (αναστολέας πρωτεασών) α1 φετοπρωτεΐνη (κύρια πρωτεΐνη πλάσματος εμβρύων) | ήπαρ | 2,5-5,0 % |
| α2 σφαιρίνες | Σερουλοπλασμίνη (10% των α2 σφαιρινών) (μεταφορά χαλκού) α2 μακροσφαιρίνη (33% των α2 σφαιρινών) (αναστολέας πρωτεασών) Απτοσφαιρίνη (33% των α2 σφαιρινών) (σύνδεση με αιμοσφαιρίνη) | ήπαρ | 7,0 – 13,0 % |
| β σφαιρίνες | Αιμοπεξίνη (σύνδεση με αίμη) Τρανσφερίνη (μεταφορά σιδήρου) Συμπλήρωμα C3, C4 (λύση μικροοργανισμών, προαγωγή φαγοκυττάρωσης) C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (πρωτεΐνη οξείας φάσης) | ήπαρ | 8,0 – 14,0 % |
| γ σφαιρίνες | IgG, IgA, IgM, IgD, IgE | ήπαρ | 12 – 22 % |

Πίνακας 1: Ποσοστά πρωτεϊνών αίματος και όργανα σύνθεσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.

3.1. Αναφορά μεθόδων προσδιορισμού πρωτεϊνών ορού

Η υπερομάδα των πρωτεϊνών, αποτελείται από πρωτεΐνες, ένζυμα, ορμόνες, δομικά μόρια, μεταφορικές πρωτεΐνες και αντισώματα. Αποτελεί το αφθονότερο υλικό του οργανισμού. Για το λόγο αυτό υπήρξε η ανάγκη εύρεσης τεχνικών, που να μπορούν να μετρούν και να αναλύουν την ποσότητά τους στον οργανισμό. Υπάρχουν πολλές τεχνικές, οι οποίες διακρίνονται για την ειδικότητα και την ευαισθησία τους, όπως είναι η ηλεκτροφόρηση. Ωστόσο και άλλες τεχνικές χρησιμοποιούνται ευρέως από τα εργαστήρια. Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής, για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών, κρίνεται από τα χαρακτηριστικά αυτών που θέλουμε να ανιχνεύσουμε. Το μοριακό βάρος, το ισοηλεκτρικό σημείο, η πολυπλοκότητα του δείγματος και οι οξεοβασικές ιδιότητες, είναι παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη, για την επιλογή της κατάλληλης τεχνικής.

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών μπορεί να επιτευχθεί σε τρία επίπεδα: στον ποσοτικό προσδιορισμό της συνολικής πρωτεΐνης, στον προσδιορισμό των επιπέδων της δράσης μιας πρωτεΐνης και στον προσδιορισμό μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Για τις παραπάνω προσεγγίσεις, υπάρχει πλήθος μεθόδων, κάθε μία από τις οποίες διακρίνεται από διαφορετική ευαισθησία, ειδικότητα, αλλά και κόστος. Η αναλυτική ευαισθησία ή αλλιώς το όριο ανίχνευσης, το οποίο χαρακτηρίζει κάθε μέθοδο, αναφέρεται στην ελάχιστη συγκέντρωση ενός βιομορίου, που μπορεί να ανιχνευτεί αξιόπιστα από τη εκάστοτε μέθοδο. Συνεπώς, μέθοδοι με υψηλή ευαισθησία προτιμώνται για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών, αλλά και κάποιων ειδικών βιομορίων, όπως είναι τα αντισώματα. Πρωτεΐνες με μικρό μοριακό βάρος, ανιχνεύονται και προσδιορίζονται, συνήθως με χρωματογραφικές μεθόδους. Η χρωματογραφία διακρίνεται σε τρεις υποκατηγορίες. Τη χρωματογραφία συγγένειας, ιοντοανταλλαγής και τη χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή.

3.2. Οι χρωματογραφικές & άλλες μέθοδοι μέτρησης

Οι χρωματογραφικές μέθοδοι γενικά, χρησιμοποιούν μια κινητή και μια στατική φάση και για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών εκμεταλλεύονται τις διαφορές

τους, ως προς το ισοηλεκτρικό τους σημείο και τις οξεοβασικές ιδιότητες του δείγματος. Από τις χρωματογραφικές μεθόδους, αυτή της ιοντοανταλλαγής είναι η πιο διαδεδομένη. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην έλξη μεταξύ αντίθετα φορτισμένων σωματιδίων και εφαρμόζεται σε ιόντα ή ενώσεις, που ιονίζονται, όπως τα οξέα και οι βάσεις, ή σε ενώσεις που αντιδρούν με ιοντικές ομάδες, όπως είναι τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες. Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής χρησιμοποιείται για την υψηλή αναλυτική της ικανότητα, καθώς και το χαμηλό κόστος των υλικών της (Πουλάς, 2015). Επίσης, καλό θα ήταν να αναφερθούν και η υγρή, με την αέρια χρωματογραφία. Η χρωματογραφία υψηλής απόδοσης-πίεσης (HPLC), είναι μια εξελιγμένη μορφή υγρής χρωματογραφίας, που χρησιμοποιείται ευρέως. Η κλινική χρησιμότητά της έγκειται στον προσδιορισμό των επιπέδων ενός φαρμάκου, για τον καθορισμό του θεραπευτικού εύρους, καθώς και την τοξικολογική ανάλυση. Χρησιμοποιείται εκτενέστερα από την ιατροδικαστική και εγκληματολογική έρευνα.

Η μέθοδος της φασματοφωτομετρίας χρησιμοποιείται για τον ποιοτικό, αλλά και τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών. Βασίζεται στην αρχή ανάκλασης του φωτός μέσα από ένα πρίσμα και παρακολουθείται η μεταβολή της συγκέντρωσης έγχρωμων ουσιών. Ωστόσο, άχρωμες ουσίες μπορούν να ανιχνευτούν με τη σύζευξή τους με χρωμογόνες ουσίες. Η παρακολούθηση της ποσοτικής μεταβολής της συγκέντρωσης μιας ουσίας, γίνεται με την κατασκευή πρότυπης καμπύλης. Η πιο γενική μέθοδος είναι η μέθοδος της διουρίας, όπου ανιχνεύεται ποσοτικά η συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών. Σε αυτή τη μέθοδο, ιόντα χαλκού αντιδρούν με τις πρωτεΐνες και ανιχνεύεται ιώδες χρώμα, παραγόμενο από τη σύζευξη αυτή.

Υπάρχει και μία πιο ειδική χρωματομετρική μέθοδος, με την προσθήκη πράσινου της βρωμοκρεζόλης, το οποίο αντιδρά επιλεκτικά με την αλβουμίνη και σχηματίζεται πράσινο σύμπλοκο. Στις χρωματομετρικές μεθόδους περιλαμβάνονται και η μέθοδος Bradford, με τη μέθοδο ξανθοπρωτεΐνης, οι οποίες δίνουν ως αποτέλεσμα έγχρωμο φως, το οποίο ανιχνεύεται σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Μία μέθοδος εκλογής για δείγματα με έντονη θολερότητα και παρουσία μεγάλου μοριακού βάρους σωματιδίων, είναι η θολωσιμετρία. Βασίζεται στη σκέδαση του φωτός, όταν διέρχεται από εναιώρημα, όπου μετράται η ελάττωση της έντασής του

σε φασματοφωτόμετρο. Αποτελεί μέθοδο εκλογής για κύτταρα και ανοσοσυμπλέγματα.

Η ανοσοθολωσιμετρία, ειδικά, όπως και η θολωσιμετρία μετρά τη μείωση της έντασης του φωτός, όμως σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιούνται ειδικά αντισώματα έναντι του αναλύτη, ώστε να σχηματίζονται συσσωματώματα. Η μέθοδος αυτή προσδιορίζει τη συγκέντρωση της α1 αντιθρυψίνης, της σερουλοπλασμίνης, της φεριτίνης, της CRP, της β2 μικροσφαιρίνης, της τρανσφερίνης και της απτοσφαιρίνης.

Η νεφελομετρία χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών και είναι μία πιο ειδική μέθοδος από τη θολωσιμετρία. Η διαφορά της από τη θολωσιμετρία, βρίσκεται στη γωνία από την οποία παρατηρείται το σκεδαζόμενο φως (90°), όταν περνά μέσα από ένα εναιώρημα.

Στις μεθόδους για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών ανήκει και η φθορισμομετρία. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη μελέτη της αλλαγής, στη διαμόρφωση, της δομής των πρωτεϊνών που περιέχουν τα αμινοξέα τρυπτοφάνη και τυροσίνη. Τα συγκεκριμένα αμινοξέα έχουν την τάση να φθορίζουν, όταν πέσουν πάνω τους ακτίνες με συγκεκριμένο μήκος κύματος. Άλλες αξιοσημείωτες και ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για τον προσδιορισμό ειδικών πρωτεϊνών, είναι η ELISA, η RIA και η ανοσοκαθήλωση.

Η ELISA (EnzymeLinkedImmunoSorbentAssay) είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και ειδική τεχνική, για τον εντοπισμό και ποσοτικό προσδιορισμό βιομορίων, κυρίως πρωτεϊνικής φύσεως. Θεωρείται ασφαλέστερη μέθοδος από τη RIA. Η RIA (RadioImmunoAssay), είναι μία ανοσοχημική μέθοδος, ευαίσθητη, που χρησιμοποιείται για μέτρηση και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνικών αντιγόνων χαμηλής συγκέντρωσης. Η μέτρηση πραγματοποιείται έπειτα από σήμανση με I (Ιώδιο).

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται σήμερα από τους κλινικούς, καθώς και τους εργαστηριακούς είναι η ηλεκτροφόρηση. Υπάρχουν διάφοροι τύποι, όπως η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση και η ανοσοηλεκτροφόρηση. Αναλυτικά θα εξετάσουμε την τριχοειδική ηλεκτροφόρηση στα κεφάλαια που θα ακολουθήσουν και τους παράγοντες, που συμβάλλουν στην ηλεκτροφορητική ικανότητα των πρωτεϊνών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.

4.1. Ιστορική αναδρομή ηλεκτροφόρησης & διαφορές με την τριχοειδή Η/Φ

Η ιστορία της ηλεκτροφόρησης ξεκινά από πολύ παλιά. Μόλις το 1930 ο Tiselius με το βοηθό του ξεκινούν το διαχωρισμό των πρωτεϊνών και βρίσκουν όμοια στοιχεία μεταξύ κάποιων πρωτεϊνών του ορού. Το 1937 ο Tiselius ανέπτυξε μία αρχή για την ηλεκτροφόρηση κολλοειδών ενώσεων, η οποία και δημοσιεύτηκε σε άρθρο του. Την ίδια χρονιά μετονομάστηκαν και οι σφαιρίνες σε άλφα, βήτα και γάμμα.

Μετέπειτα ακολούθησαν αρκετές ανακαλύψεις. Το 1939 βρέθηκαν οι ιδιότητες των αντισωμάτων. Η μέθοδος του Tiselius διαδόθηκε και χρησιμοποιήθηκε για πολλά χρόνια, ώσπου εφηύραν τις ζώνες ηλεκτροφόρησης το 1951, όπου χρησιμοποιούσαν φίλτρα χαρτιού ή γέλη ως βοηθητικό μέσο. Μετά τη δεκαετία του 1960, εξειδικευμένες τεχνικές της ηλεκτροφόρησης με gel άνοιξαν το δρόμο στη μοριακή βιολογία και έγιναν η βάση για μία μεγάλη ποικιλία βιοχημικών μεθόδων, όπως είναι το "αποτύπωμα" των πρωτεϊνών και η αλληλουχία του γενετικού υλικού (DNAsequencing). Το 1961 δόθηκε ο όρος μονοκλωνική γαμμαπάθεια από τον Waldenstrom και ο διαχωρισμός της από την πολυκλωνική.

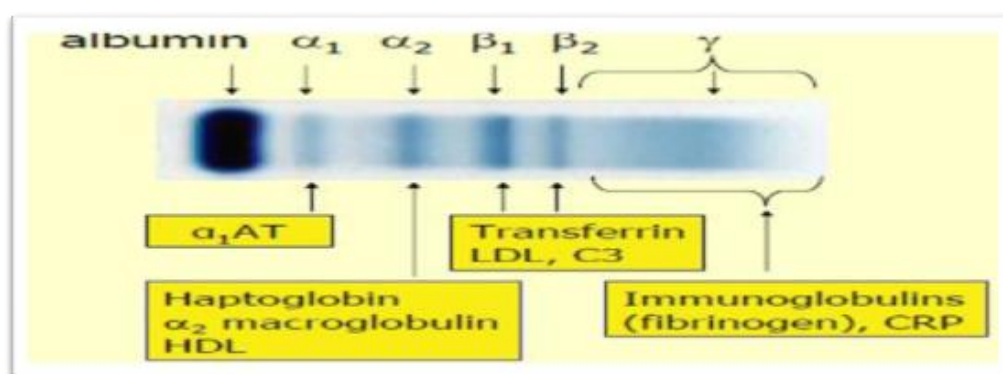
Ως ηλεκτροφόρηση ορίζεται το φαινόμενο της κίνησης χημικών ενώσεων, κυρίως πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων, πάνω σε ένα πήκτωμα (gel), υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο φορτίο των μορίων που υπόκειται να διαχωριστούν. Τα θετικά φορτισμένα σωματίδια κατευθύνονται προς την κάθοδο, η οποία είναι αρνητικά φορτισμένη, ενώ αντίθετα τα αρνητικά φορτισμένα σωματίδια κινούνται προς την άνοδο. Η ηλεκτροφόρηση πλέον χρησιμοποιείται ως επί το πλείστο για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών που απαρτίζουν το ολικό λεύκωμα του ορού, του πλάσματος, του ολικού αίματος, των ούρων και του εγκεφαλονωτιαίου υγρού, καθώς και την κατάταξή τους σε κατηγορίες.

Για να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών χρειάζεται κάποιο μέσο ηλεκτροφόρησης και στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιούνται gel ή αλλιώς πηκτώματα. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται μπορεί να είναι η οξική κυτταρίνη, η πηκτή αγαρόζης, η πηκτή αμύλου, η πηκτή πολυακρυλαμιδίου

και το διηθητικό χαρτί Whatman. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών, ενώ η πηκτή αγαρόζης για τα νουκλεϊκά οξέα.

Οι πρωτεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες, έτσι κινούνται προς την άνοδο. Μόλις ο διαχωρισμός επιτύχει, τα διαχωρισμένα μόρια χρωματίζονται, αφού μονιμοποιηθούν, με τη βοήθεια διάφορων χρωστικών. Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται κυρίως, είναι η Amidoblack, η PonceauS, η Coomassie Brilliant Blue, η Bromophenol Blue και η Nigrosin. Οι συγκεκριμένες χρωστικές έχουν εξειδίκευση στη χρώση των πρωτεϊνών.

Με τη χρώση των πρωτεϊνών αρχίζουν και σχηματίζονται πάνω στο πήκτωμα οι ζώνες ηλεκτροφόρησης. Οι ζώνες αυτές καθορίζουν τις ομάδες των πρωτεϊνών που διαχωρίζονται και είναι οι: αλβουμίνη, α_1 σφαιρίνες, α_2 σφαιρίνες, β_1 σφαιρίνες, β_2 σφαιρίνες και γ σφαιρίνες. Για την ποσοτική εκτίμηση της ηλεκτροφόρησης, τα χρωματισμένα τμήματα της πηκτής αναλύονται πυκνομετρικά και παρουσιάζονται σε γράφημα. Σημειώνεται πως το πυκνόμετρο είναι ένα ειδικά σχεδιασμένο χρωματόμετρο, το οποίο σαρώνει γέλες και μεμβράνες οξικής κυτταρίνης και ποσοτικοποιεί τις χρωματισμένες πρωτεΐνες, μετρώντας την πυκνότητα του χρώματος των διαφόρων κλασμάτων της ηλεκτροφόρησης.

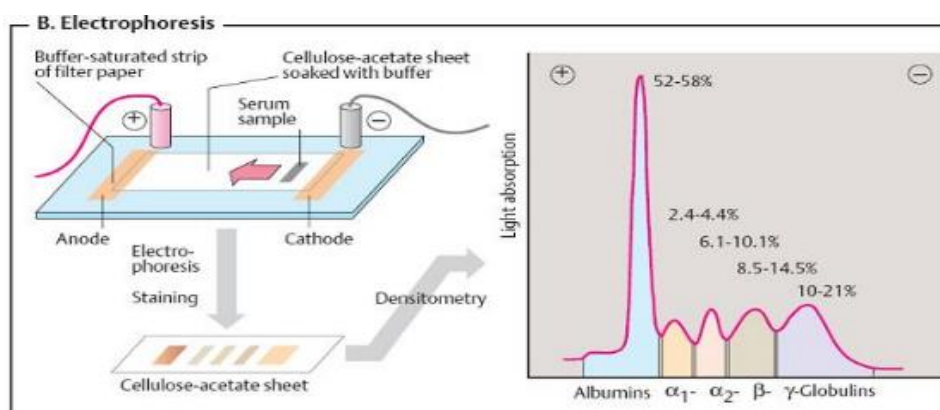


Εικόνα 2: Απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή έπειτα από χρώση
Πηγή: Μιχαήλ (2015)

Οι διαφορές της ηλεκτροφόρησης με την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση αναφέρονται κυρίως στα μέσα διαχωρισμού που χρησιμοποιούνται, στον τόπο διαξαγωγής, καθώς και στο επίπεδο του άξονα που διαδραματίζονται. Η ηλεκτροφόρηση πηκτής είναι μια διαδικασία που διαχωρίζει τα μόρια (πρωτεΐνες)

σε ένα κατακόρυφο ή οριζόντιο άξονα, χρησιμοποιώντας ως μέσο διαχωρισμού μία γέλη ή πηκτή. Στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ο διαχωρισμός γίνεται μέσα σε τριχοειδή σωλήνα, χρησιμοποιώντας υγρά πολυμερή ως μέσα διαχωρισμού, όπως είναι η υδροξυαιθυλοκυτταρίνη. Σημαντική διαφορά των δύο αυτών ηλεκτροφορήσεων είναι η ανάλυσή τους. Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση χαρακτηρίζεται από υψηλή ανάλυση, ενώ η ηλεκτροφόρηση πηκτής από χαμηλή ανάλυση.

Διαφορά φαίνεται πως παρατηρείται και στον δείκτη επιφάνειας προς τον όγκο. Ο λόγος της επιφάνειας προς τον όγκο είναι υψηλός στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση. Αντίθετα στην ηλεκτροφόρηση πηκτής είναι χαμηλός. Τέλος οι τεχνικές ανίχνευσης διαφέρουν σε κάθε είδος ηλεκτροφόρησης και έτσι στην ηλεκτροφόρηση πηκτής η ανίχνευση γίνεται μέσω διαφραγμάτων υπεριωδών ακτινών, ενώ στην τριχοειδή με φασματοφωτομετρικούς αυτόματους ανιχνευτές.



Εικόνα 3: Απεικόνιση της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης και της πυκνομετρίας

Πηγή: Μιχαήλ (2015)

4.2. Βασικές αρχές ηλεκτροφόρησης πηκτής

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία μέθοδο διαχωρισμού βιομορίων, όπως το DNA και οι πρωτεΐνες. Όταν τα μόρια αυτά βρεθούν σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, στο εσωτερικό πηκτών ή διαλυμάτων, εξαιτίας του ηλεκτρικού τους φορτίου, μετακινούνται. Διαφορετικά μόρια κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες και έτσι τα συστατικά ενός μίγματος διαχωρίζονται. Η κινητικότητα των φορτισμένων μορίων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το καθαρό τους φορτίο, το μέγεθος των

σωματιδίων, το pH, το σχήμα και την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου. Ωστόσο η τεχνική της ηλεκτροφόρησης επηρεάζεται και αυτή από πολλές παραμέτρους. Η θερμοκρασία, η ένταση του πεδίου, το pH, η ιοντική ισχύς και η σύσταση, ο χρόνος και το υπόστρωμα είναι κάποιες από αυτές (ΝΤΑΛΑΜΑΓΚΑ, 2015).

Οι βασικές αρχές της ηλεκτροφόρησης πήκτης υπόκεινται στην προετοιμασία του δείγματος, στην επιλογή του κατάλληλου πηκτώματος, στην επιλογή της κατάλληλης χρωστικής και τέλος στην ποσοτικοποίηση των χρωματισμένων, διαχωρισμένων πρωτεϊνών με τη μέθοδο της πυκνομετρίας. Αρχικά πριν την τοποθέτηση του δείγματος στο ηλεκτρικό πεδίο, αραιώνεται με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε η κατεύθυνση της κίνησης να εξαρτάται αποκλειστικά από το μοριακό βάρος και όχι από τους υπόλοιπους παράγοντες που αναφέρθηκαν. Τοποθετείται στο ηλεκτρικό πεδίο το δείγμα του βιολογικού υγρού και προκαλείται έτσι η κίνηση των φορτισμένων σωματιδίων προς την άνοδο ή την κάθοδο, ανάλογα με το φορτίο τους. Οι πρωτεΐνες κινούνται προς την άνοδο, καθώς το φορτίο τους είναι αρνητικό. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες συσσωρεύονται, σε μεγάλες συγκεντρώσεις, σε ευδιάκριτες ζώνες, οι οποίες χρωματίζονται. Η πυκνότητα αυτών των ζωνών μετράται με το πυκνόμετρο και προάγεται σε γράφημα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.

5.1. Ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές

Τα τελευταία χρόνια η ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές έχει αναδειχθεί ως ένα πανίσχυρο εργαλείο για το διαχωρισμό πρωτεϊνών και άλλων βιοπολυμερών, χωρίς να αναφέρεται στα β κύτταρα μόνο, αντικατοπτρίζει και τις φλεγμονώδεις απαντήσεις του οργανισμού. Στην κλινική χημεία, η κλασσική διαδικασία ηλεκτροφόρησης γίνεται με τζέλ αγαρόζης. Στην ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές, εφαρμόζεται υψηλή τάση σε ένα λεπτό σωληνάριο εσωτερικής διαμέτρου 0,02 έως 0,1 mm, επιτρέποντας έτσι τον γρήγορο και αποτελεσματικό διαχωρισμό των φορτισμένων μορίων ή συμπλόκων. Η πιθανότητα της διαγνωστικής κλινικής χρησιμότητας της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης, εμφανίστηκε στις αρχές της δεκαετίας του '90. Την εποχή αυτή και μέχρι και τα μέσα της δεκαετίας, διάφορες πατέντες κυκλοφόρησαν, όσον αφορά το διαχωρισμό των πρωτεϊνών του ορού, με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές. Γενικά, αυτές οι αναφορές πιστοποιούσαν πως αυτό το είδος μεθόδου ήταν ικανό να διαχωρίσει τις πρωτεΐνες και τη συνέκριναν με την ηλεκτροφόρηση σε τζέλ αγαρόζης.

