



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΩΝ, ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ
ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

**Φασματοφωτομετρική μελέτη της αλβουμίνης με
σκοπό την πρόταση βιοαισθητήρα για την
ανίχνευση της αλβουμιουρίας**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Παναγιώτης Δ. Γαρδέλης

Επιβλέπων: Ευάγγελος, Β, Χριστοφόρου

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Οκτώβριος 2022



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΩΝ, ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ
ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

**Φασματοφωτομετρική μελέτη της αλβουμίνης με σκοπό την
πρόταση βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της
αλβουμινουρίας**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Παναγιώτης Δ. Γαρδέλης

Επιβλέπων: Ευάγγελος, Β. Χριστοφόρου

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την 8^η Νοεμβρίου 2022

Ε. Χριστοφόρου
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Κ. Πολιτόπουλος
Αν. Καθηγητής Ε.Μ.Π

Γ. Ματσόπουλος
Καθηγητής Ε.Μ.Π

Αθήνα, Οκτώβριος 2022

.....
Παναγιώτης Δ. Γαρδέλης

Διπλωματούχος Ηλεκτρολόγος Μηχανικός και Μηχανικός Υπολογιστών Ε.Μ.Π.

Copyright © Παναγιώτης, Γαρδέλης, 2022

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ' ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Περίληψη

Εκτεταμένη ιατρική έρευνα έχει δείξει ότι ασθενείς που εμφανίζουν υψηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης στα ούρα, πάσχουν από διαφόρων ειδών νεφρικές παθήσεις, που αναφέρονται και ως πρωτεϊνουρία.

Ένας απ' τους πιο σημαντικότερους βιοδείκτες που εμφανίζονται στα ούρα, είναι η πρωτεΐνη human serum albumin (HSA), αλλιώς αλβουμίνη (ή λευκωματίνη). Η ύπαρξη της εν λόγω πρωτεΐνης στα ούρα σε αυξημένες συγκεντρώσεις, ονομάζεται αλβουμινουρία, και αποτελεί ένα σημαντικό κλινικό δείκτη σε ασθενείς με διαβήτη και καρδιαγγειακές νόσους. Η αλβουμινουρία, ανάλογα με τη συγκέντρωση της αλβουμίνης, διακρίνεται σε δύο κατηγορίες: την μικροαλβουμινουρία και την μακροαλβουμινουρία.

Η παρούσα διπλωματική εργασία, αποσκοπεί στην ποσοτικοποίηση της αλβουμίνης που βρίσκεται στα ούρα, με μία μη-επεμβατική και χωρίς-επισήμανση οπτική μέθοδο, εκμεταλλευόμενη τις οπτικές ιδιότητες της απορρόφησης και του φθορισμού της προκείμενης πρωτεΐνης, στο φάσμα της υπεριώδους (UV) και ορατής (Vis) ακτινοβολίας.

Απώτερος στόχος της εν λόγω πειραματικής μελέτης των οπτικών ιδιοτήτων της αλβουμίνης με τις μεθόδους της φασματομετρίας απορρόφησης και φασματομετρίας φθορισμού χωρίς επισήμανση της αναλυόμενης ουσίας είναι η μελλοντική εφαρμογή τους ως διαγνωστικά εργαλεία για την συστηματικότερη παρακολούθηση της αλβουμινουρίας, με τη χρήση ενός χαμηλού κόστους φορητού βιοαισθητήρα, χωρίς τη χρεία ειδικά εξοπλισμένων κλινικών ή εργαστηρίων με εξειδικευμένο προσωπικό, στο οποίο θα έχει πρόσβαση το ευρύτερο κοινό για κατ' οίκον εξέταση. Πιο συγκεκριμένα, η επαναλαμβανόμενη ανίχνευση υψηλών συγκεντρώσεων αλβουμίνης με την παραπάνω διάταξη, θα αποτελέσει ένα ασφαλές προγνωστικό εργαλείο με στόχο την αντιμετώπιση της αλβουμινουρίας σε πρώιμο στάδιο.

Λέξεις κλειδιά: πρωτεΐνες, βιοδείκτες, αλβουμίνη, απορρόφηση, φθορισμός, βιοαισθητήρας

Abstract

Extensive medical research showed that patients, with high protein concentration in urine, have various kinds of kidney diseases, referred to as proteinuria.

One of the most important biomarkers that appear in urine is the protein human serum albumin (HSA). The presence of this protein in the urine in increased concentrations is called albuminuria, and is a clinical marker in patients with diabetes and cardiovascular diseases. Albuminuria, depending on the concentration of albumin, is divided into two categories: microalbuminuria and macroalbuminuria.

This thesis aims at the quantitative determination of albumin found in urine, with a non-invasive and label-free optical method, exploiting the absorption and fluorescence optical properties of this protein, in the ultraviolet (UV) and visible (Vis) radiation.

The ultimate goal of this experimental study of the optical properties of albumin with the methods of absorption spectrometry and fluorescence spectrometry without labeling the analyte, is their future application as diagnostic tools for more systematic monitoring of albuminuria, using a low-cost portable biosensor, without the need for specially equipped clinics or laboratories with specialized personnel, to which the general public will have access for home examination. More specifically, the repeated detection of high albumin concentrations with the above arrangement will be a safe prognostic tool aimed at treating albuminuria at an early stage.

Key words: proteins, biomarkers, albumin, absorption, fluorescence, biosensor

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή μου Ευάγγελο Χριστοφόρου, Καθηγητή Ε.Μ.Π, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τη δυνατότητα να ασχοληθώ με το παρόν θέμα, καθ' υπόδειξίν του. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την διάθεση συνεργασίας και τις συμβουλές του.

Ευχαριστώ εγκάρδια την Δρ. Ελένη Αλεξανδράτου, μέλος του εργαστηριακού και διδακτικού προσωπικού (Ε.ΔΙ.Π) του Ε.Μ.Π, για την πολύτιμη καθοδήγηση της καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της διπλωματικής μου εργασίας. Με τη στήριξη της κατάφερα να συγκεντρώσω πολύτιμες γνώσεις γύρω από τη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία. Χωρίς τη βοήθεια και την προθυμία της για την αντιμετώπιση των δυσκολιών που προέκυψαν τίποτα δεν θα ήταν εφικτό.

Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω τους γονείς μου Δημήτρη και Ιωάννα για την αμέριστη υποστήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, αλλά και τους φίλους μου και συμφοιτητές Δημήτρη, Ναυσικά, Χρήστο Δ., Μαρία, Δρόσο, Κώστα, Χρήστο Σ., για την βοήθεια που μου προσέφεραν και τη συνεργασία τους. Τους ευχαριστώ όλους θερμά!

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	5
Abstract.....	6
Ευχαριστίες.....	9
Πίνακας Περιεχομένων.....	12
Ευρετήριο Εικόνων.....	15
Ευρετήριο Πινάκων.....	17
Κεφάλαιο Α: Πρωτεϊνική ανάλυση ούρων.....	19
Α.1 Πρωτεϊνική σύσταση ούρων.....	20
Α.2 Τα ούρα ως διαγνωστικό εργαλείο.....	21
Α.3 Πρωτεϊνικοί βιοδείκτες ούρων.....	22
Α.4 Πρωτεϊνουρία.....	23
Κεφάλαιο Β: Μέθοδοι Διαχωρισμού Πρωτεϊνών.....	25
Β.1 Ηλεκτροφόρηση (Electrophoresis).....	26
Β.2 Χρωματογραφία (Chromatography).....	29
Κεφάλαιο Γ: Μέθοδοι Ανίχνευσης Αλβουμινουρίας.....	36
Γ.1 Συμβατικές Μέθοδοι Ανίχνευσης Αλβουμινουρίας.....	37
Γ.1.1 Ταινίες εμβάπτισης αλβουμίνης (Albumin Dipsticks).....	37
Γ.1.2 Φασματομετρία μάζας (Mass spectrometry).....	38
Γ.1.3 Ανοσοδοκιμασία (Immunoassay).....	40
Γ.1.4 Φασματομετρία Υπέρυθρων και φασματομετρία Raman (The Infrared and Raman spectroscopies).....	44