Στα τέλη της δεκαετίας, το σύστημα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης από την Καλιφόρνια των Ηνωμένων Πολιτειών, έγινε ευρύτερα διαδεδομένο. Είναι ένα πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα, αφοσιωμένο στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών ορού. Σχετικά πρόσφατα, το 2001, ακόμη ένα σύστημα εισήλθε στην αγορά, το Sebia Capillarys από τη Γαλλία, το οποίο είναι παρεμφερές με το πρώτο. Και στα δύο συστήματα, οι κατασκευαστές παρείχαν έτοιμο ρυθμιστικό διάλυμα. Τα συστήματα αυτά εξαπλώθηκαν ευρύτερα, καθώς ανταποκρίνονταν στο φόρτο εργαστηριακών εξετάσεων, που χρειάζονταν καθημερινά (Bossuyt, 2003). Τα συστήματα που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών, προσφέρουν υψηλή ακρίβεια, γρήγορα αποτελέσματα, βελτιωμένη ευαισθησία στην ανίχνευση των παραπρωτεϊνών, μικρές ποσότητες δείγματος, πλήρης αυτοματοποίηση και υψηλή απόδοση. Αυτά είναι και τα πλεονεκτήματα της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης. Ωστόσο η μέθοδος αυτή εξαρτάται από κάποιους παράγοντες, οι οποίοι συνθέτουν και τις αρχές της μεθόδου.

Για όλα αυτά που έχουμε αναφέρει για την ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές, μπορούμε να συμπεράνουμε πως είναι ένα χρήσιμο εργαλείο, που μας βοηθά στην αυτοματοποίηση των χρονοβόρων εξετάσεων, παρουσιάζοντας επιπρόσθετα, καλύτερα αποτελέσματα από τις, μέχρι στιγμής, μεθοδολογίες. Επίσης, έχει χαμηλό κόστος σε αναλώσιμα, σε σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνικές.

Η ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές περιλαμβάνει έξι διαφορετικούς τύπους διαχωρισμού, την ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς ζώνης (CapillaryZoneElectrophoresis), την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση πηκτής (CapillaryGelElectrophoresis), την μικροκυτταρική ηλεκτροκινητική τριχοειδής χρωματογραφία, την τριχοειδή ηλεκτροχρωματογραφία, την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης και τέλος, την CIP (CapillaryIsotachopheresis). Από όλες τις μεθόδους που αναφέραμε, η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς ζώνης είναι αυτή που χρησιμοποιείται συχνά, καθώς θεωρείται πιο απλή μέθοδος και γρήγορη (Sebia,2017) .Τέλος, στην ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα βιολογικά υγρά ως δείγματα, όπως ούρα, κύτταρα, δείγματα βιοψίας κλπ. Θεωρείται η πιο σύγχρονη τεχνική διαχωρισμού, καθώς δεν αναφέρεται μόνο σε πρωτεΐνες, αλλά και γενετικό υλικό, πεπτίδια, ορμόνες, ένζυμα-ισοένζυμα, αιμοσφαιρίνες (Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη), υδατάνθρακες, ηλεκτρολύτες, ακόμη και φάρμακα. Συνεπώς, η χρήση της δεν περιορίζεται σε μία κατηγορία βιομορίων.

5.2. Αρχές τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε τριχοειδές βασίζεται σε δύο αρχές: τη διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα των μορίων μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο και την ηλεκτρο-ωσμωτική ροή του διαλύτη μέσω του τριχοειδούς. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα αναφέρεται στις διαφορές στο φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα, που χαρακτηρίζουν κάθε μόριο. Η ταχύτητα με την οποία κινούνται τα μόρια, κάτω από συγκεκριμένη επίδραση ηλεκτρικού πεδίου και pH είναι χαρακτηριστική. Έτσι μπορούμε να συμπεράνουμε πως η ηλεκτροφορητική κινητικότητα εξαρτάται από τη σχέση φορτίου προς τη διάμετρο, η οποία είναι διαφορετική για τα διαφορετικά είδη μορίων ενός διαλύματος. Ως ηλεκτρο-ωσμωτική ροή, χαρακτηρίζεται η κίνηση ενός διαλύματος σε ένα τριχοειδές, υπό

την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτρο-ωσμωτική ροή είναι μία βασική παράμετρος για τη λειτουργία της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (Κολιός, 2016). Ένα φαινόμενο, που εκτυλίσσεται στην ηλεκτροφόρηση και κατέχει καίρια σημασία για τα αποτελέσματα είναι το φαινόμενο Joule. Το φαινόμενο αυτό συγκαταλέγεται στα θερμικά φαινόμενα, καθώς οδηγεί στην παραγωγή θερμότητας κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης.

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διεύρυνση των κορυφών, εξαιτίας της διάχυσης των διαλυμένων ουσιών. Συνεπώς η απομάκρυνση αυτής της θερμότητας είναι κρίσιμη για την ανάλυση και τα αποτελέσματά της. Αύξηση του φαινομένου Joule μπορούμε να έχουμε σε τρεις καταστάσεις. Η αύξηση της ιοντικής ισχύος, οδηγεί σε μείωση της αλληλεπίδρασης με τα τοιχώματα του τριχοειδούς και οι κορυφές γίνονται οξύτερες. Αυξάνοντας την τάση, επίσης οξύνονται οι κορυφές.

Τέλος, με την αύξηση της εσωτερικής διαμέτρου του τριχοειδούς, αυξάνονται και τα όρια ανίχνευσης, η συλλογή κλασμάτων γίνεται απλούστερη, όμως αυξάνεται το θερμικό φαινόμενο Joule (Κολιός, 2016). Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια σύγχρονη τεχνική διαχωρισμού και ανάλυσης βιομορίων, με τα εξής χαρακτηριστικά HU, 1996):

1. Για το διαχωρισμό απαιτείται ρυθμιστικό διάλυμα και πραγματοποιείται σε τριχοειδές σωληνάριο.
2. Η μετακίνηση των μορίων εξαρτάται από το φορτίο και το μοριακό βάρος.
3. Η εσωτερική διάμετρος του σωλήνα κυμαίνεται μεταξύ 0,02-0,1 mm.
4. Χαρακτηριστικό της μεθόδου είναι η υψηλή τάση και το ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο.
5. Η ευαισθησία της τεχνικής αυξάνει με αύξηση της διαμέτρου του τριχοειδούς στη θέση ανίχνευσης, ή με την έκλυση των συστατικών που παρεμποδίζουν την ανάλυση.
6. Η ταχύτητα διαχωρισμού των μορίων επιτυγχάνεται σε μικρό διάστημα 10-15 λεπτών και σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμη πιο σύντομα.
7. Ο τριχοειδής σωλήνας είναι ικανός να χρησιμοποιηθεί εκ νέου, μετά το πέρας της ανάλυσης.

8. Η συγκεκριμένη τεχνική συνδυάζεται και με άλλες, όπως η PCR, HPLC (Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Ανάλυσης), GC (Αέρια Χρωματογραφία) κ.ά.
9. Τα συστατικά που διαχωρίζονται προσδιορίζονται μέσω ενός ανιχνευτή και καταγράφονται σε καμπύλη με τη μορφή κορυφών.

Ο διαχωρισμός, ωστόσο, των υπό μελέτη μορίων, καθορίζεται από κάποιους παράγοντες. Αρχικά, το μέγεθος, το σχήμα και το φορτίο του μορίου επηρεάζουν το διαχωρισμό του. Η διαφορά δυναμικού που σχηματίζεται στο ηλεκτρικό πεδίο από την ισχύ του, είναι ένας ακόμη καθοριστικός παράγοντας για την ηλεκτροφόρηση βιομορίων. Ωστόσο κάποια από τα χαρακτηριστικά του τριχοειδούς παίζουν σημαντικό ρόλο στην ηλεκτροφόρηση και το διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Η διάμετρος του σωληναρίου και οι φυσικές ιδιότητες του τριχοειδούς συγκαταλέγονται στα χαρακτηριστικά αυτά. Καθοριστικοί παράγοντες είναι επίσης, το ιξώδες και η ιονική ισχύς του διαλύματος ηλεκτροφόρησης. Τέλος, το φαινόμενο Joule φέρεται πως εμπλέκεται και στο διαχωρισμό των μορίων. Η θερμότητα αυτή που εκλύεται απαιτεί απομάκρυνση, ώστε να προκύψει σωστός διαχωρισμός και σωστά αποτελέσματα (Κολιός, 2016).

5.3. Στάδια τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης

Τα δείγματα στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση είναι αρκετά πυκνά και σχετίζονται με την εσωτερική διάμετρο του τριχοειδούς σωληναρίου. Το βασικό πλεονέκτημα άλλωστε στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση είναι ο μικρός όγκος δείγματος που απαιτείται για τη διενέργειά της. Γενικά, όσον αφορά την εισαγωγή δείγματος, ισχύει ο εξής κανόνας: το μήκος του εισαγόμενου δείγματος, δηλαδή το υγρό που ρέει στον τριχοειδή σωλήνα και αντιστοιχεί στο δείγμα και όχι στο υγρό του ηλεκτρολύτη, θα πρέπει να είναι μικρότερο από το συνολικό μήκος του τριχοειδούς από 1-2%. Η ποσοτική εισαγωγή του δείγματος μπορεί να επιτευχθεί με πολλές μεθόδους, ωστόσο δύο είναι οι πλέον χρησιμοποιούμενες: η υδροδυναμική και η ηλεκτροκινητική (Ζώτου, 2015b).

Η υδροδυναμική, η οποία αναφέρεται σε άσκηση πίεσης στο άκρο εισόδου του τριχοειδούς, είναι αυτή που χρησιμοποιείται εκτενέστερα. Ωστόσο, σε διαλύματα με μεγάλο ιξώδες ή πηκτώματα, προτιμάται η ηλεκτροκινητική έγχυση.

Το άκρο εισόδου του τριχοειδούς βρίσκεται στην πλευρά της ανόδου, ενώ το άκρο εξόδου στην πλευρά της καθόδου. Τα άκρα του τριχοειδούς τοποθετούνται σε δοχεία ηλεκτρολυτών με ηλεκτρόδια. Μέσα στο σωλήνα υπάρχει κατάλληλο ηλεκτροφορητικό υλικό. Η ανίχνευση της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης, συχνά παρομοιάζεται με την υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC), καθώς χρησιμοποιούνται παρόμοιες τεχνικές. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται είναι οι UV ανιχνευτές, το laser φθορισμού, η χημειοφωταύγεια και η MS (Φασματοφωτομετρία Μαζών). Ο φθορισμός, η UV ανίχνευση και η MS ανίχνευση είναι από τις πιο ευαίσθητες τεχνικές και δίνουν παράλληλα πληροφορίες και για άλλα χαρακτηριστικά. Το laser φθορισμού είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική, αλλά υψηλού κόστους. Τέλος, αφού τα κλάσματα ανιχνευτούν από τους ανιχνευτές, οι πληροφορίες συλλέγονται από ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη μορφή κορυφών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.

6.1. Εφαρμογές της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης

Στο προηγούμενο κεφάλαιο αναφερθήκαμε σε όλες τις μορφές ηλεκτροφόρησης. Οι κλινικές εφαρμογές των τύπων ηλεκτροφόρησης, καθορίζουν την καταλληλότερη επιλογή της μεθόδου για την προκείμενη ανάλυση. Στο παρόν κεφάλαιο, θα αναφερθούμε στις εφαρμογές όλων των μεθόδων, αλλά θα εστιάσουμε στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ζώνης (CapillaryZoneElectrophoresis).

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη ανάλυση με χρήση σε πολλούς διαφορετικούς τομείς, όπως είναι η κλινική χημεία, η μοριακή βιολογία, η φαρμακευτική βιομηχανία, η οργανική χημεία, η κλινική εγκληματολογία, τα φυτικά προϊόντα και οι διαχωρισμοί μορίων. Η εγκληματολογική εφαρμογή της ηλεκτροφόρησης αφορά την ανάλυση θραυσμάτων του γενετικού υλικού, την αλληλούχισή του, την ανάλυση των υπολειμμάτων από πυροβολισμούς, από φάρμακα ή ναρκωτικά, καθώς και εκρηκτικές ουσίες. Η ανάλυση θραυσμάτων είναι ένας εξαιρετικά σημαντικός τομέας για την ταυτοποίηση ενός ατόμου.

Η υψηλή ακρίβεια, η ικανότητα ανίχνευσης του φθορισμού που εκπέμπεται από διαφορετικές χρωστικές, οι αυτοματοποιημένες ηλεκτροφορητικές τεχνικές και το λογισμικό συλλογής δεδομένων, αποτελούν βασικούς παράγοντες της υιοθέτησης αυτής της μεθόδου από την εγκληματολογία και όχι μόνο, για την ανάλυση του γενετικού υλικού (Shewale JG, 2012). Πρόσφατα, η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση, έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον ως μία αρκετά υποσχόμενη τεχνική για το διαχωρισμό μεταλλικών ιόντων. Σημαντικές πρόοδοι προέκυψαν με βάση διάφορες βοηθητικές αρχές διαχωρισμού. Αυτές οφείλονται κυρίως σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ συμπλόκων, αναλυτών μετάλλων και πρόσθετων ηλεκτρολυτών, που μεταβάλλουν την εκλεκτικότητα διαχωρισμού σε ευρεία κλίμακα. Κατάλληλες προσεγγίσεις για το χειρισμό των διαφόρων μεταλλικών ειδών, των οργανομεταλλικών μορίων, των μεταλλικών κατιόντων και των συμπλόκων συζητούνται εκτενώς, με ιδιαίτερη προσοχή στις μεταβλητές του ηλεκτροφορητικού συστήματος, χρησιμοποιώντας επεξηγηματικά παραδείγματα (Malik AK, 2016).

Με την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση δεν αναλύονται μόνο οι γνωστές πρωτεΐνες, αλλά και διάφορα ιόντα. Επίσης είναι δυνατή η ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης και η ανίχνευση τυχόν μη φυσιολογικών αιμοσφαιρινών. Μία ιδιαίτερα χρήσιμη εφαρμογή είναι η ανοσοτυπία, δηλαδή ο χαρακτηρισμός μιας παθολογικής πρωτεΐνης ως μονοκλωνικής ή πολυκλωνικής. Επιπρόσθετα η διάγνωση χρόνιας κατάχρησης αλκοόλ είναι από μια από τις εφαρμογές της ηλεκτροφόρησης, καθώς ανιχνεύει την τρανφερίνη με έλλειψη υδατανθράκων.

Σημαντικό κομμάτι της χρήσης της είναι η διάγνωση νεοπλασματικών διαταραχών. Η έλλειψη ετεροζυγωτών, οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου και η ανάλυση μεταλλάξεων που σχετίζονται με όγκους, ανήκουν στις πολλαπλές κλινικές χρήσεις αυτής της μεθόδου. Τέλος, καλό να αναφερθεί είναι και η συμβολή της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης στη διάγνωση κληρονομικών ασθενειών, μολυσματικών νόσων και η ανάλυση του προγεννητικού ελέγχου.

Η μέθοδος της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες τεχνικές. Η κάθε τεχνική ειδικεύεται σε καθορισμένες κλινικές εφαρμογές (Petersen J, 2001): Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ζώνης (CZE), ανήκει στις περισσότερο χρησιμοποιούμενες τεχνικές και η χρήση της αφορά αναλύτες όπως

και ιόντα, φάρμακα και πρωτεϊνικά μόρια. Ο διαχωρισμός των μορίων αναφέρεται στη μετανάστευσή τους, σε διαφορετικές πυκνότητες του ηλεκτρικού πεδίου.

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση πηκτής (CapillaryGelElectrophoresis), είναι μέθοδος εκλογής για μόρια τα οποία διαφέρουν σε μέγεθος, αλλά όχι σε φορτίο, όπως τα μόρια DNA. Τα πρωτεϊνικά μόρια αποτελούνται από περισσότερο πολύπλοκα τμήματα από ότι το γενετικό υλικό. Για να μπορέσουν να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες ανά μέγεθος, είναι υποχρεωτικό να καλυφθεί το μητρικό φορτίο και να δημιουργηθεί μια ομοιόμορφη αναλογία φορτίου-μάζας.

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικού σημείου χρησιμοποιείται σε μόρια πρωτεϊνικά, τα οποία ανήκουν σε συγγενικό είδος. Παράδειγμα αποτελεί ο διαχωρισμός της αιμοσφαιρίνης, ο οποίος με τη συγκεκριμένη μέθοδο επιτυγχάνει τη δημιουργία πολλών τμημάτων (μπάντες). Άλλη εφαρμογή της είναι η εξέταση της κατανομής των υδατανθρακικών ισομορφών των γλυκοπρωτεϊνών. Η κατανομή αυτή αποτυπώνεται με τη μορφή κορυφών και όχι ζωνών.

Η μικκυλιακή ηλεκτροφόρηση (MicellarElectrophoresis) έχει κλινικές εφαρμογές στην ανίχνευση και το διαχωρισμό μικρού μεγέθους μορίων όπως είναι τα φάρμακα, τα φυτοφάρμακα και οι πρόσθετες ουσίες των τροφών, τα οποία δεν είναι φορτισμένα και θεωρούνται υδροφοβικά ώστε να αντιδράσουν και να διαχωριστούν. Επίσης, η μη υδατική ηλεκτροφόρηση είναι χρήσιμη όταν επρόκειτο να διαχωριστούν αναλύτες με ίδια αναλογία φορτίου-μάζας.

Οι ανοσοδοκιμασίες θεωρούνται χρήσιμο εργαλείο για την ανίχνευση, τη διάγνωση και τη θεραπεία ασθενειών. Αυτή η μέθοδος κάνει χρήση την εκλεκτικότητα και το δυνατό δεσμό των αντισωμάτων ως προς τους στόχους τους, συνδυάζοντας με αυτό τον τρόπο την παραδοσιακή ανοσοδοκιμασία με την ταχύτητα, την αποτελεσματικότητα και το μικρό όγκο δειγμάτων που απαιτεί η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Moser, 2013).

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ανοσοδοκιμασίας είναι μία μέθοδος με εφαρμογές σε πολλούς τομείς, όπως η ενδοκρινολογία, η φαρμακευτική ανάλυση, η ανάλυση των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων, η ογκολογία και η ανοσολογία. Αρχικά, με αυτή τη μέθοδο μπορούν να ανιχνευτούν ελάχιστες ποσότητες μιας ουσίας και το σημαντικό είναι πως απαιτούνται μικρής ποσότητας δείγματα. Για το λόγο αυτό φαίνεται να εφαρμόζεται στην ενδοκρινολογία, καθώς οι ορμόνες παράγονται σε

πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Η γλυκαγόνη, η ινσουλίνη, η θυροξίνη, η κορτιζόλη και διάφορες στεροειδείς ορμόνες είναι μερικά παραδείγματα της χρήσης της μεθόδου.

Στον τομέα της φαρμακευτικής, η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ανοσοδοκιμασίας, περιλαμβάνει την ανάπτυξη δοκιμασιών σχετικά με την εγκληματολογική έρευνα, την τοξικολογία, την παρακολούθηση της δράσης ενός θεραπευτικού φαρμάκου και τις δοκιμασίες διαλογής για φάρμακα κατάχρησης. Τα πλεονεκτήματά της είναι πολλά, από το μικρό όγκο δείγματος που απαιτεί, μέχρι την ταχύτητα και την αποτελεσματικότητά της (Moser, 2013).

Πρόσφατα, οι επιστήμονες φαίνεται να ενδιαφέρονται για μία ακόμη εφαρμογή των μεθόδων της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης, την ανάλυση τροφίμων. Αρκετά μόρια και ουσίες που υπάρχουν στις τροφές έχουν αναλυθεί με κάποια από τις μεθόδους της. Σε αυτά τα μόρια περιλαμβάνονται τα εξής: αμινοξέα, υδατάνθρακες, βιογενείς αμίνες, φαινόλες και πολυφαινόλες, συντηρητικά τροφών, λιπίδια, πεπτίδια, πρωτεΐνες, ετεροκυκλικές αμίνες, φυτοφάρμακα και χρωστικές ουσίες, υπολείμματα, τοξίνες, βιταμίνες, μικρά οργανικά και ανόργανα στοιχεία, καθώς και άλλες δευτερεύουσες ενώσεις. Σε δημοσίευση που αναρτήθηκε σχετικά πρόσφατα, αναφέρεται πως αυτή η στροφή για την ανάλυση των μορίων και των διαφόρων συστατικών της τροφής, έγινε για να κατανοηθούν ποιες ουσίες των τροφών καθίστανται επιβλαβείς και ποιες όχι. Από το Φεβρουάριο του 2015 μέχρι και σήμερα, ολόένα και καινούργιες δημοσιεύσεις κάνουν την εμφάνιση, γεγονός που οδηγεί στη δημιουργία ενός καινούργιου τομέα, αυτού της ανάλυσης τροφίμων (Foodomics) (Gerardo Álvarez, 2017). Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται εκτενέστερα σε αυτού του είδους την ανάλυση είναι η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση και η φασματοσκοπία μάζας (MS), ή ο συνδυασμός και των δύο.

Συμπερασματικά, η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται για τους ποσοτικούς προσδιορισμούς των πρωτεϊνών και των φαρμάκων. Ο προσδιορισμός αυτός απαιτεί τη συλλογή δειγμάτων. Οι πρωτεΐνες που αναλύονται μπορούν να προέρχονται από τον ορό του αίματος, από τα ούρα, από το εγκεφαλονωτιαίο και το πλευριτικό υγρό και είναι διαφόρων κατηγοριών, όπως λιποπρωτεΐνες, αιμοσφαιρίνες και τρανσφερρίνες. Πέρα όμως από την ανάλυση των πρωτεϊνών και των φαρμάκων, η χρήση της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης στη μοριακή διαγνωστική είναι σημαντική. Με την είσοδό της στην κλινική πρακτική, η ανίχνευση λοιμωδών

νοσημάτων επιτυγχάνεται ευκολότερα. Τέλος, εφαρμογές της αναφέρονται στην αιματολογία, την ογκολογία και τη γενετική.