Γ.2 Φασματοσκοπικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία	47
Γ.2.1 Φασματομετρία Φθορισμού (Fluorescence spectroscopy).....	47
Γ.2.2 Φασματομετρία απορρόφησης υπεριώδους – ορατού (UV/Vis absorption spectrometry).....	51
Γ.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα UV/Vis φασματομετρίας απορρόφησης και φασματομετρίας φθορισμού.....	54
Κεφάλαιο Δ: Πειραματικές διατάξεις και ουσίες.....	58
Δ.1 Σκοπός της πειραματικής μελέτης.....	59
Δ.2 Πειραματικές Διατάξεις.....	60
Δ.2.1 Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης	60
Δ.2.1.1 Εισαγωγή.....	60
Δ.2.1.2 Χαρακτηριστικά.....	60
Δ.2.2 Φασματοσκοπική διάταξη φθορισμού.....	61
Δ.3 Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν.....	64
Δ.3.1 Human Serum Albumin.....	68
Κεφάλαιο Ε: Αποτελέσματα και Συμπεράσματα.....	70
Ε.1 Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης.....	71
Ε.2 Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού.....	76
Κεφάλαιο Ζ: Γενικά Συμπεράσματα.....	79
Ζ.1 Απορρόφηση της αλβουμίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις σε διάλυμα φυσιολογικού ορού.....	80
Ζ.2 Φθορισμός της αλβουμίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις σε διάλυμα φυσιολογικού ορού.....	80
Ζ.3 Προτάσεις για το μέλλον.....	81

Ευρετήριο Εικόνων

<i>Εικόνα 1: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.....</i>	<i>27</i>
<i>Εικόνα 2: Χρώση των πρωτεϊνών μετά την ηλεκτροφόρηση.....</i>	<i>28</i>
<i>Εικόνα 3: Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να προσδιορίσει την μάζα των πρωτεϊνών.....</i>	<i>29</i>
<i>Εικόνα 4: Χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή.....</i>	<i>31</i>
<i>Εικόνα 5: Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.....</i>	<i>32</i>
<i>Εικόνα 6: Χρωματογραφία συγγένειας.....</i>	<i>33</i>
<i>Εικόνα 7: Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC).....</i>	<i>35</i>
<i>Εικόνα 8: Διάγραμμα ανάλυσης ούρων με τη χρήση ταινίας εμβάπτισης.....</i>	<i>38</i>
<i>Εικόνα 9: Βασικά μέρη φασματομέτρου μάζας.....</i>	<i>39</i>
<i>Εικόνα 10: Τεχνικές μεθόδου ELISA.....</i>	<i>42</i>
<i>Εικόνα 11: Σχηματικό διάγραμμα ανταγωνιστικής ανοσοδοκιμασίας.....</i>	<i>43</i>
<i>Εικόνα 12: Διάγραμμα οπτικού τμήματος φασματομέτρου IR.....</i>	<i>44</i>
<i>Εικόνα 13: Φάσμα Raman.....</i>	<i>47</i>
<i>Εικόνα 14: Διάγραμμα Jablonski.....</i>	<i>49</i>
<i>Εικόνα 15: Φάσμα απορρόφησης και εκπομπής ενός φθοροφόρου.....</i>	<i>50</i>
<i>Εικόνα 16: Ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις από μοριακά δεσμικά ή μη δεσμικά τροχιακά χαμηλής ενέργειας σε αντιδεσμικά τροχιακά υψηλότερης ενέργειας.....</i>	<i>51</i>
<i>Εικόνα 17: Απορρόφηση ακτινοβολίας από ένα δείγμα.....</i>	<i>52</i>
<i>Εικόνα 18: UV/Vis φασματοφωτόμετρο απλής δέσμης.....</i>	<i>53</i>
<i>Εικόνα 19: UV/Vis φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης.....</i>	<i>53</i>
<i>Εικόνα 20: Perkin - Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer.....</i>	<i>60</i>