6.2. Πλεονεκτήματα & μειονεκτήματα μεθόδου

Η ανάπτυξη της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης από πολλούς θεωρείται ως ένα βήμα εξέλιξης της υγρής χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης (HPLC). Ο συνδυασμός της με άλλες τεχνικές της προσδίδουν ένα ιδιαίτερο πλεονέκτημα. Ωστόσο πέρα από πλεονεκτήματα, κάθε τεχνική κρύβει και κάποια μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου κυμαίνονται ως εξής:

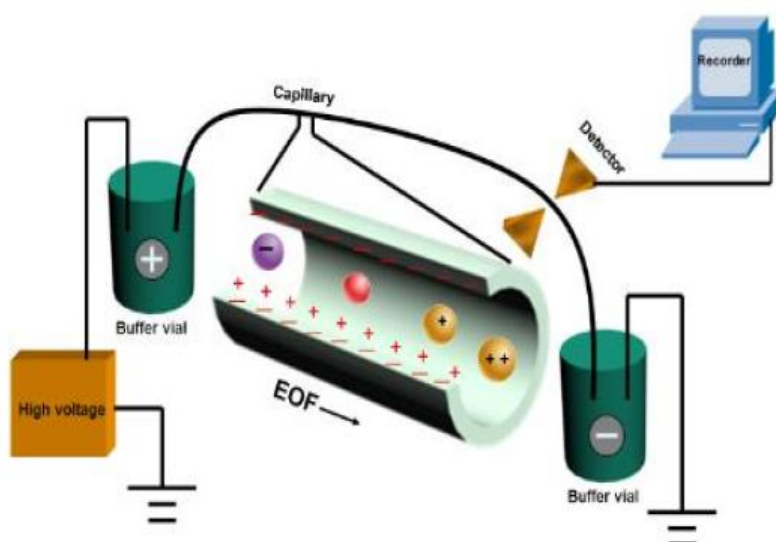
1. Η ευαισθησία και τα όρια ανάλυσης της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης.
2. Δεν είναι δυνατή η δημιουργία παρασκευαστικών διαχωρισμών κλίμακας
3. Μία ανώμαλη αιμοσφαιρίνη απαιτεί άλλα μέσα προσδιορισμού.
4. Τυχόν μετανάστευση της αιμοσφαιρίνης μπορεί να επιφέρει υπερεκτίμηση ή υποεκτίμηση των αποτελεσμάτων.
5. Τα δείγματα τα οποία είναι παλιά ή κακώς διατηρημένα, εμφανίζουν διάφορα προϊόντα αποικοδόμησης.
6. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις και οι μεγάλες ποσότητες είναι δύσκολες.

Η ύπαρξη των παραπάνω μειονεκτημάτων δε σημαίνει πως η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση καταργείται από τη λίστα των μεθόδων εκλογής για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών. Θεωρείται ως απλή, γρήγορη και αποτελεσματική τεχνική, με χαμηλό κόστος λειτουργίας. Είναι μια πλήρως αυτοματοποιημένη μέθοδος, γεγονός που την καθιστά εύκολη στο χειρισμό. Η χρήση της απαιτεί υδατικούς διαλύτες, με αποτέλεσμα να είναι φιλική προς το περιβάλλον. Όσον αφορά τη διαδικασία του διαχωρισμού των μορίων, θεωρείται υπέρμετρα αποτελεσματική, με δυνατότητα διαχωρισμού φορτισμένων και μη μορίων. Επίσης, η λειτουργία της υποστηρίζει διαφορετικούς μηχανισμούς για υψηλή ειδικότητα. Τέλος, σημαντικό πλεονέκτημα της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης είναι ο μικρός όγκος δείγματος που χρειάζεται για τη λειτουργία της (Kuhire, 2012).

Από τη στιγμή που η τεχνική της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης ήρθε στο προσκήνιο, περίπου το 1981, η εξέλιξή της δε σταμάτησε εκεί. Τα τελευταία χρόνια η ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων με τη μέθοδο της τριχοειδούς

ηλεκτροφόρησης ζώνης, έχει κινήσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων προς αυτή την κατεύθυνση. Ωστόσο για να επιτύχει αυτό, χρειάζεται να ξεπεραστούν κάποια εμπόδια, ώστε τα αποτελέσματα να είναι αποδεκτά. Πολλά βιομόρια, τα οποία υπάρχουν στο δείγμα ως αναλύτες ή ως συστατικά μήτρας (πρωτεΐνες), μπορούν εύκολα να προσροφηθούν στην υδρόφιλη επιφάνεια του τριχοειδούς σωληναρίου, οδηγώντας σε κακή επίδοση του διαχωρισμού. Επίσης, συχνά, οι αναλύτες που πρόκειται να μελετηθούν, υπάρχουν σε πολύ μικρά επίπεδα συγκεντρώσεων, με χαμηλές ποσότητες διαθέσιμου δείγματος. Τέλος, σε μερικές εφαρμογές, υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα στη σύνθεση μεταξύ των δειγμάτων, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της μελέτης των κυττάρων. Επίσης, η διαχείριση των δειγμάτων είναι συνήθως πολύ δύσκολη (Ramos-Payán, 2017).

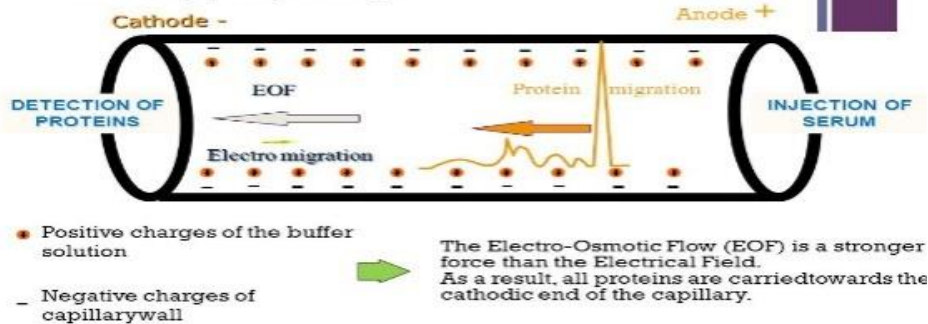
Το σύστημα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης παρουσιάζεται παρακάτω.



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου της ηλεκτροσμωτικής ροής μέσα στο τριχοειδές. Η ηλεκτροσμωτική ροή είναι από τα σημαντικότερα φαινόμενα κατά τη διάρκεια της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης. Στην εικόνα φαίνεται η κίνηση των σωματιδίων, σύμφωνα με την φόρτισή τους

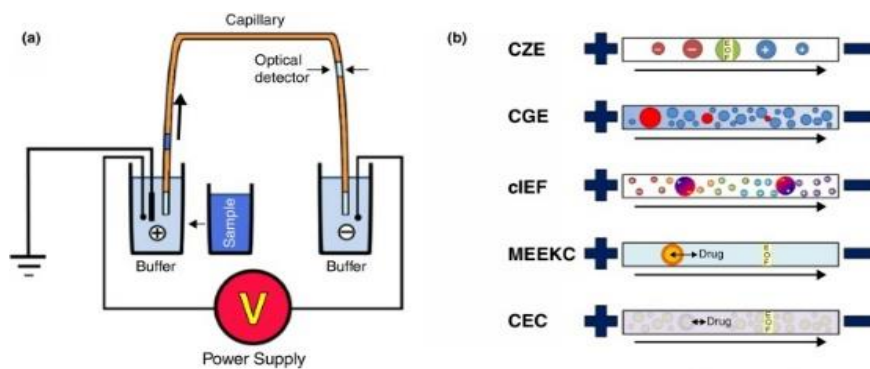
Πηγή:(Huan Yu, 2012).

+ Capillary Electrophoresis in Minicap/Capillaries



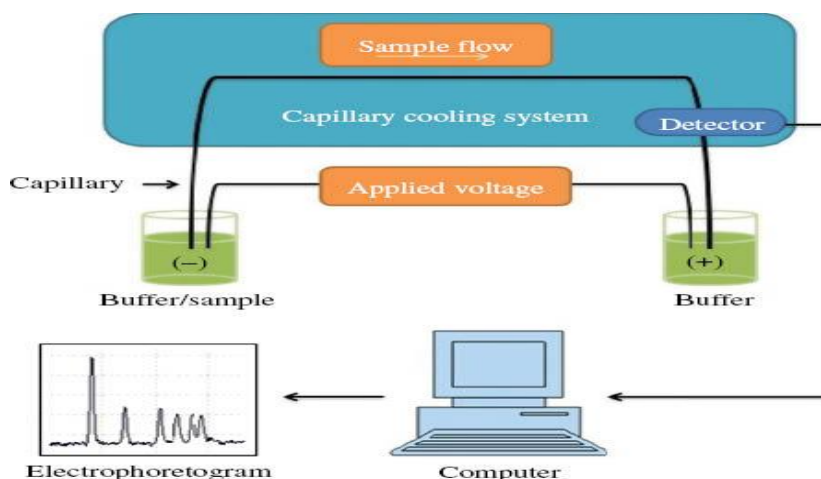
Εικόνα 5: Απεικόνιση ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές. Γίνεται αναφορά στην ηλεκτροσμωτική ροή και χαρακτηρίζεται ως πιο ισχυρή δύναμη από την ισχύ του ηλεκτρικού πεδίου. Αυτό αναγκάζει τις πρωτεΐνες να κινηθούν προς την κάθοδο, οδηγώντας στην ανίχνευση τους

Πηγή: (Phadke, 2016).



Εικόνα 6: Η εικόνα αυτή συνδυάζει τη σχηματική απεικόνιση της μεθόδου της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (a), με τις διαφορετικές μορφές της (b) και πως κυμαίνεται η ηλεκτροσμωτική ροή στο σωληνάριο. Η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς ζώνης (CZE) αποτελεί μέθοδο εκλογής για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών. Αντίθετα, οι MEEKC, CEC, όπως φαίνεται στο σχήμα, χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση φαρμάκων

Πηγή: (HannahHoltkamp, 2015).



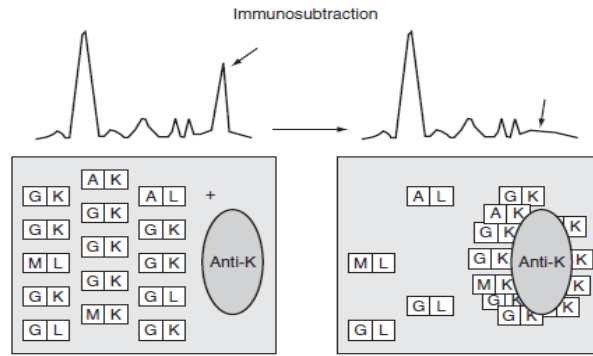
Εικόνα 7: Το σχήμα αυτό απεικονίζει ολόκληρη τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, από την είσοδο του δείγματος μέχρι την ανίχνευσή του, τη συλλογή των στοιχείων από τον υπολογιστή και την απεικόνιση του διαγράμματος. Επίσης, στο σχήμα αυτό φαίνεται και ένα ιδιαίτερο σύστημα του τριχοειδούς σωληναρίου (Capillarycoolingsystem), το οποίο παρεμποδίζει την ανάπτυξη του θερμικού φαινομένου Joule. Σε προηγούμενο κεφάλαιο, αναφερθήκαμε στις επιπτώσεις του θερμικού φαινομένου και τη διαστρέβλωση της ανίχνευσης που προκαλεί η ανάπτυξη του

Πηγή: (Dong-Sheng Lian, 2015)

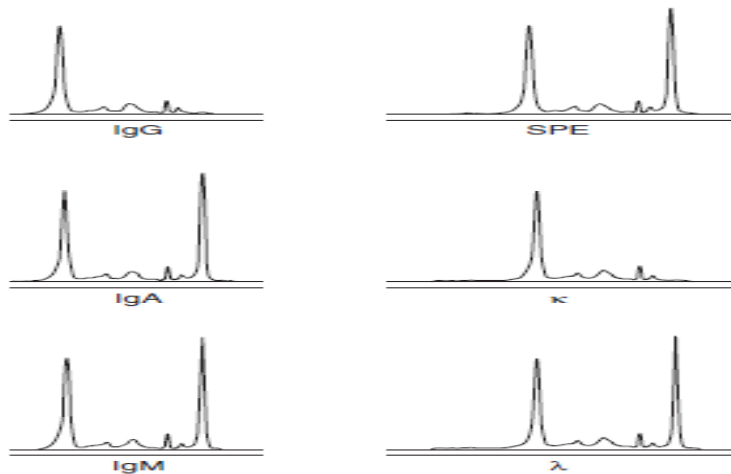
6.3 Ανοσοκαθήλωση πρωτεϊνών

Εξαιρετικά χρήσιμη μέθοδος μετά διεξαγωγή της ηλεκτροφόρησης είναι η ανοσοκαθήλωση. Είναι ποιοτική μέθοδος με πολύ υψηλή ευαισθησία και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίησή των ανοσοσφαιρινών. Έπειτα από ηλεκτροφόρηση, όταν οι ανοσοσφαιρίνες ανιχνεύονται σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις, γίνεται η μέθοδος της ανοσοκαθήλωσης για τον καθορισμό του τύπου των ελαφρών αλυσίδων (κ, λ) (Πουλάς, 2015).

Γίνεται επώαση του δείγματος με αντιορούς σε μικροσφαιρίδια για βαρίες (G, A, M) και ελαφριές αλυσίδες(κ,λ). Η μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη συνδρεεται στα σφαιρίδια του αντίστοιχου αντιορού τα οποία παραμένουν στην στέρεη φάση, κατά την νεα ηλεκτροφόρηση. Στην σύγκριση των δύο διαγραμμάτων ηλεκτροφόρησης πριν και μετα την επώαση παρπυσιάζει, ανοσοαφαίρεση στην βαριά και ελαφρά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης στην οποία ανεικη η μονοκλωνική ζώνη (Μπανταδάκη, χ.χ.).



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου της ανοσοκαθήλωσης. Στην κορυφή που μας δείχνει το βέλος εντοπίζεται η προβληματική γ -περιοχή με μια ακίδα στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση. Ακριβώς από κάτω είναι ένα διάγραμμα που χρησιμοποιεί στοιχεία μπλοκαρίσματος για τα μόρια ανοσοσφαιρίνης σε ορό ασθενή. Σε αυτόν τον ορό έχουν προστεθεί συγκεκριμένοι αντι-οροί πάνω στα σφαιρίδια. Στην παραπάνω περίπτωση τα σφαιρίδια αυτά έχουν καλυφθεί με αντι-κ αντιορούς. Στην κορυφή του σχήματος δεξιά βλέπουμε μετά από ανοσοποίηση με αντι-κ η ακίδα να εξαφανίζεται. Από κάτω δείχνει το κ μόριο να έχει συνδεθεί πλήρως με τους αντιορούς (ένα μόνο μόριο) αφήνοντας τις λ ανοσοσφαιρίνες στον ορό. Παρατηρούμε ότι οι αντιοροί που βάλαμε δεν συνδέονται μόνο σε μονοκλωνικά μόρια αλλά σε ότι μόρια περιέχουν κ-αλυσίδες. πηγή: (David F KEREN,et.al 2003)



Εικόνα 9: Ανοσοκαθήλωση από έναν ασθενή με IgGκ μονοκλωνική γαμμαπάθεια. Η κορυφή δεξιά μας δείχνει αποτέλεσμα από ηλεκτροφόρηση (SPE) και ειδικότερα της τριχοειδούς. Μια μεγάλη γ - ακίδα είναι εμφανής στο σχήμα. Η κορυφή αριστερά δείχνει την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CZE) σε ορό ασθενούς μετά από αντίδραση με αντι- IgG.

Η ακίδα έχει αφαιρεθεί από το διαγραμμα ενώ δεν υπάρχει καμία επίδραση με τους αντιορούς IgA, IgM και λ. παρατηρούμε ότι τα σφαιρίδια με τους αντιορούς κ αφαίρεσαν επίσης την κορυφή.

πηγή: (David F KEREN,et.al 2003)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.

7.1. Παραδείγματα χρήσης της ηλεκτροφόρησης στη διάγνωση διαταραχών των πρωτεϊνών ορού

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε τριχοειδές, εδώ και δύο δεκαετίες περίπου, αποτελεί μέθοδο εκλογής για την ανίχνευση διαταραχών των πρωτεϊνών ορού. Ωστόσο, χρησιμοποιείται επίσης και για την ανίχνευση πρωτεϊνών στα ούρα εξαιτίας πρωτεϊνουρίας. Στο δεύτερο κεφάλαιο, αναφερθήκαμε στα αίτια αύξησης και μείωσης των τιμών των πρωτεϊνών ορού. Στο κεφάλαιο αυτό θα αναλύσουμε τις διαταραχές των πρωτεϊνών και πώς αυτές απεικονίζονται στο ηλεκτροφερογράφημα. Η διάγνωση ορισμένων διαταραχών των πρωτεϊνών, όπως είναι η διαταραχή της αλβουμίνης, μπορεί να επιτευχθεί πολύ εύκολα με τη χρήση της αυτοματοποιημένης μεθόδου της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης. Παρόλα αυτά, δε θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως εξέταση ρουτίνας, αλλά μόνο όταν το κρίνει ο κλινικός ιατρός. Παρακάτω θα δούμε με τη σειρά κάποιες από τις πιο συχνές διαταραχές των πρωτεϊνών ορού και τον τρόπο, με τον οποίο αυτές διαγιγνώσκονται.

Στο παρόν κεφάλαιο θα επικεντρωθούμε στις εξής διαταραχές: την διαταραχή της αλβουμίνης, την έλλειψη α1 αντιθρυψίνης, τη διάγνωση χρόνιας και οξείας φλεγμονής, την αλκοολική κίρρωση, τις αιμοσφαιρινοπάθειες, τη διάγνωση μονοκλωνικών και πολυκλωνικών υπεργαμμασφαιριναιμιών, το πολλαπλό μυέλωμα και την κακοήγη νεοπλασία.

7.1.1. Διαταραχές αλβουμίνης

Η αλβουμίνη αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό όλων των πρωτεϊνών του ορού του αίματος και η κλινική της σημασία είναι ιδιαίτερη. Το ποσοστό της φτάνει μέχρι το 60% περίπου των συνολικών πρωτεϊνών. Καταλαβαίνουμε έτσι πως μία αύξηση ή μείωσή της θα είναι εύκολα αντιληπτή. Οι συχνές διαταραχές που σχετίζονται με την αλβουμίνη είναι η υπεραλβουμιναιμία, δηλαδή η αύξησή της και η υποαλβουμιναιμία. Άλλη μία, όχι και τόσο συχνή διαταραχή είναι η δισαλβουμιναιμία. Η σύνθεση της αλβουμίνης πραγματοποιείται όταν το σώμα τρέφεται και ενυδατώνεται σωστά. Πτωχή δίαιτα, φλεγμονή, έκθεση σε

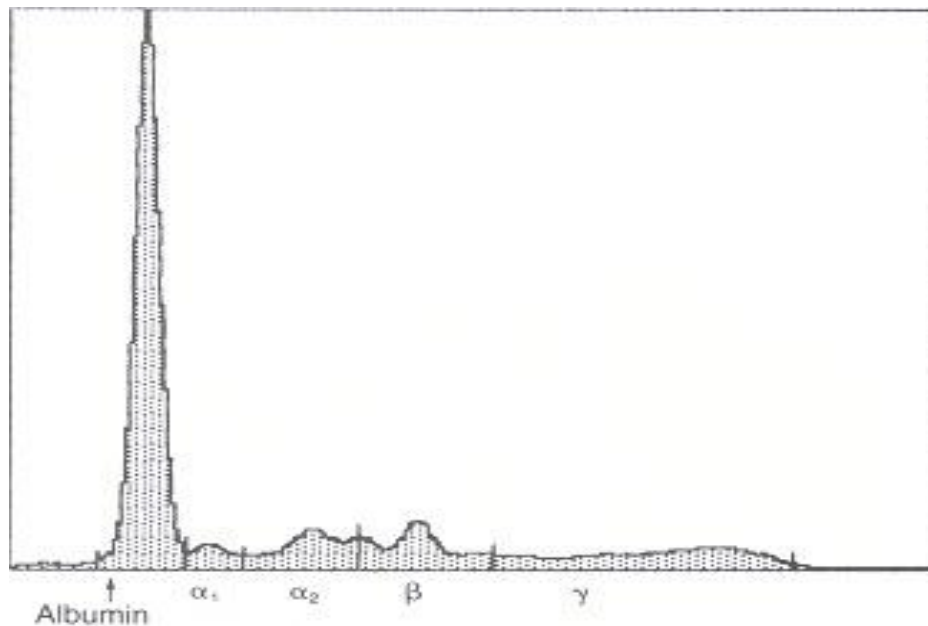
ηπατοτοξίνες και έκθεση σε υψηλή κολοειδοσμητική πίεση, οδηγούν σε αναστολή της σύνθεσής της από το ήπαρ. Η κλινική σημασία της αλβουμίνης υπόκειται στη χρήση της ως ρυθμιστής της ωσμωτικής πίεσης του αίματος. Επίσης σημαντικός είναι και ο ρόλος της ως μεταφορέας υποδοχέων ενδογενών και εξωγενών. Εξωγενείς υποδοχείς είναι τα φάρμακα, ενώ στους ενδογενείς ανήκουν τα λιπαρά οξέα, ιόντα και η χολερυθρίνη. Επιπρόσθετα, η συμβολή της στη διάγνωση ηπατικής κίρρωσης, καθώς και αλκοολικής κίρρωσης, φαίνεται να είναι σημαντική.

Ο ρόλος της αλβουμίνης δε φαίνεται να σταματά εδώ. Οι επιστήμονες κατέληξαν στο συμπέρασμα, πως έχει έναν πιο πολυδιάστατο ρόλο από τους προαναφερθέντες. Φέρεται να παίζει ρόλο στον ασκίτη, του οποίου κύριο αίτιο είναι η κίρρωση του ήπατος. Επίσης, έχει προστατευτικό ρόλο έναντι στην οξεία βακτηριακή περιτονίτιδα, μειώνοντας τις επιπλοκές της. Η συμβολή της στην κίρρωτική καρδιομυοπάθεια είναι σημαντική, βελτιώνοντας την καρδιακή λειτουργία. Άλλη μία συχνή διαταραχή είναι και η υπονατριαιμία. Η αλβουμίνη φαίνεται πως παίρνει και εδώ μέρος στη διαχείρισή της. Τέλος, έπειτα από εξωσωματική διύλιση αλβουμίνης, η πιθανότητα βελτίωσης ηπατικής εγκεφαλοπάθειας αυξάνεται (Walayat, 2017).

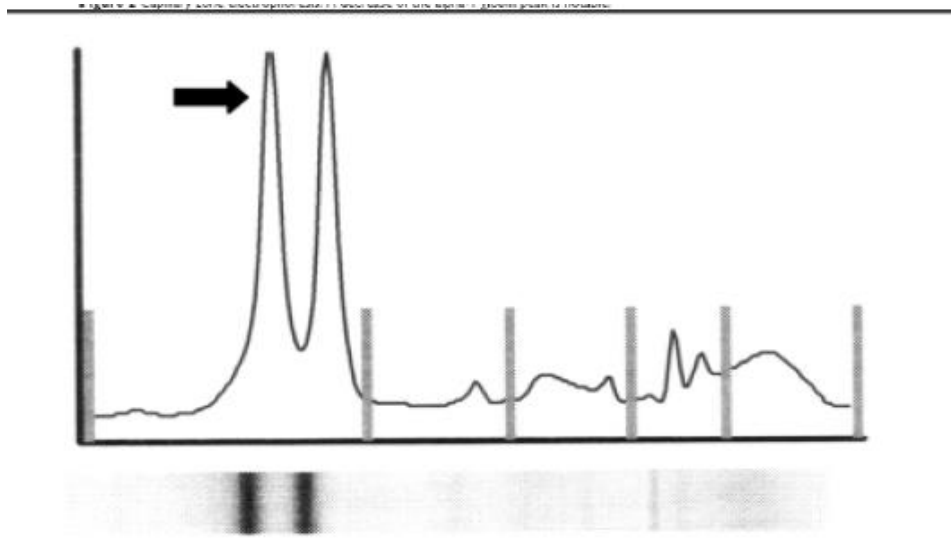
Η δισαλβουμιναιμία, είναι μία νόσος, κληρονομική ή επίκτητη, η οποία χαρακτηρίζεται από την ταυτόχρονη ύπαρξη δύο τύπων αλβουμίνης με διαφορετική ηλεκτροφορητική ικανότητα (Garcez, 2017). Γενικά, η περίπτωση της δισαλβουμιναιμίας δε φέρει κανένα παθολογικό σημείο, συνεπώς η διάγνωσή της πραγματοποιείται με τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών ορού μέσω ηλεκτροφορητικών τεχνικών. Επίκτητα η δισαλβουμιναιμία μπορεί να προκύψει έπειτα από λήψη υψηλών δόσεων β-λακταιμικών αντιβιοτικών ή εάν ο ασθενής υποφέρει από παγκρεατική νόσο, συνήθως με συνδυασμό κάποιας ψευδοκύστης.

Ο κληρονομούμενος τύπος της είναι αρκετά σπάνιος και αποκαλύπτεται τυχαία. Αίτιο είναι η μετάλλαξη του γονιδίου της αλβουμίνης και μεταβιβάζεται με αυτοσωμικό επικρατές πρότυπο. Η συχνότητα εμφάνισης της κληρονομούμενης δισαλβουμιναιμίας εξαρτάται κατά πολύ από τη φυλή, την εθνικότητα και τον τόπο διαμονής. Στην Ευρώπη, η ετεροζυγωτία κυμαίνεται μεταξύ 1:1000 και 1:10000. Συγκεκριμένα στην Ελλάδα, μόνο ένα περιστατικό έχει ανακαλυφθεί μέχρι στιγμής

(Angouridaki, 2008). Στο ηλεκτροφερογράφημα, οι δύο ζώνες (μπάντες) αλβουμίνης που σχηματίζονται μπορεί να είναι όμοιες είτε ανόμοιες, σε κορυφή.



Εικόνα 10: Φυσιολογικό ηλεκτροφερογράφημα, που απεικονίζει όλες τις ομάδες πρωτεϊνών, έπειτα από τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (Πηγή: Busher, 1990)



Εικόνα 11: Ηλεκτροφερογράφημα δυσάλβουμιναιμιας. Με το μαύρο βέλος επισημαίνεται η δεύτερη ανώμαλη αλβουμίνη πριν την κανονική κορυφή. (C Agouridaki,2008)

7.1.2. Έλλειψη Α1 αντιθρυψίνης & χρόνια – οξεία φλεγμονή

Η έλλειψη α1 αντιθρυψίνης είναι μία κληρονομική, μονογονιδιακή νόσος χωρίς κλινικά σημεία, η οποία οφείλεται σε μετάλλαξη ενός γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αυτή. Η διάγνωσή της καθίσταται αρκετά δύσκολη και συγχέεται με σημεία από το αναπνευστικό. Συμπτώματα που συνδέονται με την έλλειψη της α1 αντιθρυψίνης, μπορούν να επηρεάσουν άλλα όργανα όπως το δέρμα, τα αγγεία και το ήπαρ. Η σοβαρότητα της νόσου ποικίλει μεταξύ των ατόμων, ωστόσο οδηγεί σε βλάβη των πνευμόνων και σε εμφύσημα, μη αναστρέψιμο. Συνεπώς, καθίσταται επιτακτική ανάγκη η πρόωπη ανίχνευση της έλλειψής της (J.Craig, 2015). Η ανίχνευση της έλλειψης της α1 αντιθρυψίνης συνήθως πραγματοποιείται με διάφορα τεστ όπως είναι ο φαινότυπος, ο γονότυπος, η αλληλούχιση του γονιδίου και η μέτρηση των επιπέδων του αναστολέα της α1 πρωτεΐνάσης του ορού. Παρόλα αυτά, ανίχνευση της α1 αντιθρυψίνης πραγματοποιείται και με την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση. Η εικόνα της έλλειψης, εμφανίζεται με μείωση των α1 σφαιρινών.

Συνεχίζοντας, η ηλεκτροφόρηση ατόμου με οξεία ή χρόνια φλεγμονή, οδηγεί σε ένα ανώμαλο γράφημα. Σχεδόν όλα τα κλάσματα του ηλεκτροφερογραφήματος επηρεάζονται. Η αλβουμίνη, οι α1 και α2 σφαιρίνες και οι γ σφαιρίνες υπόκεινται μεταβολές. Η φλεγμονή, γενικά, συνοδεύει αρκετές παθολογικές ασθένειες και μη. Παραδείγματος χάρη, ένας τραυματισμός οδηγεί στην εξέλιξη οξέος φλεγμονώδους αντίδρασης του οργανισμού. Αξιοσημείωτο παράδειγμα αποτελεί επίσης, η ρευματική νόσος. Η οξεία φλεγμονή, χαρακτηρίζεται από τη αλλαγή στις συγκεντρώσεις συγκεκριμένων πρωτεϊνών του ορού. Ορισμένες, ωστόσο, αυξάνονται, ενώ άλλες μειώνονται. Βιομόρια, τα οποία αυξάνονται ως απάντηση σε ένα συμβάν είναι το ινωδογόνο, τα συστατικά του συμπληρώματος C3, C4, C9, η σεουροπλασμίνη, η απτοσφαιρίνη, η φερριτίνη, το άγγειοτενσινογόνο και πολλές άλλες. Από την άλλη, πρωτεΐνες και βιομόρια, που μειώνονται σε οξεία φλεγμονή είναι η αλβουμίνη, η τρανφερίνη, η α εμβρυϊκή πρωτεΐνη κ. ά.

Στη χρόνια φλεγμονή, πέρα από τις αυξήσεις των α1 και α2 κλασμάτων και τη μείωση της αλβουμίνης, υπάρχει και αύξηση του κλάσματος των γ σφαιρινών.

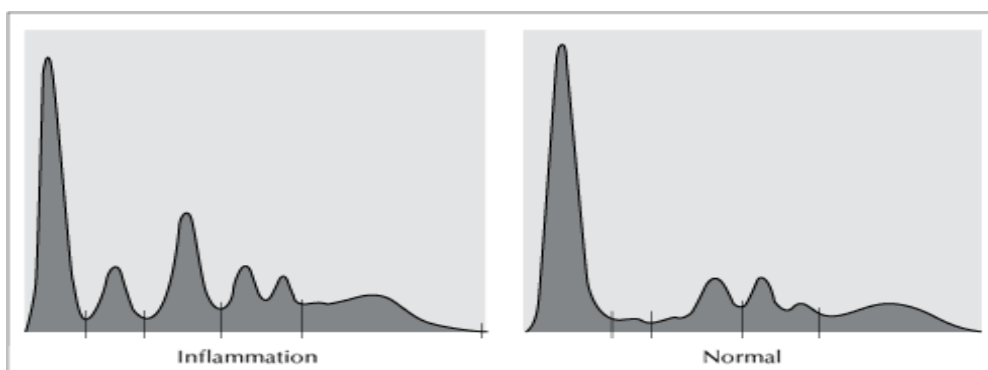


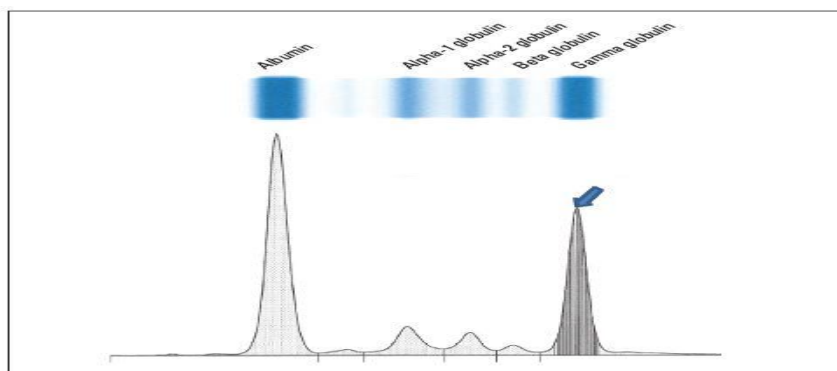
Figure 3. Electrophoretic comparison of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ – difference between inflammatory and non-inflammatory states.

Εικόνα 12: Σύγκριση μεταξύ φυσιολογικής ηλεκτροφόρησης και φλεγμονώδους απάντησης του οργανισμού. Φαίνεται χαρακτηριστικά η αύξηση σχεδόν όλων των κλασμάτων και η μείωση της αλβουμίνης

Πηγή: RosaNeto (2009)

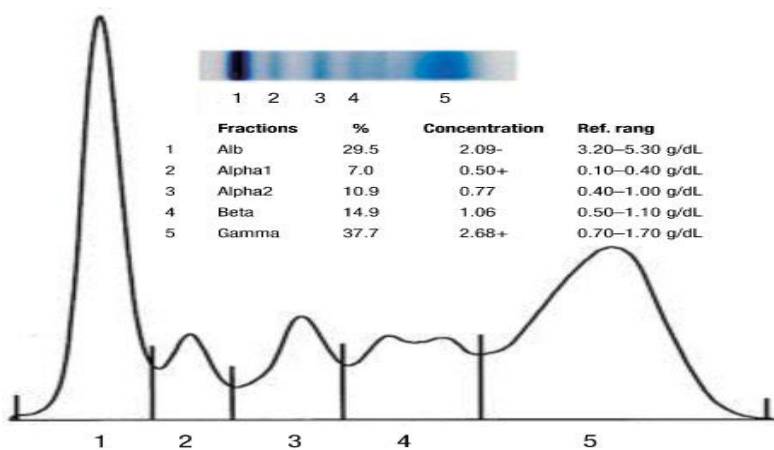
7.1.3. Πολυκλωνική – μονοκλωνική υπεργαμμασφαιριναιμία

Ως μονοκλωνική γαμμαπάθεια ορίζεται η αυξημένη παραγωγή ανοσοσφαιρινών, που εκκρίνονται από έναν κλώνο πλασματοκυττάρων (B κυττάρων), ο οποίος είναι ανώμαλα διογκωμένος. Αυτές οι αυξημένες ποσότητες μπορούν να προσδιοριστούν με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης ή με ανοσοκαθίλωση ορού ή ούρων. Η μονοκλωνική πρωτεΐνη μπορεί να αποτελείται από ελαφριές αλυσίδες συνδεδεμένες με τις βαριές ή από ελαφριές αλυσίδες ελεύθερες. Η μονοκλωνική υπεργαμμασφαιριναιμία ανακαλύπτεται συνήθως τυχαία, είτε έπειτα από εξετάσεις παρακολούθησης νεφρωτικού συνδρόμου, περιφερικής νευροπάθειας και συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας. Συνήθως, η ανοσοσφαιρίνη που κυριαρχεί στην μονοκλωνική υπεργαμμασφαιριναιμία είναι η M (IgM) (Brigden, 2014). Στην πολυκλωνική υπεργαμμασφαιριναιμία έχουμε αυξημένη παραγωγή ανοσοσφαιρινών από πολλά διαφορετικά πλασματοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Σε αυτή την περίπτωση, η εικόνα της ηλεκτροφόρησης είναι αρκετά διαφορετική από τη μονοκλωνική γαμμασφαιριναιμία. Η κύρια ανοσοσφαιρίνη, όμως που υπάρχει είναι η G (IgG).

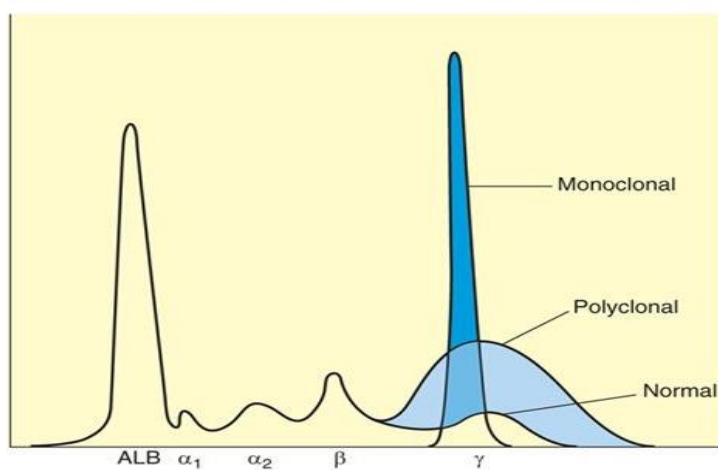


Εικόνα 13: Ηλεκτροφερογράφημα μονοκλωνικής υπεργαμμασφαιριναιμίας

Πηγή: Brigden (2010)



Εικόνα 14: Απεικόνιση ηλεκτροφερογραφήματος πολυκλωνικής υπεργαμμασφαιριναιμίας με πίνακα τιμών Πηγή: Cho (2013)



Εικόνα 15: Σύγκριση ηλεκτροφερογραφήματων μονοκλωνικής-πολυκλωνικής υπεργαμμασφαιριναιμίας με ένα φυσιολογικό ηλεκτροφερογράφημα

7.1.4. Πολλαπλό μύελωμα & κακοήθης νεοπλασία

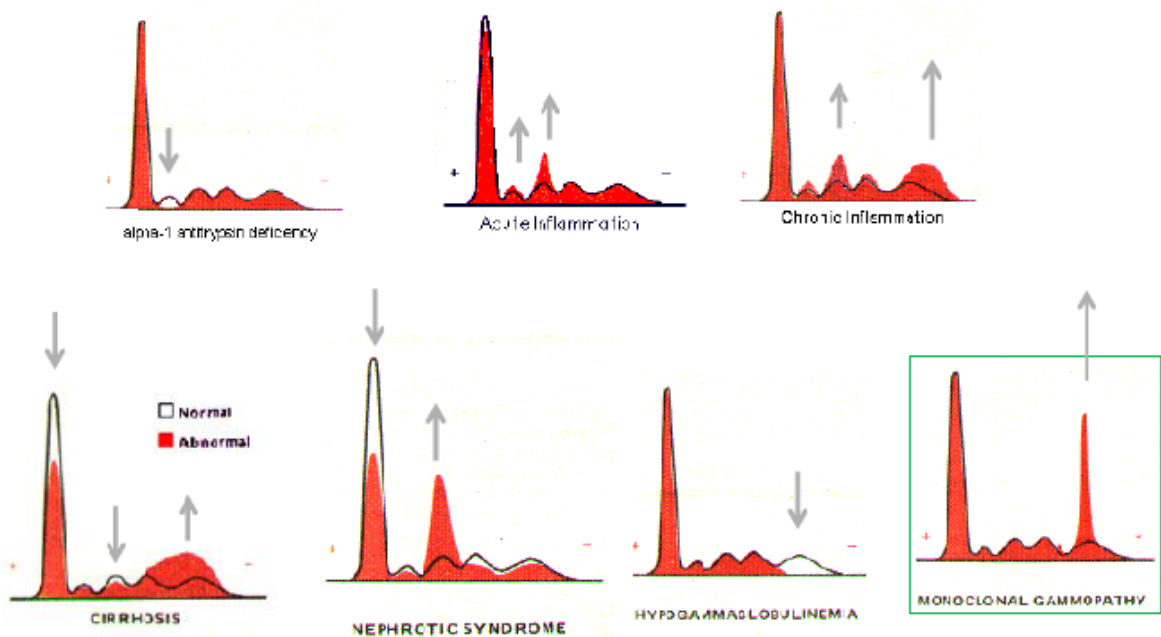
Το πολλαπλό μύελωμα είναι μία κακοήθης νόσος, μονοκλωνικής γαμμασφαιριναιμίας, η οποία εμφανίζεται σε μεγαλύτερες ηλικίες. Τα σημεία είναι πόνος στα οστά και οστεοπόρωση, νεφρική ανεπάρκεια, μειωμένες ανοσοσφαιρίνες και αυξημένη β2 μικροσφαιρίνη. Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις ασθενών ασυμπτωματικών. Με ειδικές διαδικασίες ανοσοδιέγερσης οι επιστήμονες κατέληξαν πως η ανώμαλη πρωτεΐνη είναι, στις περισσότερες περιπτώσεις, η IgG και έπειτα ακολουθεί η IgA (Medicine, 2010). Οι παραπρωτεΐνες Bence-Jones, που αναφέρθηκαν σε προηγούμενο κεφάλαιο, είναι εμφανείς στα ούρα, πάνω από το 50% των ασθενών. Παρόλο που το πολλαπλό μύελωμα είναι ένα είδος μονοκλωνικής γαμμαπάθειας, στο ηλεκτροφερογράφημα υπάρχει πιθανότητα να μη βρεθούν μονοκλωνικές κορυφές, αφού οι ελαφριές αλυσίδες εύκολα περνούν στο ήπαρ.

Επίσης, είναι πιθανό να υπάρξει εικόνα υπογαμμασφαιριναιμίας, καθώς η παραγωγή ανοσοσφαιρινών από μη κακοήθη κύτταρα μειώνεται σημαντικά και ταυτόχρονα αυξάνεται ο καταβολισμός (Medicine, 2010).

Σε τριχοειδή ηλεκτροφόρηση δείγματος με κακοήθη νεοπλασία, παρατηρείται αύξηση των α1 και α2 σφαιρινών, με μικρή μείωση της αλβουμίνης.

7.1.5. Διάγνωση αλκοολικής κίρρωσης (ήπατος)

Στην κίρρωση του ήπατος, διακρίνεται χαρακτηριστική γεφύρωση των κλασμάτων των β και γ σφαιρινών. Οι ανοσοσφαιρίνες που αυξάνονται είναι η IgA, στην περιοχή των β-γ σφαιρινών και η IgG στις γ σφαιρίνες. Επίσης, παρατηρείται μείωση της αλβουμίνης. Στον πίνακα 2 παρακάτω, δίνεται ο πίνακας φυσιολογικών τιμών ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών ορού.



Εικόνα 16: στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζονται διάφορα παθολογικά ηλεκτροφόρησης, τα διαγράμματα απεικονίζουν διάφορες διαταραχές των πρωτεϊνών. | Πηγή: Μπανταδάκη (χ.χ.)

| Staining | Albumin | a 1 | a 2 | B | Γ |
|--------------------------------|-----------|----------------------|----------------------|----------------|-----------|
| Capillary zone electrophoresis | 46.7-67.5 | 4.2-10.9 | 5.6-15.5 | 8.2-15.4 | 6.9-26.2 |
| | Newborns | Infants up to 1 year | Infants up to 6 year | schoolchildren | Adult |
| Albumin | 32.7-45.3 | 35.7-51.3 | 33.1-52.2 | 40.0-52.5 | 35.2-50.4 |
| a 1 globulins | 1.1-2.5 | 1.3-2.5 | 0.9-2.9 | 1.2-2.5 | 1.3-3.9 |
| a 2 globulins | 2.6-5.7 | 3.8-10.8 | 4.3-9.5 | 4.3-8.6 | 5.4-9.3 |
| β globulins | 2.5-5.6 | 3.5-7.1 | 3.5-7.6 | 4.1-7.9 | 5.9-11.4 |
| γ globulins | 3.9-11.0 | 2.9-11.0 | 4.5-12.1 | 5.9-13.7 | 5.8-15.2 |

Πίνακας 2: Πίνακας φυσιολογικών τιμών ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών ορού

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.

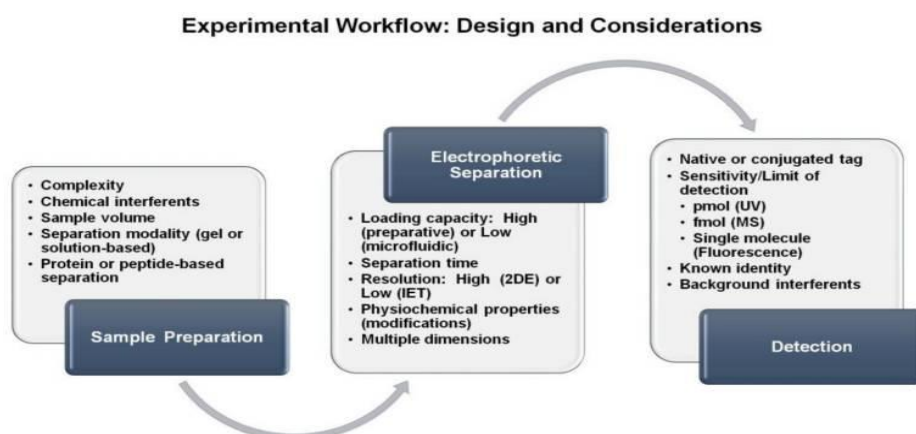
8.1. Παράγοντες που παρεμβαίνουν στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες, όπως και τα νουκλεϊκά οξέα, είναι βιομόρια με φυσικοχημικές ιδιότητες αμφολυτών. Δηλαδή συμπεριφέρονται άλλοτε ως οξέα και άλλοτε ως βάσεις. Σε αυτό παίζει ρόλο και το διάλυμα μέσα στο οποίο βρίσκονται. Ένα αμινοξύ μπορεί να φορτισθεί θετικά ή αρνητικά ανάλογα με το pH του διαλύματος. Έτσι, όταν οι πρωτεΐνες βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο, θα κινηθούν είτε προς την άνοδο, είτε προς την κάθοδο. Ωστόσο, κάθε πρωτεΐνη έχει ένα συγκεκριμένο σημείο της κλίμακας του pH, στο οποίο δεν έχει καθαρό φορτίο. Το σημείο αυτό ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο (isoelectric point) και η τιμή του εξαρτάται από τον αριθμό και την περιεκτικότητα μιας πρωτεΐνης σε αμινοξέα. Σε αυτό το σημείο, οι πρωτεΐνες δεν κινούνται ούτε προς την άνοδο, ούτε προς την κάθοδο, κατά την ηλεκτροφόρηση. Οι περισσότερες πρωτεΐνες έχουν ισοηλεκτρικά σημεία μικρότερα του 8. Επομένως σε pH μεγαλύτερο του 8, δηλαδή αλκαλικό περιβάλλον, τα

περισσότερα μόρια είναι αρνητικά φορτισμένα και κινούνται προς την άνοδο κατά την ηλεκτροφόρηση.

Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που επηρεάζουν τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Μεταξύ άλλων οι πιο σημαντικοί είναι: το pH, η θερμοκρασία, ο χρόνος, η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το είδος του ηλεκτροφορητικού υλικού, το μέγεθος και το σχήμα του βιομορίου και η φύση του ρυθμιστικού διαλύματος (Zώτου, 2015b). Πέραν όμως από τους αναφερόμενους παράγοντες, οι επιστήμονες κατέληξαν σε ένα σχεδιάγραμμα με τους παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη, στην σωστή επιλογή της κατάλληλης μεθόδου ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού πρωτεϊνών και πεπτιδίων.