Εικόνα 21: Οπτικό διάγραμμα που φασματοφωτομέτρου Perkin - Elmer	
<i>Lambda 35UV/VIS</i>	61
Εικόνα 22: Χαρακτηριστικά φασματοφωτομέτρου Perkin - Elmer	
<i>Lambda 35 UV/VIS</i>	61
Εικόνα 23: Υποδοχείς κυβετών του οργάνου.....	63
Εικόνα 24: Το φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin-Elmer LS 45	
<i>Luminescence Spectrometer</i>	64
Εικόνα 25: Υποδοχή κυβέτας οργάνου.....	65
Εικόνα 26: Οπτικό διάγραμμα Perkin-Elmer LS 45	
<i>Luminescence Spectrometer</i>	65
Εικόνα 27: Μοριακή δομή της αλβουμίνης.....	68

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Μέγιστη απορρόφηση αλβουμίνης στις διάφορες συγκεντρώσεις
στο ισχυρό μέγιστο..... 73

Πίνακας 2: Μέγιστη απορρόφηση αλβουμίνης στις διάφορες συγκεντρώσεις
στο ασθενές μέγιστο..... 75

Πίνακας 3: Μέγιστος φθορισμός αλβουμίνης στις διάφορες συγκεντρώσεις..... 77

Μέρος πρώτο

Θεωρητικό κομμάτι

Κεφάλαιο Α: Πρωτεϊνική ανάλυση ούρων

A.1 Πρωτεϊνική σύσταση ούρων

Τα ούρα είναι ένα άμεσα διαθέσιμο υγρό που προσφέρεται για την ιατρική διάγνωση ποικίλων ασθενειών. Οι πρωτεϊνικές εξετάσεις ούρων είναι μη επεμβατικές διαδικασίες που δεν περιλαμβάνουν πόνο ή δυσφορία για τους ασθενείς και στοχεύουν στον προσδιορισμό προβλημάτων σχετικά με τη νεφρική λειτουργία, αφού εκτεταμένη ιατρική έρευνα έδειξε ότι οι ασθενείς με υψηλή πρωτεϊνική συγκέντρωση ούρων, πάσχουν από διάφορων ειδών νεφρικές παθήσεις (πρωτεϊνουρία) [1]. Έτσι ο ακριβής και απλός προσδιορισμός της ολικής πρωτεΐνης στα ούρα είναι σημαντικός για διαγνωστικούς σκοπούς.

Δεδομένου ότι τα ούρα είναι μια πολύπλοκη μήτρα, θέτονται προκλήσεις για τον αναλυτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών και άλλων συστατικών. Μεταξύ άλλων, οι λόγοι που καθιστούν τα ούρα δύσκολα στην ερευνητική μελέτη είναι ότι αποτελούνται από διάφορες ανόργανες και οργανικές ενώσεις, από μόρια χαμηλής μοριακής μάζας έως πολυμερή. Μπορούν, ακόμα, σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, να περιέχουν κύτταρα, όπως ερυθρά αιμοσφαίρια, ή βακτήρια, τα οποία αλλάζουν δραστικά τη σύστασή τους. Επιπλέον, είναι σημαντικό να σημειωθεί πως η πρωτεϊνική συγκέντρωση ούρων ποικίλει από ασθενή σε ασθενή ανάλογα με την διατροφή, την σωματική άσκηση καθώς και την ώρα και μέρα της ούρησης. Επομένως, μια αναλυτική μέθοδος διάγνωσης της πρωτεϊνουρίας θα πρέπει να καλύπτει την παρουσία πρωτεΐνης, γενικότερα, και αλβουμίνης, ειδικότερα, στα ούρα σε ένα ευρύ φάσμα.

Φυσιολογικά, η αλβουμίνη μαζί με την πρωτεΐνη Tamm–Horsfall (επίσης γνωστή και ως ουρομοντουλίνη), είναι οι δύο πρωτεΐνες με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στα ούρα. Μεταξύ άλλων πρωτεϊνών στα ούρα υπάρχουν και οι: α1-γλυκοπρωτεΐνη, α1-μικρογλομπουλίνη, β2- μικρογλομπουλίνη και ίχνη της γ- γλομπουλίνης.