Οι παράγοντες που προαναφέρθηκαν, μαζί με τις αλληλεπιδράσεις των προς μελέτη ουσιών, με τα τοιχώματα του τριχοειδούς είναι ελεγχόμενοι. Οι περισσότεροι από αυτούς, όπως το θερμικό φαινόμενο Joule και η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, προκαλούν διεύρυνση των ζωνών στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 17: Αναφορά σημαντικών παραγόντων για την επιλογή ηλεκτροφορητικής μεθόδου διαχωρισμού, από την προετοιμασία του δείγματος, μέχρι την ανίχνευση Πηγή: Cologna (2017)

8.1.1. Θερμικό φαινόμενο Joule

Το φαινόμενο Joule οδηγεί σε βαθμίδωση θερμοκρασίας στον τριχοειδή σωλήνα και ομαλή ροή. Ο έλεγχος και η διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας είναι κρίσιμο σημείο για την ηλεκτροφόρηση. Όμως, υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που περιπλέκουν τη διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας στο τριχοειδή σωληνάριο. Πρώτον, το πέρασμα της ηλεκτρικής ροής μέσα από το σωληνάριο, το οποίο είναι γεμάτο με το διάλυμα (buffer), έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή θερμότητας. Αυτό το έμφυτο φαινόμενο που συμβαίνει στους ηλεκτροφορητικούς διαχωρισμούς ονομάζεται Joule. Δεύτερος λόγος κατά τον οποίο η διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας καθίσταται περίπλοκη είναι πως η θερμοκρασία των συστατικών μέσα στο τριχοειδές είναι δύσκολο να μετρηθεί. Ωστόσο, υπάρχουν τρόποι που μπορεί να εκτιμηθεί (Petersen J, 2001). Αλλαγές στη θερμοκρασία μπορούν να έχουν αντίκτυπο και σε άλλους παράγοντες μέσα στο τριχοειδές.

Παραδείγματος χάρη, μία αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μείωση του ιξώδους. Απουσία άλλων αλλαγών, αυτή η μείωση του ιξώδους μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της ηλεκτροσμωτικής ροής (EOF). Επίσης, η θερμοκρασία ίσως επηρεάσει και το pH του διαλύματος. Μία μεταβολή της θερμοκρασίας κατά 10° Κελσίου, είναι ικανή να μεταβάλει την EOF και το φορτίο των αναλυόμενων μορίων (Petersen J, 2001). Αποτέλεσμα όλων αυτών είναι η διεύρυνση των κορυφών, εξαιτίας της διάχυσης των διαλυμένων ουσιών.

8.1.2. Αλληλεπιδράσεις ουσιών με τα τοιχώματα του τριχοειδούς

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προσδιοριζόμενων ουσιών και των τοιχωμάτων του τριχοειδούς είναι σημαντικός παράγοντας εμφάνισης κορυφών σε μια καμπύλη ηλεκτροφόρησης. Περισσότερο επιζήμιο σενάριο, ωστόσο, είναι η συνολική προσρόφηση των ουσιών στα τοιχώματα. Τα αίτια μιας τέτοιας πιθανότητας είναι οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προσδιοριζόμενων ουσιών (κατιόντα) και των τοιχωμάτων του τριχοειδούς, που είναι αρνητικά φορτισμένα, καθώς και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Συνήθως το φαινόμενο της προσρόφησης παρατηρείται σε μεγάλα πεπτίδια και πρωτεΐνες, τα οποία κατέχουν μεγάλο φορτίο

και υδρόφοβα τμήματα (Ζώτου, 2015b). Προκειμένου να επιλυθεί το ζήτημα της προσρόφησης των προσδιοριζόμενων ουσιών, προτάθηκαν διάφορες τεχνικές.

Όσον αφορά τον περιορισμό της προσροφήσεως, χρήσιμη τεχνική είναι η λειτουργία της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης σε ακραίες τιμές pH. Σε υψηλό pH (9-10), τόσο τα τοιχώματα όσο και οι προσδιοριζόμενες ουσίες θα είναι αρνητικά φορτισμένα, έτσι οι αλληλεπιδράσεις θα περιορίζονται από την άπωση φορτίου. Άλλη μία χρήσιμη μέθοδος είναι η επικάλυψη των τοιχωμάτων του τριχοειδούς για τον περιορισμό των αλληλεπιδράσεων. Αυτό που πραγματοποιείται είναι είτε κάποια ομοιοπολική τροποποίηση των τοιχωμάτων, είτε απλή δυναμική απενεργοποίηση με τη χρήση προσθέτων στο ρυθμιστικό διάλυμα (Ζώτου, 2015b).

8.1.3. Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ορού σε οξική κυτταρίνη

Κατά την ηλεκτροφόρηση ζώνης, οι πρωτεΐνες ορού (αλβουμίνη και σφαιρίνες) μετακινούνται προς την άνοδο ή τη κάθοδο, δηλαδή συμπεριφέρονται σαν πολυηλεκτρολύτες, κατά την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου, αποκτώντας διαφορετικές ταχύτητες. Όταν το pH του περιβάλλοντος είναι όξινο εν συγκρίσει με το pI της πρωτεΐνης, τότε φορτίζεται θετικά, ενώ σε άλλη περίπτωση αρνητικά. Όταν το pH, όμως, ισούται με το pI, τότε η πρωτεΐνη δε μετακινείται. Η ταχύτητα κίνησης του μορίου πρωτεΐνης εξαρτάται από το φορτίο του, την ισχύ, το μέσο που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, το μέσο βάρος των κλασμάτων κλπ. Ουσιαστικά, η τεχνική ολοκληρώνεται όταν οι πρωτεΐνες είναι σε θέση να σχηματίσουν ξεχωριστές ζώνες. Για να προσδιοριστούν, όμως, τα αποτελέσματα ποσοτικά, είναι απαραίτητη η χρώση των κλασμάτων με χρωστικές, όπως το RedPenceunS, που προκαλούν αντιδράσεις με τις βασικές ομάδες πρωτεϊνών(Ζώτου, 2015a).

8.1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση διαχωρισμού κατά την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση

Ο διαχωρισμός στην Τριχοειδή Ηλεκτροφόρηση κυρίως επηρεάζεται από την απόδοση και όχι από την εκλεκτικότητα, εξαιτίας των θεωρητικών πλακών. Συγκεκριμένα, η ύπαρξη πολύ στενών ζωνών των διαχωριζόμενων ουσιών, με εμφάνιση μικρών διαφορών στις ηλεκτροφορητικές ευκινησίες τους είναι ικανοποιητικές παράμετροι για τον πλήρη διαχωρισμό τους. Βασικό κριτήριο για την επίτευξη μεγαλύτερης απόδοσης της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας είναι η επιλογή του κατάλληλου τρόπου διαχωρισμού της Τριχοειδούς Ηλεκτροφόρησης, παράλληλα με την επιλογή των κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων (Ζώτου, 2015c).

Έτσι, η διασπορά στη Τριχοειδή Ηλεκτροφόρηση ενδέχεται να επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες, πέρα της αξονικής διάχυσης. Ειδικότερα, η βαθμίδωση της θερμοκρασίας μέσα στον τριχοειδή, που προκαλείται λόγω αύξησης της θερμότητας Joule, αποτελεί από τους πιο σημαντικούς παράγοντες. Το μήκος ζώνης του εισαγόμενου δείγματος αλλά και οι αλληλεπιδράσεις των προσδιοριζόμενων ουσιών με τα τοιχώματα του τριχοειδούς είναι επίσης παραδείγματα που επηρεάζουν την απόδοση. Κοινό χαρακτηριστικό των ανωτέρω θεωρείται ότι τα φαινόμενα είναι ελεγχόμενα σε γενικές γραμμές.

| Παράγοντες | Παρατηρήσεις |
|--|---|
| Αξονική διάχυση | <ul style="list-style-type: none"> Καθορίζει την απόδοση διαχωρισμού Ενώσεις με χαμηλότερο συντελεστή διάχυσης σχηματίζουν στενότερες ζώνες |
| Θέρμανση Joule | <ul style="list-style-type: none"> Οδηγεί σε διαφορές θερμοκρασίας (βαθμίδωση θερμοκρασίας) στον τριχοειδή και ομαλή ροή |
| Μήκος εγγυόμενου δείγματος | <ul style="list-style-type: none"> Το μήκος του εγγυόμενου δείγματος θα πρέπει να είναι μικρότερο από το μήκος ελεγχόμενης διάχυσης Οι δυσκολίες στην αποτίμηση των ορίων αντίγνωσης συχνά απαιτούν μεγαλύτερο από το ιδανικό μήκος έγχυσης |
| Προσρόφηση του δείγματος | <ul style="list-style-type: none"> Αλληλεπίδραση των συστατικών του διαλύματος με τα τοιχώματα του τριχοειδούς συνήθως, προκαλεί σοβαρή παραμόρφωση των κορυφών (εμφάνιση συράς) |
| Ηλεκτροδιασπορά | <ul style="list-style-type: none"> Συστατικά δείγματος με αγωγιμότητα υψηλότερη απ' αυτήν του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (φέροντος ηλεκτρολύτη) έχουν ως αποτέλεσμα κορυφές με μέτωπο Συστατικά δείγματος με αγωγιμότητα χαμηλότερη απ' αυτήν του φέροντος ηλεκτρολύτη έχουν ως αποτέλεσμα κορυφές με συρά |
| Διαφορετικό ύψος ηλεκτρολύτη στα δοχεία ανόδου-καθόδου | <ul style="list-style-type: none"> Δημιουργεί ομαλή ροή |
| Μέγεθος κυψελίδας αντίθετη | <ul style="list-style-type: none"> Πρέπει να είναι μικρό σε σχέση με το πλάτος των κορυφών |

Εικόνα 18: Παράγοντες διεύρυνσης ζωνών στη Τριχοειδή Ηλεκτροφόρηση

Πηγή: Ζώτου (2015c)

8.1.5. Η φύση του ρυθμιστικού διαλύματος

Η ιοντική ισχύς και οι χημικές ιδιότητες των ρυθμιστικών διαλυμάτων είναι τα στοιχεία που επιδρούν διαφορετικά σε αρκετές πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, η ιοντική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος επιδρά στην ταχύτητα κίνησης, δεδομένου ότι το μόριο που κινείται περιβάλλεται από ιόντα που προέρχονται από το ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο παρεμβάλλεται στη κίνησή του. Τα ρυθμιστικά διαλύματα υψηλής ιοντικής ισχύος προκαλούν την απελευθέρωση μεγάλου ποσού θερμότητας (Joule), με κίνδυνο τη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Τέλος, η αύξηση της ιοντικής ισχύος του των προαναφερθέντων έχουν ως αποτέλεσμα καλύτερα διαχωριζόμενα κλάσματα (Λιανίδου, 2015).

8.2. Παρεμβολές στις καμπύλες ηλεκτροφόρησης από φαρμακευτική αγωγή

Ένα σημαντικό ζήτημα που θα αναλυθεί εκτενέστερα παρακάτω με ειδικές αναφορές σε συγκεκριμένες ουσίες, είναι η παρεμπόδιση της ηλεκτροφόρησης και ανοσοδιέγερσης ασθενών με γαμμαπάθειες ή πολλαπλό μυέλωμα από την μονοκλωνική μονοθεραπεία που ακολουθούν. Έχει βρεθεί επιστημονικά τεκμηριωμένο ότι ουσίες όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα ανταγωνίζονται τις ζώνες ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών των ασθενών, με συνέπεια μη σωστά ερμηνευτικά αποτελέσματα. Οι μονοκλωνικές θεραπείες έχουν μια μακρά και συναρπαστική ιστορία, αρχίζοντας με την ανακάλυψη των υβριδωμάτων από τους Milstein και Kohler στη δεκαετία του 1970. Η μεταγενέστερη ανάπτυξη των στοχευμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων οδήγησε τελικά στην πρώτη θεραπεία που εγκρίθηκε από το FDA με μονοκλωνικό αντίσωμα. Τις τελευταίες δεκαετίες με την ανακάλυψη των μονοκλωνικών θεραπειών δεν άργησαν οι κλινικές δοκιμές για το Siltuximab (θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος) να εντοπίσουν ότι αυτές οι θεραπείες αποτελούν την πιθανή παρέμβαση στην ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και ανοσοδιέγερση. (McCudden, 2018).

8.2.1. Μονοκλωνικό αντίσωμα (Siltuximab)

Πάνω σε αυτό το νέο μονοκλωνικό αντίσωμα (Siltuximab) προσπάθησαν να εξηγήσουν οι κλινικοί ερευνητές και άλλες δυσκρασίες του αίματος που οφείλονται σε φάρμακα που χορηγούνται για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος, τα οποία είναι μονοκλωνικά αντισώματα. Σε μια ερευνά που έγινε το 2010 και δημοσιεύτηκε στο Blood, φάνηκε μέσω κάποιων περιπτώσεων ασθενών, πως επηρεάζουν τα μονοκλωνικά αντισώματα και σε ποια συγκέντρωση του φαρμάκου παρατηρείται παρεμπόδιση στην ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών ορού.

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ορού (SPE) χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση και την παρακολούθηση ασθενών με δυσκρασίες κυττάρων πλάσματος. Η μελέτη αυτή ξεκίνησε μετά την ανίχνευση μιας νέας IgG βαριάς αλυσίδας ανοσοσφαιρίνης σε έναν ασθενή ηλικίας 51 ετών με γνωστό ιστορικό IgDk πολλαπλού μυελώματος. Το εργαστηριακό εύρημα ήταν ασυνήθιστο εξαιτίας της εμφάνισης μιας σπάνια γαμμαπάθειας βαριάς αλυσίδας IgG σε συνδυασμό με IgDk

καθώς και χαμηλή ποσότητα IgG ορού 255 mg / dL (διάστημα αναφοράς 600-1700). Μετά την παρατήρηση της παρεμβολή της ηλεκτροφόρησης και μετά από επαφή με τον θεράποντα ιατρό διαπιστώθηκε ότι ο ασθενής συμμετείχε σε κλινική δοκιμή φάσης II με το μονοκλωνικό αντίσωμα Siltuximab σε συνδυασμό με δεξαμεθαζόνη.

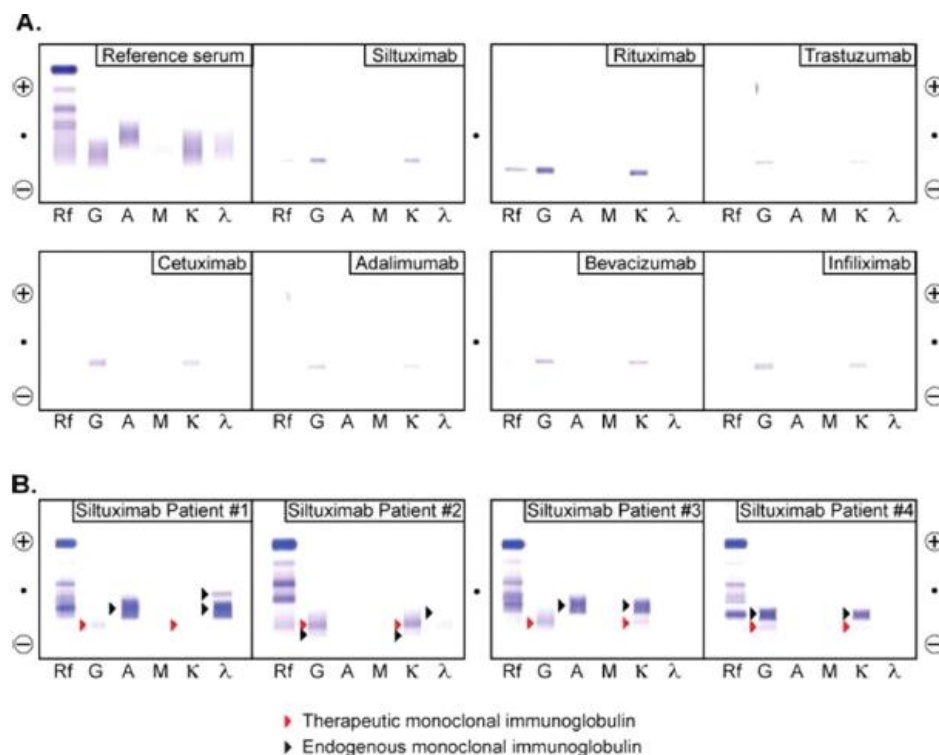
Το siltuximab είναι ένα αντίσωμα υψηλής συγγένειας με την ανθρώπινη ιντερλευκίνη-6 (IL-6) που χρησιμοποιείται σήμερα σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία ορισμένων κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλού μυελώματος. Οι στόχοι αυτής της μελέτης ήταν να προσδιοριστεί εάν οι θεραπείες μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης παρεμβαίνουν στη δοκιμή της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών ορού και στις κοινώς χρησιμοποιούμενες ανοσοδοκιμασίες.

Για να φανεί η ολοκληρωμένη παρέμβαση του Siltuximab χρησιμοποιήθηκαν με 2 διαφορετικές πλατφόρμες ηλεκτροφόρησης: την Capillarys II (Sebia, USA) και την Hydrasys (Sebia, USA). Το Siltuximad αναλύθηκε μόνο του ή μεταφέρθηκε σε φυσιολογικούς ορούς αναφοράς σε συγκεντρώσεις μεταξύ 50-600 mcg / mL για να απεικονίσει το αναφερόμενο εύρος των θεραπευτικών συγκεντρώσεων κυκλοφορούντος φαρμάκου. Επίσης εξετάστηκαν επιπρόσθετες μονοκλωνικές θεραπείες στις αναφερόμενες μέσες μέγιστες συγκεντρώσεις φαρμάκων στον ορό. Οι θεραπείες που εξετάστηκαν παριστάνουν και τις δύο χημειοθεραπευτικές ανοσοσφαιρίνες ανθρώπου-ποντικού (Rituximab, Siltuximab, Infliximab, Cetuximab) και εξανθρωπισμένα αντισώματα (Trastuzumab, Bevacizumab, Adalimumab).

Δοκιμάστηκε επίσης η επίδραση του Situximab σε μια ποικιλία αυτοματοποιημένων ανοσοπροσδιορισμών ορού, συμπεριλαμβανομένων των hCG, iPTH, τροπονίνης T (Roche Diagnostics), κορτιζόλης, Hs-CRP, PSA, RF και TSH (Ortho Clinical Diagnostics). Μετά την ολοκλήρωση των διαδικασιών στην παραπάνω ερευνά τα αποτελέσματα δείχνουν την εμφανή παρεμβολή της ηλεκτροφόρησης από μονοκλωνικές θεραπείες που χρησιμοποιούνται σε ασθενείς που νοσούν από πολλαπλό μυέλωμα σε διαφορές συγκεντρώσεις των φαρμάκων.

Το siltuximab ήταν εμφανές ως μονοκλωνική πρωτεΐνη IgGκ σε ένα όριο των 100 mcg / mL και ανιχνεύθηκε με όλες τις επιταχθείσες μεθόδους συμπεριλαμβανομένης της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης, της ανοσοκαταστολής, της ηλεκτροφόρησης πηκτής αγαρόζης και της ανοσοδιεγέρσεως (IFE). Επίσης ελέχθησαν και άλλες ευρέως συνταγογραφούμενες μονοκλωνικές θεραπείες στις

αναφερόμενες μέσες μέγιστες συγκεντρώσεις φαρμάκων στον ορό: Rituximab (Rituxan), Trastuzumab (Herceptin), Bevacizumab (Avastin), Infliximab (Remicade), Cetuximab (Erbitux) και Adalimumab (Humira). Κάθε φάρμακο ανιχνεύθηκε εύκολα χρησιμοποιώντας IFE ως μονοκλωνική πρωτεΐνη IgGκ.



Η επανεξέταση των αποτελεσμάτων ανοσοδιέγερσης από 13 επιπλέον ασθενείς που έλαβαν Siltuximab αποκάλυψε μια διακριτή μονοκλωνική πρωτεΐνη IgGκ που αντιστοιχεί στη μετανάστευση του φαρμάκου σε 11/13 ασθενείς. Στις άλλες δύο περιπτώσεις, οι ενδογενείς IgGκ μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες υπερκαλύπτονταν με τα ηλεκτροφορητικά μοτίβα του Siltuximab καθιστώντας τα αδιάκριτα.

Ως εκ τούτου, δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις για να αντιμετωπιστούν οι παρεμβολές από μονοκλωνικές θεραπείες: προσρόφηση φαρμάκου με ειδικούς αντιορούς και δοκιμασία ασθενούς μετά από επέλευση χρόνου για κάθαρση φαρμάκου. Η προ-επώαση του Siltuximab με αντισώματα κατά του φαρμάκου μετατόπισε το ηλεκτροφορητικό πρότυπο του φαρμάκου έτσι ώστε να μπορεί να διαφοροποιηθεί από τις ενδογενείς μονοκλωνικές πρωτεΐνες.

Παρατηρήθηκε επίσης ότι το Siltuximab ήταν μη ανιχνεύσιμο από IFE σε ασθενείς 3-4 μήνες μετά τη διακοπή της θεραπείας. Αυτή η χρονική περίοδος αντιστοιχεί σε περίπου 5 ημιζωές (η μέση ημιζωή του Siltuximab είναι 17,8 ημέρες). Δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση (<5% μεροληψία) από μονοκλωνικές θεραπείες σε κοινώς χρησιμοποιούμενες ανοσοδοκιμασίες (hCG, PTH, τροπονίνη T, κορτιζόλη, Hs-CRP, PSA, RF, TSH) ή ποσοτικές δοκιμασίες ανοσοσφαιρίνης (IgG, IgA, IgM).

Από τις παρατηρήσεις που εντοπιστήκαν στην ερευνά για το φάρμακο Siltuximab αλλά και σε συνδυασμό με αλλά μονοκλωνικά θεραπευτικά σχήματα , φαίνεται η επιτακτική ανάγκη για έγκυρη διάγνωση της παρεμβολής ηλεκτροφόρησης σε ασθενείς έτσι ώστε να αποφεύγονται λάθη στη θεραπεία και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η παρέμβαση των θεραπειών μονοκλωνικών αντισωμάτων μπορεί να έχει κλινική σημασία σε ασθενείς που εξετάζονται ή παρακολουθούνται για δυσκρασίες κυττάρων πλάσματος. Τα άτομα που λαμβάνουν αυτές τις θεραπείες μπορούν να υποβληθούν σε περιττές δοκιμές παρακολούθησης και οι ασθενείς με IgGκ γαμμαπάθεια μπορεί να θεωρηθούν λανθασμένα ότι έχουν υποτροπιάζουσα ή ανθεκτική νόσο. Η μελέτη αυτή υπογραμμίζει ότι η πιθανότητα ψευδώς θετικών δοκιμών σε IFE πρέπει να εξεταστεί δεδομένης της αυξανόμενης χρήσης αυτών των παραγόντων στην κλινική πρακτική.

Η προ-επώαση με αντισώματα κατά του φαρμάκου ή η εξέταση μετά την κάθαρση των θεραπευτικών ανοσοσφαιρινών μπορεί να βοηθήσει στην αποσαφήνιση των ανησυχιών της παρεμβολής της μονοκλωνικής θεραπείας με τη δοκιμή IFE. (Gregory D. Bianchi and others, 2010)

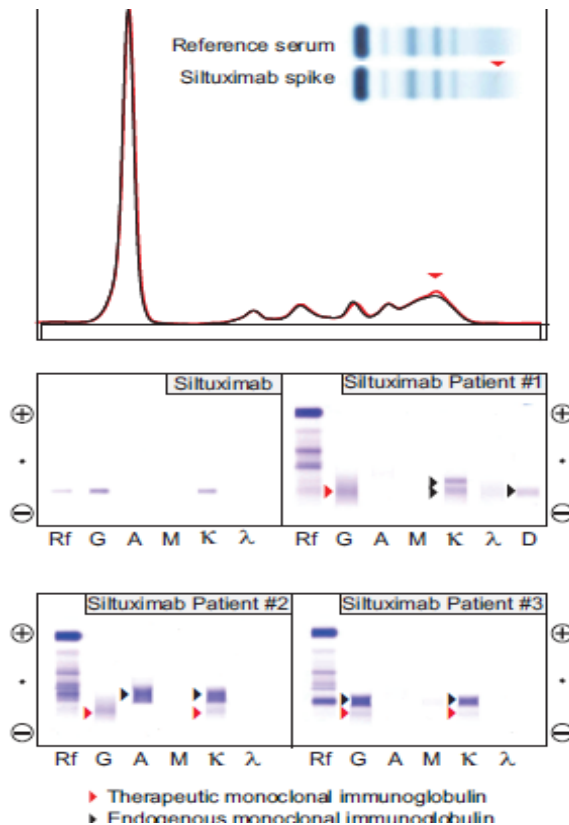


Fig. 1. Detection of monoclonal immunoglobulin therapy by SPE and Immunofixation electrophoresis (IFE).
 The top panel shows agarose gel electrophoresis and capillary electropherograms. The reference serum trace (black) is overlaid on the siltuximab-spiked serum electropherogram (red); red arrows denote the migration of siltuximab. The middle and bottom panels show IFE results for siltuximab spiked into saline (middle left) and the results of physician-ordered IFE testing for 3 patients receiving siltuximab therapeutically. Results for patient #1 are for the IgD κ index case described in the text. The immunofixation antisera are indicated at the bottom of each gel. Rf, acid-fixed reference pattern; +, anode; -, cathode; ·, sample-application point.

8.2.2. Μονοκλωνικό αντίσωμα Daratumumab

Το daratumumab είναι ένα πλήρως εγκεκριμένο μονοκλωνικό αντίσωμα (mAb) από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων από το 2016 για τη θεραπεία υποτροπιάζουσας ή εμπύρετης περίπτωσης πολλαπλούς μυελώματος. Από την έγκρισή του προέκυψαν όμως ανησυχίες σχετικά με τη δυνατότητα παρεμβολής στα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης πρωτεΐνης ορού (SPE) και -δοκιμασίες ηλεκτροφόρησης ανοσοκαταστολής (IFE), ειδικά για τις περιπτώσεις IgG / κ μυελώματος. Αν και η δοκιμασία ανασχεδιασμού ηλεκτροφόρησης ανοσοσφαιρίνης (DIRA) αξιολογείται, δεν έχει εφαρμοστεί στα περισσότερα κλινικά εργαστήρια.

Η darzalex (κοινή ονομασία του φαρμάκου) είναι ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει τη πρωτεΐνη CD38 και προσφέρει ένα ύψιστο όφελος μόνο κατά τη μονοθεραπεία ασθενών με πολλαπλό μύελωμα οι οποίοι έχουν ήδη υποβληθεί σε βαριά αγωγή. Επειδή παρατηρήθηκε μια ενδεχομένη παρεμπόδιση στη απεικόνιση των M-πρωτεϊνών σε ασθενείς με πολλαπλούς

μυέλωμα που τους χορηγείται η δαρματομουμαμπη δημιουργήθηκε το 2017 ο έλεγχος Hydrashift 2/4 IVDDarmatumumab από τις εταιρείες Sebia και JannsenBiotech. Στα πλεονεκτήματά του συγκαταλέγονται η σαφής ανάγνωση των αποτελεσμάτων του ασθενή, χωρίς τη παρενέργεια της Darzalex και η δυνατότητα αποτελεσματικότερης και ακριβέστερης διάγνωσης ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα που χορηγούνται τη Darzalex. Τέλος, εκτιμήθηκαν κάποια περιστατικά με SPE και IFE σε ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με daratumumab και παρουσιάζονται παρακάτω αντιπροσωπευτικές περιπτώσεις. (Li Liu and others, 2018).

Σύμφωνα με μια ερευνά που πραγματοποιήθηκε τον Ιανουάριο του 2018 από την ομάδα της Li Liu, Sarah Wheeler, PhD, Michael Shurin, MD, PhD και δημοσιεύτηκε στο αμερικάνικο περιοδικό *American Journal of Clinical Pathology* η χορήγηση μονοκλωνικού αντισώματος και πιο συγκεκριμένα της δαρματομουμαμπη σε πολύ μικρές δόσεις αλλά σταθερές για ένα χρονικό διάστημα να μην περιορίζει την κυτταροτοξικότητα στις περιπτώσεις του πολλαπλού μυελώματος αλλά επιφέρει κ σύγχυση στα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε ορό αίματος και στη τεχνική της ανοσοδιέγερσης καθώς οδεύει ανοδικά μαζί με τη Μ πρωτεΐνη του ασθενούς.

Όπως και σε χιλιάδες δημοσιεύματα τα τελευταία χρόνια έτσι και εδώ παρατίθενται μια περίπτωση ασθενούς όπου φαίνεται η παρεμπόδιση της σαφούς γνωμάτευσης από τον κλινικό ιατρό. Διαπιστώθηκε ότι το daratumumab μπορεί να ανιχνευθεί εύκολα τόσο από την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ορού (SPE) όσο και από την ανασυνδιασμένη ηλεκτροφόρηση (IFE) σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με μια τυπική θεραπευτική δόση χρησιμοποιώντας SPIFE 3000 (Helena Lab, Beaumont, TX). Στα αποτελέσματα φάνηκε ότι η daratumumab μεταναστεύει αργά στη γ ζώνη και με κατώτατο επίπεδο εβδομαδιαίας δόσης daratumumab να αντιστοιχεί σε μια λωρίδα IgG / κ Μ-πρωτεΐνης μεταξύ 0,1 και 0,2 g / dL. Σε μια περίπτωση παραδείγματος, γυναίκα ηλικίας 86 ετών με υποτροπιάζον πολλαπλό πλασματοκύττωμα δεν είχε ιστορικό μονοκλωνικών πρωτεϊνών στα SPE και IFE της στο παρελθόν. Τον Αύγουστο του 2016 άρχισε εβδομαδιαία θεραπεία με daratumumab. Στις επόμενες SPE και IFE, μια μονοκλωνική IgG / κ ζώνη εμφανίστηκε ως Μ-ακίδα 0.23 g / dL. Με αυτά τα αποτελέσματα, η κλινική διάγνωσή της μεταβλήθηκε σε IgG / κ πολλαπλό μυέλωμα (Li Liu and others, 2018).

8.2.3. Εφαρμογή του ελέγχου Hydrashift 2/4 IVD Darmatumumad

Για να διαπιστωθούν τα παραπάνω , πραγματοποιήθηκε μια έρευνα στην οποία πήρε μέρος ένας ασθενής με πολλαπλό μυέλωμα ηλικίας 64 ετών. Στο ασθενή αυτόν χορηγήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα (t-mAb) και μετά από χορήγηση darzalex, πραγματοποιήθηκε τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ορού. Τα αποτελέσματα αυτής της διαδικασίας έδειξαν ότι η χρήση της darzalex επηρεάζει τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης και ειδικότερα, παρατηρήθηκε ένα σημαντικό έρεισμα στην τιμή αλβουμίνης, υποδηλώνοντας έτσι της έλλειψης της(bisalbuminemia). Η παρατήρηση αυτή, έδωσε το έναυσμα για την εργαστηριακή μελέτη που αφορούσε την αξιολόγηση του ελέγχου Hydrashift 2/4 IVD Darmatumumad με την τεχνική DIRA, αποσκοπώντας στην αντιμετώπιση της παρεμβολής που προκαλεί η Darzalex. Η τεχνική DIRA αναπτύχθηκε από τους McCuddeneta και Jannsen και χρησιμοποιείται σε κλινικές δοκιμές.

Το Hydrashift 2/4 IVD Darmatumumad χρησιμοποίησε το αντίσωμα anti-Darmatumumad, που παρήγαγε ο Jannsen και το επεξεργάστηκε έτσι ώστε να επιτρέπει η μετακίνηση των συμπλεγμάτων της παρεμβαλλόμενης ουσίας προς τα κλάσματα α-σφαιρίνης. Οι διαδικασίες αξιολόγησης και σύγκρισης βασίστηκαν στο πρότυπο της Sebia και εφαρμόστηκαν σε 31 δείγματα από τις συσχετιζόμενες κλινικές δοκιμές της Darzalex. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής , υπέδειξαν ότι το 95,4% των ασθενών που πήραν μέρος (309/324) ήταν θετικοί στη διάγνωση ανοσοθεραπείας ενώ στο 38,5% (119/309) των περιπτώσεων αποφάνθηκε ότι η πρωτεΐνη CD38 του πολλαπλού μυελώματος είχε μερικώς ή ολικώς μετακινηθεί σε άλλες ζώνες της ηλεκτροφόρησης από την παρέμβαση της Darzalex που εντοπίστηκε στα δείγματα του ορού.

Έτσι, η διαδικασία αφαίρεσης του μονοκλωνικού αντισώματος ήταν απαραίτητη μόνο σε όσους ήταν θετικοί στη διάγνωση. Δηλαδή, εν τέλει , δεν ήταν δυνατή η διάκριση της Darzalex από την ενδογενή πρωτεΐνη μυελώματος, γεγονός που συνέβη στο 21,4% (66/309) επιφέροντας με αυτά τα συμπεράσματα τη σπουδαιότητα του ελέγχου Hydrashift 2/4 IVD Darmatumumad. Μετά από την εφαρμογή του έλεγχου αυτού , τα συμπλέγματα πρωτεϊνών εντοπίστηκαν στις μάζες α-ανοσοσφαιρίνων με ευαισθησία 200mg/L , ενώ είναι δύσκολο να

ανιχνευθούν σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Όμως, το αντίσωμα φάνηκε να αφαιρείται πλήρως από το κλάσμα γ-ανοσοσφαιρίνης από όλους τους ασθενείς, χωρίς να δημιουργεί επιπτώσεις η διαδικασία αφαίρεσης σε κάποιον από αυτούς (Boujelbene, Hellara et al. 2010).

8.2.4. Μονοκλωνικό αντίσωμα (Elotuzumab)

Μια άλλη πρόσφατη έρευνα, διερεύνησε τη δράση της δαρματομουμαμπη και ενός άλλου μονοκλωνικού αντισώματος του Elotuzumab, στις ηλεκτροφόρησης ασθενών. Το τελευταίο είναι ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα IgG1 κ που στοχεύει στη σηματοδότηση του μορίου λεμφοκυτταρικής ενεργοποίησης F7 (SLAMF7).

Αυτά τα αντισώματα έχουν ανοσοδιαμορφωτικές επιδράσεις και υποτίθεται ότι ενεργούν εν μέρει αυξάνοντας την εξαρτώμενη από αντισώματα κύτταρο-μεσολαβούμενη κυτταροτοξικότητα έναντι κακοηθών κύτταρα πλάσματος. Ερευνήθηκε η συχνότητα και το πρότυπο ανίχνευσης θεραπευτικών μονοκλωνικών αντισωμάτων (t-mAbs) με συνηθισμένη ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ορού (SPE) και ανοσοδιέγερση (IFE) σε ασθενείς με μυέλωμα. Για το σκοπό αυτόν, πήραν μέρος 22 ασθενείς με επανεξέταση της SPE / IF τους και καταγράφηκαν τα αποτελέσματα από πριν, κατά τη διάρκεια, και μετά από 26 κύκλους θεραπείας.

Τα αποτελέσματα της έρευνα αυτής έδειξαν για ακόμα μια φορά την αναγκαιότητα της προσεκτικής προσέγγισης της ηλεκτροφόρησης σε ασθενείς που τους χορηγούνται τα συγκεκριμένα μονοκλωνικά αντισώματα. Πιο συγκεκριμένα, τα μονοκλωνικά αντισώματα που εξετάστηκαν διακρίθηκαν από την M-πρωτεΐνη στις 16 από τις 26 συνεδρίες θεραπειών, με ανίχνευση της νταρατουμουμάμπης σε εννέα των εννέα των περιπτώσεων και το elotuzumab σε έξι από επτά ασθενείς. Ίχνη των t-mAb εντοπίστηκαν στην πρώτη παρακολούθηση SPE / IF σε 12 ασθενείς, με την πρώτη ανίχνευση 7 ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας και τελευταία ανίχνευση 70 ημέρες μετά τη θεραπεία. Παρέμεινε όμως κατά τη διάρκεια της επαγωγικής θεραπείας στους περισσότερους ασθενείς, με απώλεια ανίχνευσης κατά τη διάρκεια της συντήρησης με daratumumab. Όταν διακρίνονται από την

πρωτεΐνη M, τα t-mAbs είναι ανιχνεύσιμα στο 93% των ασθενών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία, όπως μόλις 7 ημέρες μετά την αρχική δόση και είναι σταθερά όπως παρατηρείται σε όλη την επαγωγική θεραπεία, καθιστώντας επιτακτική ανάγκη την αυξημένη παρακολούθηση και προσεκτική ερμηνεία του SPE / IFE των ασθενών αυτών.

Η ελοτουζουμάμπη και η δαρατουμουμάμπη που έχουν συσσωματωθεί σε συγκεντρωτικά δείγματα φυσιολογικού ορού έχουν ξεχωριστά μοτίβα μετανάστευσης ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνης ορού (A, Sebia Capillarys) και ανοσοδιέγερση (B, Sebia Hydrasys) και είναι ανιχνεύσιμα τόσο χαμηλά όσο 0,025 g / dL. Τα βέλη δείχνουν τη μετανάστευση κάθε φαρμάκου (Tang, et.al, 2018).

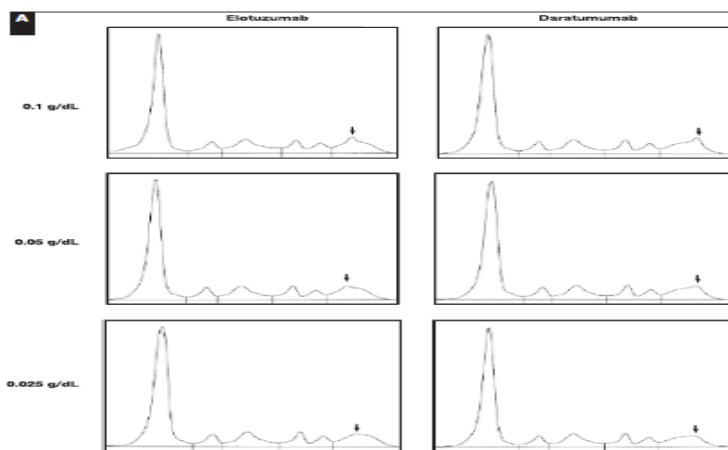


Figure 1A Elotuzumab and daratumumab spiked into pooled normal serum samples have distinct migration patterns on serum protein electrophoresis (A, Sebia Capillarys) and immunofixation (B, Sebia Hydrasys) and are detectable as low as 0.025 g/dL. Arrows indicate the migration of each drug.

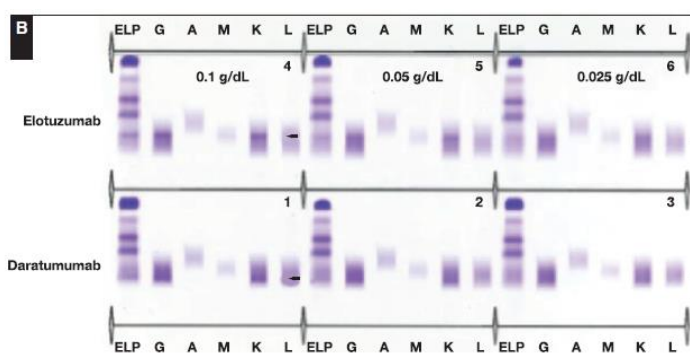


Figure 1B (cont)

Το θεραπευτικό μονοκλωνικό αντίσωμα (t-mAb) που μεταφέρεται με πρωτεΐνη της νόσου M μπορεί να συγχέει την ταυτοποίηση της πλήρους παθολογικής εικόνας. Ο ασθενής 2 είχε μονοκλωνική IgA κ (m-IgA κ) ως δύο συγκλίνοντες ζώνες πριν από τη θεραπεία (A). Τρεις μήνες μετά τη έναρξη της ελοτουζουμάμπης, τόσο η m-IgA κ όσο και η μονοκλωνική IgG κ (m-IgG κ) ήταν ορατά με ανοσοδιέγερση (IF), μία κορυφή στην ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνης ορού (SPE), σε 0.1 g / dL (B). Έξι μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας, μόνο η m-IgG κ (ελοτουζουμάμπη) ζώνη ήταν ορατή σε IF (0,1 g / dL), με εξαφάνιση του αρχικού m-IgA κ, αν και το πρότυπο SPE παρέμεινε το ίδιο. Η επίπτωση, ο χρόνος και η μακροχρόνια επιμονή του t-mAb που παρατηρήθηκε με τη συνεχή παρακολούθηση της δοκιμασίας με SPE / IF δεν έχουν αναφερθεί προηγουμένως σε ασθενείς με χορήγηση θεραπείας για πολλαπλό μυέλωμα. Τα αποτελέσματά αποδεικνύουν ότι το daratumumab και η ελοτουζουμάμπη ανιχνεύονται με ρουτίνα SPE / IF σε πάνω από το 90% των ασθενών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία, στους οποίους διακρίνεται το t-mAb από την πρωτεΐνη M μυελώματος. Άρα, σε κάθε παρόμοια περίπτωση τα μονοκλωνικά αντισώματα μπορούν να διακριθούν από την πρωτεΐνη M μυελώματος είτε με διαφορετική μετανάστευση SPE είτε με διαφορετικό ισότυπο (που επιβεβαιώνεται από IF) στα περισσότερα περιστατικά θεραπείας (21/26), αν και η παρακολούθηση IF δεν πραγματοποιήθηκε σε όλα τα περιστατικά στην παραπάνω υπόθεση.

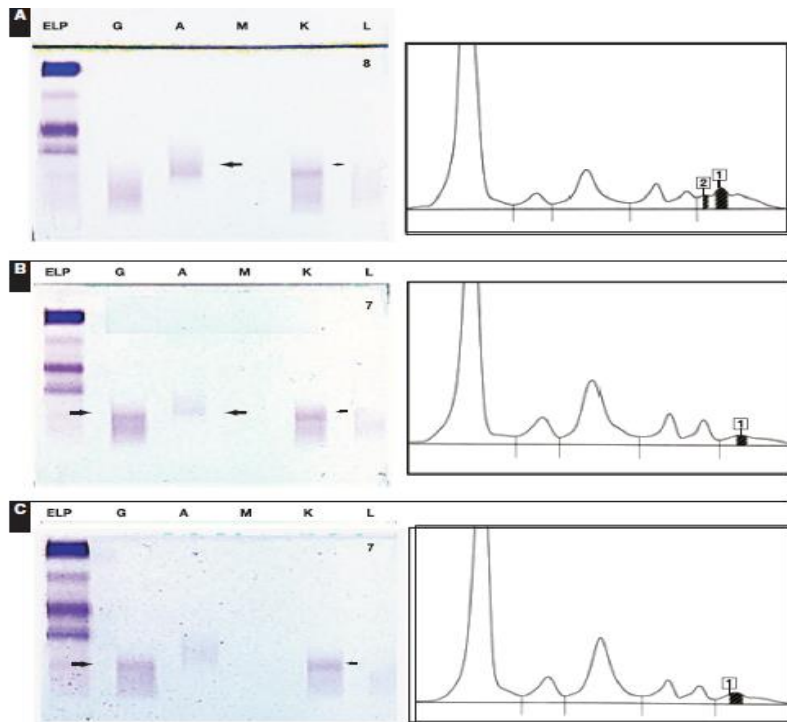


Figure 2 Therapeutic monoclonal antibody (t-mAb) comigrating with disease M protein may confound identification of complete remission. Patient 2 had monoclonal IgA κ (m-IgA κ) as two comigrating bands prior to therapy (A). Three months after the start of elotuzumab, both m-IgA κ and monoclonal IgG κ (m-IgG κ) were visible by immunofixation (IF), comigrating as one peak on serum protein electrophoresis (SPE), at 0.1 g/dL (B). Six months after the start of therapy, only the m-IgG κ (elotuzumab) band was visible on IF (0.1 g/dL), with disappearance of the original m-IgA κ , although the SPE pattern remained the same (C).

Συμπερασματικά, το daratumumab μπορεί να επηρεάσει την ερμηνεία SPE και IFE σε IgG / κ μυελώματος, καθώς και σε οποιαδήποτε άλλη μονοκλωνική γαμμοπάθεια.

Πριν από κάθε πιθανή διαγνωστική προσέγγιση, το εργαστήριο θα πρέπει για κάθε περίπτωση ασθενούς να εξοικειωθεί με τις ιδιότητες του daratumumab σε SPE και IFE και να διερευνήσει το κλινικό ιστορικό για το καλύτερο θεραπευτικό σχήμα για την αποφυγή λανθασμένης διάγνωσης. Εν κατακλείδι, λόγω της αυξανόμενης χρήσης του elotuzumab και του daratumumab στη θεραπεία μονοκλωνικού μυελώματος, με περισσότερα t-mAb να αναπτύσσονται επί του παρόντος, θα πρέπει τόσο οι κλινικοί παθολόγοι όσο και οι ογκολόγοι να γνωρίζουν την υψηλή συχνότητα ανίχνευσης των μονοκλωνικών αντισωμάτων στις θεραπείες για μύελωμα και της μακροχρόνιας επιμονής του t-mAb σε τακτική παρακολούθηση SPE / IF. Προσεκτική ερμηνεία των αποτελέσματα SPE / IF είναι απαραίτητη σε ασθενείς με μονοκλωνικό μύελωμα που υφίστανται σε αυτές τις θεραπείες.

8.3. Παράδειγμα λανθασμένης ερμηνείας αποτελεσμάτων λόγω παρεμβολής

Όπως φαίνεται το φαινόμενο παρεμβολής των μονοκλωνικών αντισωμάτων στην διάγνωση του μυελώματος απασχολεί όλο και περισσότερο τους κλινικούς γιατρούς καθώς και τις ερευνητικές ομάδες. Μια τέτοια απόδειξη είναι μια περίπτωση ασθενούς σε ηλικία 70 ετών που όπως φαίνεται τέθηκε η διάγνωση σαν πολλαπλό μυέλωμα αλλά μετά από κάποιο χρονικό διάστημα που χρειάστηκε να της χορηγηθεί ένα σχήμα θεραπείας διαφόρων ουσιών, διαπιστώθηκε λανθασμένη εκτίμηση της κατάστασης της υγείας της, λόγω παρεμβολής στη ηλεκτροφόρηση.

Πιο συγκριμένα: Γυναίκα ηλικίας 70 ετών παρουσίασε αρχικά οξεία οσφυαλγία, κόπωση και λήθαργο, επισκέφτηκε για μια πρώτη εκτίμηση ένα γιατρό πρωτοβάθμιας φροντίδας. Αρχικά η εξέταση του σκελετικού της προφίλ έδειξε πολυάριθμες αλλοιώσεις που αφορούσαν το κρανίο, διμερείς τα μηριαία και τη λεκάνη. Τα SPEP και IFE κατά το χρόνο έδειξαν IgA kappa M-protein (3,5 g / dL). Μία βιοψία μυελού των οστών έδειξε 50% κύτταρα μυελού, το 80% των οποίων αποτελείται από κύτταρα πλάσματος περιορισμένα με κ-αλυσίδες. Διαπιστώθηκε διάγνωση πολλαπλού μυελώματος. Η ασθενής υποβλήθηκε σε θεραπεία με έξι κύκλους δεξαμεθαζόνης, λεναλιδομίδη και βορτεζομίμπη και τελικά επιτυγχάνεται πλήρης ύφεση. Ταυτόχρονα της υποβλήθηκε μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων κατά το επόμενο έτος. Όταν η ασθένειά της υποτροπίασε τρία χρόνια αργότερα, αυτή ολοκλήρωσε άλλους έξι κύκλους θεραπείας με δεξαμεθαζόνη, λεναλιδομίδη, και βορτεζομίμπη. Παρά τη συνεχή θεραπεία συντήρησης, η ασθένεια προχώρησε. Έτσι οι γιατροί που την παρακολουθούσαν έκκριναν απαραίτητη τη πρόσθετη συστηματική θεραπεία με κυκλοφωσφαμίδη και ιξαζομίμπη, αλλά χωρίς σημαντική κλινική βελτίωση.

Table 1

Summary of patient immunoglobulin laboratory studies. See Fig. 1 for corresponding IFE gels. Numbers in brackets indicate laboratory reference ranges.

| Date | IgG, serum (mg/dL) [700-1600] | IgA, serum (mg/dL) [70-400] | IgM, serum (mg/dL) [40-230] | Kappa FLC, serum (mg/ L) [3.3-19.4] | Lambda FLC, serum (mg/ L) [5.7-26.3] | FLC ratio [0.26-1.5] | Disease M-spike ^a (g/dL) |
|----------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---|--|-------------------------|--|
| Pre-cycle #1 | 334 | 1704 | 55 | 93.7 | 11.0 | 8.52 | 1.89 |
| Post-cycle #6 | 269 | 1552 | 44 | 48.4 | 7.7 | 6.29 | 1.34 |
| Pre-cycle #7 | 256 | 1986 | 45 | 121.5 | 8.2 | 14.82 | 1.88 |
| Post-cycle #9 | 237 | 2274 | 34 | 158.3 | 7.9 | 20.04 | 2.18 |
| Post-salvage therapy | 130 | 2079 | < 25 | 181.8 | 6.6 | 27.55 | 2.19 |

^a Calculation includes polyclonal background.

Είναι ενδιαφέρον, μετά τον έκτο κύκλο της θεραπείας διάσωσης, IFE ορού αποκάλυψε μία εξασθενημένη λωρίδα M-πρωτεΐνης kappa Ig χωρίς αντίστοιχη IgG, IgA ή IgM, των οποίων η συγκέντρωση ήταν πολύ χαμηλή για να είναι ποσοτικοποιθεί με ακρίβεια. Με βάση το κλινικό πλαίσιο οι μελέτες IFE για IgD και IgE δεν εκτελέστηκαν σε αυτό το δείγμα. Δυστυχώς, η ασθενής υπέστη μια τραυματική πτώση με αποτέλεσμα την αμφοτερόπλευρη υπερχορηγούμενη και βραχείας υποαρχινοειδούς αιμορραγία. Η προαναφερθείσα θεραπεία διάσωσης (που αποτελείται από δαρτατουμουμάμπη, πολολιδομίδη, μεθυλπρεδνιζολόνη) συνεχίστηκε και η ασθένεια της είχε κάποια πρόοδο.

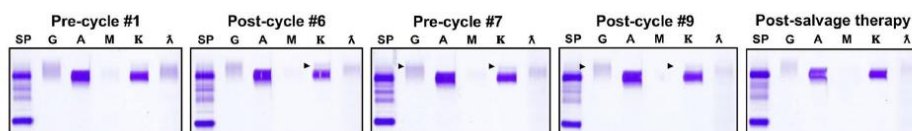


Fig. 1. Patient IFE gels.

(Cenaja and others, 2018)

Σε αυτό το σημείο, η IgG που είχε παρατηρηθεί προηγουμένως στον ασθενή σαν kappa μονοκλωνική πρωτεΐνη δεν παρατηρήθηκε σε επακόλουθο SPEP και IFE. Ναι μεν έπειτα από όλη αυτήν την κατάσταση υποβλήθηκε σε τοποποιημένη θεραπεία διάσωσης, επιτυγχάνοντας μερική απόκριση με τέσσερις κύκλους καρφιλοζώμης και δεξαμεθαζόνης, αλλά αυτό τελικά σταμάτησε μετά την εμφάνισή της συγκοπής. Μετά από συζητήσεις με την κλινική ομάδα σχετικά με τις περαιτέρω επιλογές διαχείρισης του ασθενή εξελέγη να υποβληθεί σε παρηγορητική φροντίδα.

Υπάρχουν τελικά πολλές στρατηγικές που έχουμε θεσπίσει σαν θεσμικό όργανο ώστε να διακρίνουν αξιόπιστα τα mAb M-πρωτεϊνών από την πραγματική μονοκλωνική νόσο στις κορυφές στις συνήθεις δοκιμές SPEP και IFE. Κατ' αρχάς, πάντα αναθεωρούμε τα αρχεία των ασθενών και τις προηγούμενες SPEP και IFE (συμπεριλαμβανομένων και εξωτερικών μελετών εάν κλινικά υποδεικνύεται) για τον εντοπισμό του ισότοπου του κλώνου της νόσου, καθώς και της χορήγησης από οποιαδήποτε θεραπεία με mAb. Εάν μια νέα θεραπεία με mAb αναφέρεται στο κλινικό ιστορικό ή παρεμβολές με τη μεσολάβηση mAb είναι ύποπτες με βάση το κλινικό ή / και εργαστηριακό πλαίσιο. Άμεση σύγκριση μεταναστευτικών προτύπων

των M-πρωτεϊνών των σημερινών και προηγούμενων πηκτών SPEP και IFE είναι επίσης πολύ χρήσιμη και θα πρέπει να αποτελεί συνήθη εργαστηριακή πρακτική. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, η οπτική επιθεώρηση μπορεί να επιλύσει οποιαδήποτε ασάφεια. Για παράδειγμα, το daratumumab μεταναστεύει περισσότερο στην καθολική γ- περιοχή, ενώ το elotuzumab τείνει να εντοπιστεί πλησιέστερα στο β- περιοχή.

Μια άλλη επιλογή για τον χαρακτηρισμό του μεσολαβόμενου μονοκλωνικού αντισώματος παρεμβολής είναι οι δοκιμασίες μετατόπισης πηκτής. Για παράδειγμα, η ανοσοδιέγερση του daratumumab έχει αναφερθεί ως αναλυτικός προσδιορισμός ηλεκτροφόρησης (DIRA). Αυτός ο προσδιορισμός χρησιμοποιεί ένα αντι-νταραταμουμάμπη από πειραματόζωο –ποντικό το οποίο σχηματίζει ένα σύμπλεγμα και εισάγει μια μετατόπιση στο σχήμα μετανάστευσης του daratumumab σε σχέση με την μη δεσμευμένη πρωτεΐνη. Ενώ δεν είναι ακόμα εμπορικά διαθέσιμη, αυτή η μέθοδος μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη όταν το mAb μεταναστεύει μαζί με τη πρωτεΐνη M της ασθένειας και επομένως γίνεται διακριτή η περίσσεια ποσότητα.

Τέλος, με τη καταγραφή αυτού του περιστατικού το περιοδικό που το δημοσίευσε είχε ως σκοπό να τεθεί ως ζήτημα η παρεμπόδιση της ηλεκτροφόρησης από διαφορές ουσίες και επικεντρώνεται σε 5 βασικά σημεία.

Το daratumumab και άλλα θεραπευτικά mAb μπορούν να εμφανιστούν ως πρωτεΐνες M σχετικά με το SPEP και το IFE. Εάν εντοπιστεί εσφαλμένα, η παρεμβολή mAb μπορεί να διαγνωστεί λανθασμένα ως εξέλιξη της νόσου, ως εναλλαγή κατηγορία ανοσοσφαιρινών μονοκλωνικής πρωτεΐνης και, ανάπτυξη νέου κλώνου ή MRD. Οι στρατηγικές για τον εντοπισμό παρεμβολών mAb περιλαμβάνουν: (1) λεπτομερή στοιχεία χαρακτηρίζοντας τις θέσεις έκλυσης των θεραπειών mAb, (2) την εξέταση του ιστορικού του ασθενούς και (3) διατήρηση ενεργής επικοινωνίας των κλινικών γιατρών σε σχέση με τους ασθενείς. Εξειδικευμένες δοκιμασίες όπως το DIRA μπορεί να βοηθήσουν στην επίλυση περιπτώσεων συρρίκνωσης πρωτεΐνη M-ασθένειας και mAb. Οι νέες δοκιμασίες φασματοφωτομετρίας μάζας(MS) πρωτεΐνης μπορούν επίσης να αναπτυχθούν με τρόπο σαφή στα πλαίσια του προσδιορισμού των σχετικών mAbs.

8.4. Πολυκλωνικές αυξήσεις στην IgG4: μονοκλωνική γαμμαπάθεια

Η ασθένεια που σχετίζεται με IgG4 (IgG4-RD) είναι ένα όλο και περισσότερο αναγνωρισμένο σύνδρομο με άγνωστη αιτιολογία που μπορεί να επηρεάσει μια μεγάλη ποικιλία οργάνων. Κοινά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν ογκοειδές πρήξιμο των εμπλεκόμενων οργάνων, ένα λεμφοπλασματικό διήθημα εμπλουτισμένο με πολυκλωνικό IgG4- θετικά κύτταρα πλάσματος, μεταβλητό βαθμό ίνωσης και αυξημένο ορό συγκεντρώσεις πολυκλωνικών IgG4. Λόγω της ασαφούς συνταγματικής φύσης τα συμπτώματα που τα άτομα αυτά παρουσιάζουν, συχνά καθυστερούν μέχρι να βρεθεί ένα ανιχνεύσιμο χαρακτηριστικό, όπως η μάζα. Τέτοιες καθυστερήσεις στη διάγνωση είναι ατυχείς επειδή, η IgG4-RD ανταποκρίνεται καλά στα κορτικοστεροειδή, είτε μόνη είτε σε συνδυασμό με rituximab. Τα ασαφή συμπτώματα περιστασιακά καταλήγουν σε απόδοση

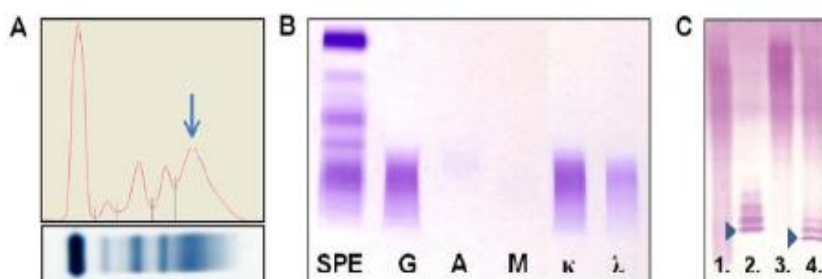


Fig. 3. Electrophoresis pattern observed in serum with elevated polyclonal IgG4. A) Serum protein electrophoresis of a patient with IgG4-RD with an IgG4 subclass value of 2420 mg/dL (reference value 3-200 mg/dL). The arrow indicates a characteristic focal band bridging the β/γ fraction of the spectrum. B) Immunofixation electrophoresis with anti- γ , α , μ , κ and λ sera illustrates that the focal band in the β/γ -region consists mainly of IgG antibodies. Connecting light chains in this patient are made up of both kappa and lambda which stresses the polyclonal nature of the IgG antibodies. C) Isoelectric focusing can be helpful to differentiate between polyclonal and monoclonal IgG. The polyclonal pattern of a normal control (lane 1) and a patient with IgG4-RD (lane 3), is contrasted by monoclonal patterns observed in patients with IgG monoclonal gammopathies (lanes 2 and 4). Arrowheads show the monoclonal "fringe" of the banding characteristic of IgG M-proteins on isoelectric focusing.

ηλεκτροφόρησης ορού πρωτεΐνης που μπορεί να παρέχουν μια ένδειξη για την υποκείμενη κατάσταση. Για εργαστηριακούς ειδικούς οι οποίοι ερμηνεύουν τα πρότυπα SPE, είναι σημαντικό να συνειδητοποιήσουμε ότι κάθε μία από αυτές τέσσερις υποκατηγορίες IgG έχουν τη δική τους μοναδική ηλεκτροφορητική θέση. Η IgG4 μεταναστεύει μέσα σε μια σχετικά μικρή ηλεκτροφορητική περιοχή.

Κατά συνέπεια, μια περιορισμένη κινητικότητα που μοιάζει με μονοκλωνική γαμμαπάθεια μπορεί να παρατηρηθεί σε ορούς που έχουν πολυκλωνική αύξηση στην IgG4 υποκλάση. Μια αναδρομική μελέτη πρόσφατα, απέδειξε ότι πράγματι μια χαρακτηριστική εστιακή ζώνη που γεφυρώνει το βήτα και το γάμμα από την SPE μπορεί να παρατηρηθεί σε ασθενείς με IgG4-RD, και στις δύο περιπτώσεις

τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης. Μια παρατήρηση που επιβεβαιώθηκε αργότερα σε μια ομάδα 303 ασθενών με αυξημένη IgG4 στον ορό.

Η εστιακή ζώνη που ανιχνεύεται με ηλεκτροφόρηση σε ορούς από ασθενείς με IgG4- RD μπορεί να επιβεβαιωθεί ως πολυκλωνικό με ανοσοδιέγερση ή ανοσοκαταστολή σε περίπτωση που οι ελαφριές αλυσίδες σύνδεσης είναι και οι δύο κάπα και λάμδα. Πρέπει να σημειωθεί ωστόσο ότι η σημαντική στρεβλωση της κάπα: λάμδα στο πολυκλωνικό κλάσμα IgG4 μπορεί να προκύψει στην μειοψηφία των ασθενών με IgG4-RD, προσθέτοντας περαιτέρω σύγχυση στην κλωνικότητα τους. Σε αυτούς τους ασθενείς, η εστιακή ζώνη που ανιχνεύθηκε με ηλεκτροφόρηση θα μπορούσε να παρερμηνευθεί ως μονοκλωνική γαμμαπάθεια παρά το γεγονός ότι οι πληροφορίες που παρέχονται με ανοσοκαταστολή δίνουν άλλο αποτέλεσμα. Μια ψευδώς θετική αναφορά μιας πρωτεΐνης IgG M σε αυτές οι ασθενείς θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε περιττές άλλες επεμβατικές διαγνωστικές εξετάσεις και να προκαλούν καθυστέρηση στη σωστή διάγνωση.

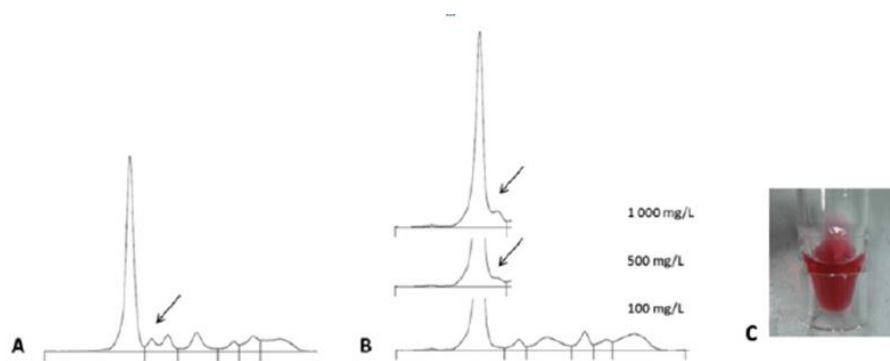
Παράγοντες που θα μπορούσαν να υποστηρίξουν την αναγνώριση των πραγματικών IgG M περιλαμβάνουν: μια διακριτή ακίδα M, που συνδέεται αυστηρά με μόνο μία ελαφριά αλυσίδα και μία κατασταλμένη συγκέντρωση πολυκλωνικών ανοσοσφαιρίνων σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα. Σε περίπτωση που αυτό ενσωματωθεί οι πληροφορίες δεν είναι καθοριστικές και η ισοηλεκτρική εστίαση μπορεί να είναι χρήσιμη μεταξύ πολυκλωνικής και μονοκλωνικής IgG. Ισοηλεκτρική εστίαση με ανοσοδιέγερση είναι συνήθως διαθέσιμη επειδή χρησιμοποιείται στα κλινικά εργαστήρια για την ανίχνευση ολιγοκλωνικών ζωνών στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό των ασθενών που υποπτεύονται ότι έχουν σκλήρυνση κατά πλάκας.

8.4. Παρεμβολή άλλων φαρμάκων στην ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών

Μια νέα παρέμβαση στην ηλεκτροφόρηση ορού αφορά το κλάσμα α1-σφαιρίνης. Αυτή η παρεμβολή ανακαλύφθηκε σε ένα 57χρονο οπού όντας μεθυσμένος προκάλεσε μια σοβαρή οικιακή φωτιά. Για να μην τον επηρεάσουν τα αποτελέσματα των κυανιδίων που παράγονται από τη φωτιά, χορηγήθηκε ενδοφλεβίως στον ασθενή 5 g υδροξοκοβαλαμίνης (OHCob). SPE πραγματοποιήθηκε σε συνδυασμό με τη χρήση CZE σε δείγμα αίματος που συλλέχθηκε 3 ημέρες μετά τη χορήγηση. Μία πρόσθετη ακίδα εντός του κλάσματος α1-σφαιρίνης / αλβουμίνης παρουσιάστηκε και το δείγμα ορού εμφάνισε ένα άτυπο κόκκινο χρώμα. Λίγους μήνες αργότερα, ένας άλλος ασθενής έγινε δεκτός στη μονάδα εντατικής θεραπείας υπό παρόμοιες συνθήκες. Έλαβε δύο δόσεις 5 g OHCob λόγω υπότασης. Ένα δείγμα αίματος συλλέχθηκε κατά την εισαγωγή και 2 ώρες μετά την ένεση του OHCob και έδειξε κόκκινο χρωματισμό του πλάσματος, διαφορετικό από το τυπικό χρώμα της αιμόλυσης (Εικόνα 6C). Η SPE που πραγματοποιήθηκε σε αυτό το δείγμα για έλεγχο για παρεμβολές από OHCob έδειξε παρόμοια ακίδα στο ηλεκτροφορητικό προφίλ, δεδομένου ότι είναι ένα κόκκινο χρωμοφόρο, το OHCob παρεμβαίνει με συν-οξυμετρικούς και χρωματομετρικούς εργαστηριακούς προσδιορισμούς, δυνητικά οδηγώντας σε άκυρα αποτελέσματα. Η παρεμβολή δεν οφείλεται μόνο στο μήκος κύματος, αλλά και σε χημική αλληλεπίδραση.

Συγκεντρώσεις πλάσματος του OHCob που αναμένεται είναι μεταξύ 400 και 800 mg / L μετά από 30 λεπτά χορήγηση 5 g OHCob, και μείωση σε μεταξύ 200 και 400 mg / L 4 ώρες μετά την ένεση. Τέτοιες συγκεντρώσεις είναι πιθανό να είναι ανιχνεύσιμες στην SPE. Επιπλέον, το OHCob παρουσιάζει τέσσερα μέγιστα απορρόφησης σε 274, 351, 500 και 526 nm. Για να αποδείξει τον καταλογισμό του, τα φυσιολογικά δείγματα ορού που έλαβαν OHCob σε αρκετά διαφορετικές συγκεντρώσεις: 100, 500 και 1000 mg / L. Η παρέμβαση δεν ήταν ανιχνεύσιμη στα 100 mg / L, αλλά παρατηρήθηκε σαφώς σε συγκεντρώσεις 500 mg / L (Σχήμα 6B). Μετά τη σύνδεση των κυανιδίων, μετασχηματίζεται το OHCob σε ένα ατοξικό συστατικό, κυανοκοβαλαμίνη, που θα εξαλειφθεί με μέγιστο χρόνο ημιζωής 9

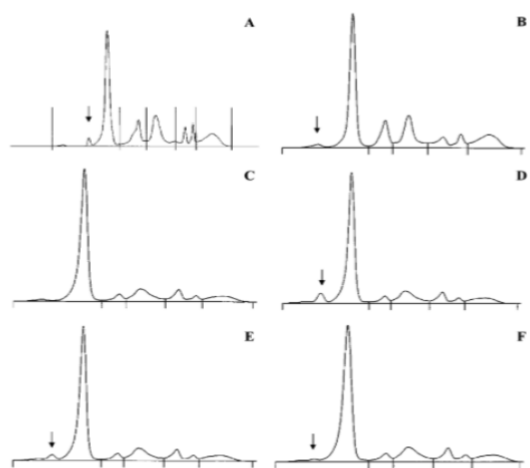
ωρών. Η κυανοκοβαλαμίνη έχει μέγιστα απορρόφησης (364 και 544 nm) και είναι απίθανο να επηρεάσουν την CZE.



Εικόνα 19: Η παρεμβολή από υδροξοκοβαλαμίνης δημιουργεί μια επιπλέον κορυφή στην SPE. Β) Δείγματα φυσιολογικών ορών αίματος έχουν συνδεθεί με υδροξοκοβαλαμίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις : 100,500 και 1000 mg/L, για να αποδειχθεί ο καταλογισμός τους. C) Κόκκινο χρώμα παρατηρείται στους ορούς δειγμάτων μετά την εγχυση με υδροξοκοβαλαμίνης .(McCudden and others, 2018)

Μια άλλη ουσία που έχει διερευνηθεί για τη παρεμβολή και παρερμηνείες στις ζώνες ηλεκτροφόρησης είναι η σουλφαμεθοξαζόλη (SMX), Πρόκειται για μια ουσία –αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται για τις βακτηριακές λοιμώξεις .Η SMX παράγει ένα μέγιστο μικρό αλλά σημαντικό κατά τη άνοδο του κλάσματος της αλβουμίνης στη ηλεκτροφόρηση. Προκειμένου να αποτραπεί η παρεμβολή της, χρησιμοποιούμε την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ζώνης (CZE), η οποία επιτρέπει την άμεση ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών μέσω δεσμών πεπτιδίων. Η διαδικασία CZE συμβάλλει και στην ποσοτικοποίηση της SMX στους κύριους μεταβολίτες της στον ανθρώπινο ορό (Brouwers, Marien et al. 2006)

Σε ασθενή χορηγήθηκε ενδοφλέβια σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη σε ποσότητα 400mg-800mg και εφαρμόστηκαν παράλληλα τεχνικές τους συστήματος Paragon και Sebia προκειμένου να συγκριθούν τα αποτελέσματα . Τα ηλεκτροφερογραφήματα που αναπτύχθηκαν, υποδηλώνουν τη διαφορά της εφαρμογής καθώς η μορφολογία του μέγιστου του αντιβιοτικού διέφερε κατά τις δύο εφαρμογές. Συμπερασματικά, κατά την CZE η SMX παράγει μια μικρή, ευρεία κορυφή στη περιοχή της προαλβουμίνης (Brouwers, Marien et al. 2006).



Εικόνα 1: Τα ηλεκτροφερογράμματα δείχνουν τις επιδράσεις της SMX, από ηλεκτροφόρηση ζωνών σε δύο δείγματα ασθενών.

8.5. Παρεμβολή στις δοκιμασίες βιοχημείας (HIL)

Προκειμένου να βελτιωθεί η φροντίδα των ασθενών, τα κλινικά εργαστήρια έχουν προβεί σε τεχνικές εξέλιξης που επιτρέπουν ταχύτερη και ακριβέστερη αναγνώριση δειγμάτων που περιέχουν αιμόλυση, ινωδογόνο ή λιπαιμία. Η αιμόλυση, έτσι, είναι το αποτέλεσμα της διαταραχής των μεμβρανών των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs), τα οποία είναι ικανά να αντέχουν σε σημαντικές παραμορφωτικές τάσεις στη κυκλοφορία ενώ παραμένουν πιο ευαίσθητα στην επαπτόμενη τάση. Η αιμόλυση αναφέρεται στη ρήξη των ερυθρών αιμοσφαιρίων που προκαλούν απελευθέρωση κυτταροπλασματικών περιεχομένων στον ορό ή το πλάσμα. Όταν οι δυνάμεις είναι μεγαλύτερες του 300Pa τα ερυθρά αιμοσφαίρια λύνονται και αυξάνεται η μηχανική ευθραυστότητα. Είναι το πιο σύνηθες προ αναλυτικό σφάλμα που επηρεάζει το βιομηχανικό αποτέλεσμα, το οποίο ξεπερνιέται με τις διαδικασίες συλλογής, μεταφοράς και επεξεργασίας των δειγμάτων.

Η αιμόλυση είναι μια συχνή παρέμβαση σε πολλές εργαστηριακές δοκιμές. Οι δύο κύριοι μηχανισμοί παρεμβολής είναι η φασματική παρεμβολή από υψηλές συγκεντρώσεις αιμοσφαιρίνης και η άμεση απελευθέρωση από ερυθρά αιμοσφαίρια. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις αιμοσφαιρίνης, καλίου, μαγνησίου, σίδηρο, φωσφορικό άλας, γαλακτική αφυδρογονάση και ασπαρτική αμινοτρανσφεράση. Έτσι, οποιοσδήποτε βαθμός αιμόλυσης αυξάνει τεχνητά αυτές τις τιμές στον ορό και στο πλάσμα. Η φασματική

παρεμβολή προκαλείται από τη υψηλή συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της αιμόλυσης καθώς και της επίδραση αιμοσφαιρίνης στις μετρήσεις απορρόφησης. Η αιμόλυση αναγνωρίζεται εύκολα οπτικά, ή κατά προτίμηση χρησιμοποιώντας δείκτες ορού, οι οποίοι σημαίνουν αυτόματα δείγματα με αιμόλυση. Η αυτοματοποιημένη ανίχνευση της αιμόλυσης παρέχει πιο συνεπή αποτελέσματα από ότι η μεμονωμένη οπτική επιθεώρησης (McCudden, 2018). Η αιμόλυση μπορεί γενικά να διαιρεθεί είτε σε προ-φλεβοτομή (σε *in vivo* αιμόλυση) ή κατά τη διάρκεια της φλεβοτομής (*in vitro*) αιτίες.

Αιτίες της *in vivo* αιμόλυσης είναι πολυάριθμες και περιλαμβάνουν μικροβιολογικούς παράγοντες, προεκλαμψία, αιμολυτική αναιμία και εγγενή σφάλματα, όπως δρεπανοκυτταρική νόσος. Οι αιτίες *in vitro* συνήθως προκύπτουν από τη μηχανική θραύση μέσω εσφαλμένων μεγεθών βελόνας (δύναμη διάτμησης), υπερβολικής αναρρόφησης βελόνας, ή παρατεταμένη αποθήκευση. Για παράδειγμα, υποδεικνύοντας την ποσοτικοποίηση των περιοχών άλφα-2 / βήτα πρωτεϊνών ορού μπορεί να είναι ψευδώς αυξημένη λόγω παρουσίας αιμόλυσης (McCudden, 2018).

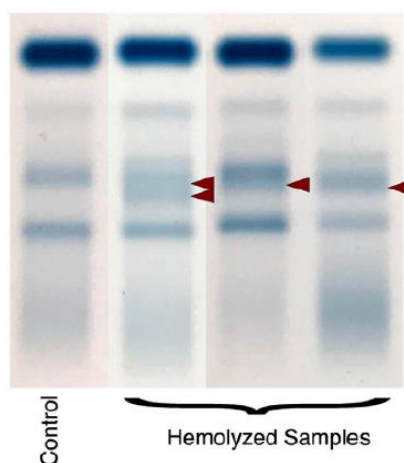


Fig. 2. Effect of hemolysis on SPE. Red arrows denote hemoglobin-haptoglobin complexes caused by gross hemolysis. Hemolysis typically increases the concentration of the alpha-2 and/or beta regions depending on the type of gel used (split beta vs. single beta). Such complexes are also evident by capillary electrophoresis. Immunofixation shows no evidence of a monoclonal protein. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Το ινωδογόνο γλυκοπρωτεΐνης είναι το υπόστρωμα θρομβίνης και διασπάται σε ινώδες για να σχηματίσει τον θρόμβο ινώδους στο τελικό στάδιο της πήξης. Σε περίπτωση επαρκούς προ-ανάλυσης, το ινωδογόνο δεν υπάρχει κανονικά σε δείγματα ορού. Εντούτοις, μπορεί να εντοπιστεί ινωδογόνο που υπάρχει στον

ορό ασθενών με διαταραχές της πήξης, ή σε ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με αντιπηκτική αγωγή. Όταν μετρητέ με SPE τεχνικές σε αυτά τα δείγματα, το ινωδογόνο μεταναστεύει στο β / γ ζώνη. Έτσι μπορεί να παρερμηνευθεί ως μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη. Η απουσία της φαινομενικής μονοκλωνικής πρωτεΐνης του Σχ. 1 που ακολουθεί ηλεκτροφόρηση ανοσοδιέγερσης, σε συνδυασμό με το χαρακτηριστικό εντοπισμό της ζώνης στην περιοχή β / γ, θα πρέπει να καθιερώσει τη ταυτότητα αυτής της ζώνης ως ινωδογόνου. Στη διαγνωστική πρακτική, έγκαιρη αναγνώριση αυτού του φαινομένου είναι σημαντικό ώστε να αποφευχθεί η εμφάνιση της μπάντας. Η SPE ταξινομείται εσφαλμένα ως μονοκλωνική πρωτεΐνη (Μ-πρωτεΐνη).

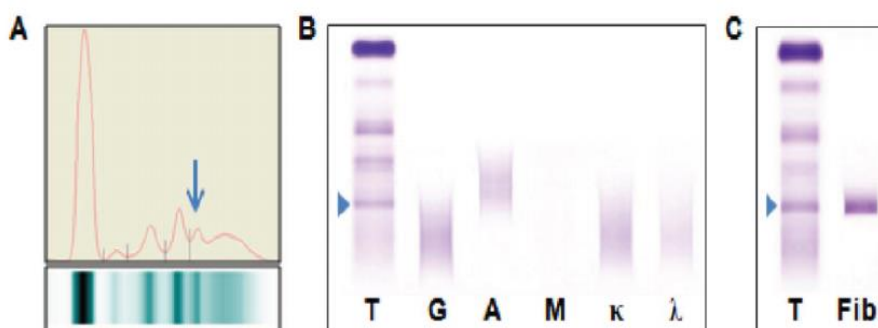


Fig. 1. Protein electrophoresis of serum sample with fibrinogen. A) Additional band of approximately 3 g/L (indicated by blue arrow) is observed with SPE that is located in the β/γ-fraction of the spectrum. B) IFE with anti-γ, α, μ, κ and λ sera illustrates that the focal band in the β/γ-region is not a monoclonal immunoglobulin. C) IFE with an antibody against fibrinogen provides proof that the band is caused by fibrinogen interference. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Αν και δεν διεξάγεται συνήθως στη διαγνωστική πρακτική, η IFE με αντι-ινωδογόνο αντισώματα όμως παρόλο αυτά παρέχει σταθερή απόδειξη ότι η ταινία είναι πράγματι ινωδογόνο.

Η λιπαιμία αναφέρεται στη θολότητα του δείγματος, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σωματιδίων λιποπρωτεϊνών ενώ το μέγεθός τους σε ένα διάλυμα είναι ένας σημαντικός παράγοντας που καθορίζει την ένταση του φωτός. Τα χυλομικρά είναι τα μεγαλύτερα σωματίδια λιποπρωτεϊνών με ακτίνα μικρότερη των 10000nm, η υψηλή συγκέντρωσή τους είναι η κύρια αιτία λιπαιμίας. Παράγοντες που προκαλούν λιπαιμία είναι η κατανάλωση λιπαρών γευμάτων σε λιγότερο από 10 ώρες πριν την αιμοληψία, η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ, ο σακχαρώδης διαβήτης, η νεφρική δυσλειτουργία, η ολική παρεντερική διατροφή, η χορήγηση φαρμάκων και τέλος η κληρονομικότητα (Farrell and Carter 2016). Για τη λιπαιμία μπορεί να αφαιρεθούν τα χυλομικρά από το δείγμα και να επαναληφθεί η

διαδικασία. Η αφαίρεση πραγματοποιείται με υψηλή φυγοκεντρική ταχύτητα ή επεξεργασία δείγματος με lipoclear.

Επιπρόσθετα, συχνό φαινόμενο είναι και η χρήση πλάσματος αντί ορού, όταν ο τελευταίος δεν είναι διαθέσιμος. Η διαφορά έγκειται στην ύπαρξη ινωδογόνου στο πλάσμα, το οποίο ενδέχεται να επιδρά κατά την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ζώνης όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ολοκληρώνοντας την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία καταλήγουμε στα ακόλουθα συμπεράσματα πάνω στην τεχνική της ηλεκτροφόρησης και στο ερευνητικό ερώτημα πάνω στο οποίο πραγματεύτηκε.

Τεκμηριώνεται ότι ουσίες ανταγωνίζονται τις ζώνες ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών των ασθενών, με συνέπεια μη σωστά ερμηνευτικά αποτελέσματα. Παρ' όλα αυτά κανένα άλλο τεστ δεν προσφέρει τέτοια ευαισθησία, επομένως θα πρέπει η τεχνική να ερμηνεύετε από έμπειρο εργαστηριακό προσωπικό καθώς είναι επιτακτική η ανάγκη έγκυρης διάγνωσης της παρεμβολής ώστε να αποφεύγονται περαιτέρω διερεύνηση, με ότι συνεπάγετε αυτό για τον ασθενή και καθυστέρηση στη σωστή διάγνωση. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με το ολοκληρωμένο και σωστό ιστορικό του ασθενή, με τη γνώση της θεραπείας που ακολουθεί και επιλογή σωστού πρωτόκολλου και συνδυασμού ηλεκτροφόρησης.

Μελλοντικές περεταίρω στοχευμένες έρευνες στην παρεμπόδιση της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών των ασθενών θα συνέβαλε σημαντικά στην διάγνωση και εργαστηριακή ρουτίνα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα έρευνα μελετά τους παράγοντες που παρεμποδίζουν την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών του αίματος. Πρόκειται για μια βιβλιογραφική έρευνα, η οποία πλαισιώνει το θέμα μέσω μιας σφαιρικής θεωρητικής προσέγγισης και αναφοράς σε μελέτες για το θέμα που διερευνάται.

Η έρευνα στηρίζεται στην τεχνική της ηλεκτροφόρησης και μελετά την παρεμπόδιση της από διάφορους παράγοντες είτε ενδογενείς είτε εξωγενείς και εστιάζει στην επιρροή των παραγόντων αυτών στα αποτελέσματα των μετρήσεων. Στους εξωγενείς παράγοντες διερευνάται εκτενέστερα εάν και κατά πόσο η λήψη φαρμάκων διαφοροποιεί το αποτέλεσμα της εξέτασης, μέσω της παρεμβολής τους στην καμπύλη της ηλεκτροφόρησης. Η θεραπεία που ακολουθεί κάποιος ασθενής μπορεί να ανταγωνίζεται τις ζώνες ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών των ασθενών, με συνέπεια μη σωστά ερμηνευτικά αποτέλεσμα.

Η ανάλυση των φαρμακευτικών ουσιών και οι έρευνες που παρατίθενται οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το ερευνητικό ερώτημα και η υπόθεση επιβεβαιώνονται, καθώς προκύπτει ότι το αποτέλεσμα της εξέτασης επηρεάζεται.

Λέξεις Κλειδιά: Ηλεκτροφόρηση, φαρμακευτικές ουσίες, ιστορικό ασθενούς

ABSTRACT

This essay aims to study the causes that inhibit electrophoresis of blood proteins. This is a bibliographic research that approaches the subject through a global theoretical reference to researches on the subject under investigation.

The research is based on the electrophoresis technique and studies its inhibition by various factors, either endogenous or exogenous, and focuses on the influence of these factors on the produced measurements. Exogenous factors are more extensively investigated whether or not drug intake differentiates the effect of the test by interfering with the electrophoresis curve. The treatment followed by a patient may intervene in the graph by giving a chart peak, resulting in misinterpretation and leading to incorrect results.

The analysis of the drugs and the researches listed lead to the conclusion that the research inquiry or research query and hypothesis are confirmed, as it turns out that the outcome of the test is affected.

Key words: Electrophoresis, pharmaceuticals, patient history

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anez – Subiela, S., et.al. (2002). Effects of Haemolysis, Lipaemia, Bilirubinaemia and Fibrinogen on Protein Electropherogram of Canine Samples Analysed by Capillary Zone Electrophoresis. Spain
- Annette, C.M. (2013). Clinical Applications of Capillary Electrophoresis-Based Immunoassays. PMC. p 937-955.
- AnnBiolClin. (2014). Does bilirubin interfere with capillary electrophoresis of serum proteins?France.
- Bakytzhan, B. (2012). Protective role of macrophage-derived ceruloplasmin in inflammatory bowel disease.
- Bossuyt, X. (2003). Separation of Serum Proteins by Automated Capillary Zone Electrophoresis. Clin Chem Lab Med**41**(6):762-772.
- Boujelbene, A., Hellara, I., Neffati, F., & Najjar, M. (2010). False bisalbuminemia and hyperalphafetoproteinemia.
- Busher, J.T. (1990).Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations: Butterworth
- C Angouridaki VP, V Tsavdaridou, M Giannousis, and S Alexiou-Daniel (2008). Detection of hereditary bisalbuminemia in a Greek family by capillary zone electrophoresis. Hippokratia 12(2):119-121.
- Cenaja O, JLD, DMB, JPL, PJ. (2018). 74-Year-old female with new monoclonal protein on serum immunofixation electrophoresis. Clinical Biochemistry 51: 97–100.
- Chao He, Xiaoyun Zhang. (2017). Changes of alpha-fetoprotein levels could predict recurrent hepatocellular carcinoma survival after trans-arterial chemoembolization.
- Chris, b. (2011). Making sense of serum protein bands. Best Practice Advocacy Centre New Zealand p2-9.
- Cologna, M. (2017). Isoelectric Point Separations of Peptides and Proteins. Proteomes **5**(1):4.
- David F KEREN,et.al 2003. Protein Electroforesis in Clinical Diagnosis
- Danny Ramos DM. 2016. Mechanism of Copper Uptake from Blood Plasma Ceruloplasmin by Mammalian Cells.
- Dong-Sheng Lian S-JZ. 2015. Capillary electrophoresis based on nucleic acid detection for diagnosing human infectious disease. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) 54(5).
- Eun-Mi Cho M, Hye-Hyun Moon, MD, Young-Ju Hwang, MD, Seung-Jin Lee, MD, Cheol Woo Ko, MD and Min Hyun Cho. (2013). Polyclonal gammopathy related to renal bleeding in a peritoneal dialysis patient. Korean Journal of Pediatrics 56(7):304-307.
- Farrell C-JL, Carter AC. (2016). Serum indices: managing assay interference.

- Garcez C CS. 2017. [Bisalbuminemia: A Rare Variant of Albumin]. *Acta Medica Portuguesa* 30(4):330-333.
- Gerard Tortora BF, Christine Case. 2009. *Microbiology an introduction*. A. T, translator: Π. Χ. Πασχαλίδης. 1905 p.
- Gerardo Álvarez LM, Laura Llorens, María Castro-Puyana, Alejandro Cifuentes. 2017. Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics. *ELECTROPHORESIS* 39(1):136-159.
- Hannah Holtkamp CGH. 2015. Capillary electrophoresis in metallodrug development. *Drug Discovery Today: Technologies* 16:16-22.
- HU Y. 1996. *The capillary electrophoresis*. New York: Springer-Verlag.
- Huan Yu XX, Jinying Sun, Tianyan You. 2012. Recent progress for capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Open Chemistry* 10(3).
- J. Craig T. 2015. Suspecting and Testing for Alpha-1 Antitrypsin Deficiency—An Allergist's and/or Immunologist's Perspective. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 3(4):506-511.
- Farrell, C.-J. L., & Carter, A. C. (2016). Serum indices: managing assay interference.
- Kuhire S. 2012. *Capillary Electrophoresis*
- Malcolm Brigden CV. 2014. Monoclonal gammopathy and primary care. *BC Medical journal* 56(1):14-22.
- Malik AK AJ, Kaur V. 2016. Metal Ions Analysis with Capillary Zone Electrophoresis. *Methods in Molecular Biology*:217-247.
- William Marshall - Stephen K. Bangert, 2008 Βιβλίο Κλινική Χημεία.
- María Ramos-Payán JAO-G, Rut M. Fernández-Torres, Andreu Llobera and Miguel Ángel Bello-López. 2017. Recent trends in capillary electrophoresis for complex samples analysis: A review. *ELECTROPHORESIS* 39(1):111-125.
- Medicine UL. 2010. *Laboratory Diagnosis of Protein Abnormalities*.
- Milger K HL, Teupser D, Huber RM, Behr J, Kneidinger N. 2015. Identification of a novel SERPINA-1 mutation causing alpha-1 antitrypsin deficiency in a patient with severe bronchiectasis and pulmonary embolism. *Dove medical press*. 891—897 p.
- Nilton Salles Rosa Neto JFdC. 2009. The use of inflammatory laboratory tests in rheumatology. *SciELO Analytics* 49(4).
- O'Neal' S. 2012. *Lymphoid and Plasma Cell Neoplasms*.
- Petersen, J. (2001). *Clinical and forensic applications of capillary electrophoresis*: Humana Press. 454 p.
- Phadke A. 2016. *Serum Protein Electrophoresis with Immunofixation*. Devyn Cornett.
- Pokhrel P. June 15, 2015. Differences between serum and plasma.

- Prachi R. Bapat ARS. 2015. Differential Levels of Alpha-2-Macroglobulin, Haptoglobin and Sero-Transferrin as Adjunct Markers for TB Diagnosis and Disease Progression in the Malnourished Tribal Population of Melghat, India.
- Rajat N. Moman SSB. October 6, 2017. Albumin.
- Sandhyarani N. 2016. Serum Vs. Plasma: The Comparison You Wanted to See.
- Saqib Walayat DM, Jaymon Patel, Umair Ahmed, Muhammad N. Asghar, Aparna U. Pai and Sonu Dhillon. 2017. Role of albumin in cirrhosis: from a hospitalist's perspective. *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives* 7(1):8-14.
- Sebastian Fähndrich FB. 2017 Sep 15. Cardiovascular risk in patients with alpha-1-antitrypsin deficiency.
- Shewale JG QL, Calandro LM. 2012. Principles, Practice, and Evolution of Capillary Electrophoresis as a Tool for Forensic DNA Analysis. *Forensic Science Review* 24(2):79-100.
- Sebia. (2017). Sebia signs agreement with Janssen Biotech to develop a multiple myeloma IVD test. Paris
- wikipedia. 2015. History of electrophoresis.
- ΒασιλειάδουΚΓ. 2015. Determination of several immune parameters in normal and arthritic rats, with or without treatment with honey bee venom. In: Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ). Σχολή Θετικών Επιστημών. Τμήμα Βιολογίας. Τομέας Γενετικής ΑκΜΒ, editor. p 137.
- Βικιπαίδεια. 2017. Νόσος του Γουίλσον.
- Γιώργος Κολιός ΧΚ, Ελένη Μπαϊρακτάρη, Ιωάννα Βλάχου. 2016. Capillaryelectrophoresis. 8ο Συνέδριο Κλινικής Χημείας.
- Ζήσος Μήτρος ΜΤ. 2014. Measure protein concentration with the Bca protein assay. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
- Ζώτου Α-Σ. 2015a. Ηλεκτροφόρηση βασικές αρχές – Σύγχρονη τεχνολογία Εφαρμογές στην κλινική χημεία. Βιοαναλυτική Χημεία: Κάλλιπος. p 1-31.
- Ζώτου Α-Σ. 2015b. Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση. Βιοαναλυτική χημεία: Εκδόσεις Κάλλιπος. p 37.
- Ζώτου Α-Σ. 2015c. Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση. Βιοαναλυτική Χημεία: Κάλλιπος. p 1-38.
- Κριαρά ΣΜ. 2015. Α1 αντιθρυψίνη.
- Λιανίδου Ε. 2015. Ηλεκτροφορητικές Τεχνικές. Ιωάννινα.
- Μιχαήλ Μ. 2015. Ερμηνεία αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών ορού. [pdf]. Κυπριακή Αιματολογική Εταιρεία.
- Μπανταδάκη Μ. χ.χ Επιμ. Α΄ Βιοπαθολόγος ΕργαστήριοΑνοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας Γ.Ν.Θ."Παπαγεωργίου" Παρουσίαση Κλασική εργαστηριακή προσέγγιση πλάσματοκυτταρικών δυσκρασιών.

Νταλαμάγκα Α. Μ. 2015. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, Πρακτική Εργαστηριακή Προσέγγιση.
<http://www.eibbde.gr/>.

Πουλάς Κωνσταντίνος ΣΣ. 2015. Εργαστηριακές Μέθοδοι Ανάλυσης Πρωτεϊνών. Σύνδεσμος
Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. p 121.