A.2 Τα ούρα ως διαγνωστικό εργαλείο

Γνωρίζουμε ότι τα ούρα ενός υγιούς ατόμου περιέχουν έως και 150 mg πρωτεΐνης σε συνολική μέτρηση μες στη διάρκεια μιας ημέρας, εκ των οποίων περίπου τα 20 mg είναι αλβουμίνη (human serum albumin). Απέκκριση αλβουμίνης 30-300 mg ημερησίως, ονομάζεται μικροαλβουμινουρία και αποτελεί έναν ευαίσθητο δείκτη διαβητικής νεφροπάθειας, καρδιαγγειακής και νεφρικής νόσου [2,3]. Συγκέντρωση αλβουμίνης στα ούρα ίση με 20-30 mg/24-ωρο (ή 20-30 mg/1,5L κατά μέσο όρο) είναι μια κρίσιμη συγκέντρωση που θα μπορούσε να υποδεικνύει προβλήματα στους νεφρούς όταν ξεπερνιέται επανειλημμένα [4]. Αν και μια από τις κύριες πρωτεΐνες των ούρων είναι η αλβουμίνη, υπάρχουν χιλιάδες άλλοι τύποι πρωτεϊνών. Επιπλέον, η απομάκρυνσή της, βοηθά στον προσδιορισμό των πρωτεϊνών που βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στα ούρα. Ο Marimuthu κ.α. χρησιμοποιώντας τη μέθοδο high-resolution Fourier transform mass spectrometry ήταν σε θέση να ταυτοποιήσουν 1823 πρωτεΐνες στα ούρα υγιών ατόμων [5]. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες που ανακαλύφθηκαν θα μπορούσαν να είναι δυνητικοί βιοδείκτες για ασθένειες. Σε μια ερευνητική εργασία του Rothlisberger κ.α. αναφέρθηκε ότι εκτός απ' την αλβουμίνη, άλλες πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων οι CD14, hh-FABP, BNP/NT-proBNP, NGAL, ORM1 είναι πιθανοί βιοδείκτες καρδιαγγειακής νόσου. Ένας άλλος βιοδείκτης σε ανθρώπινα ούρα, η πρωτεΐνη Bence Jones (BJP), έχει σημαντική διαγνωστική και προγνωστική αξία για πολλαπλό μύελωμα και καρκίνο του πλασματοκύτταρου [6]. Άλλοι τύποι χημικών ουσιών στα ούρα μπορεί επίσης να είναι σημαντικοί βιοδείκτες, για παράδειγμα, microRNAs των ούρων έχουν τη δυνατότητα να αποτελέσουν έναν έγκυρο δείκτη για την ανίχνευση καρκίνου της ουροδόχου κύστης [7].

Επομένως, εκτός από τις νεφρικές παθήσεις, τα ούρα μπορεί επίσης να είναι μια χρήσιμη πηγή πληροφοριών σχετικά με διαφόρων ειδών καρκίνο καθώς και μη νεφρικές παθήσεις. Ο Theodorescu κ.α. βρήκαν τους βιοδείκτες των ούρων που σχετίζονται με το ουροθηλιακό καρκίνωμα, ο οποίος είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου της ουροδόχου κύστης [8]. Ο Bhasin κ.α. ανέπτυξαν έναν βιοαισθητήρα για την ανίχνευση του δείκτη καρκίνου της ουροδόχου κύστης DJ-1 στα ούρα σε

συγκέντρωση 10 pM σε 1 λεπτό [9]. Σε μια άλλη ερευνητική εργασία που σχετίζεται με μη νεφρική νόσο, ο Zimmerli κ.α. ερεύνησαν δείγματα ούρων ασθενών με στεφανιαία νόσο [10]. Ο Rossing κ.α. εντόπισαν πιθανούς βιοδείκτες για διαβήτη [11]. Ο Raja κ.α. μελέτησαν την πιθανότητα της αλβουμίνης ως βιοδείκτη διαβητικών επιπλοκών [12]. Επιπλέον, οι ερευνητές θα μπορούσαν να διαγνώσουν ασθενείς με ιούς από τα δείγματα ούρων τους. Ο Robles κ.α ανέλυσαν ιούς που υπάρχουν στα ούρα από ασθενείς με διάμεση κυστίτιδα [13]. Ο Niedrig κ.α έγραψαν μια κριτική σχετικά με τη χρησιμότητα του σάλιου και των ούρων για τη διάγνωση των αναδυόμενων ιών [14]. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι είναι σημαντικό να διεξαχθεί μια έρευνα χρησιμοποιώντας μη επεμβατικές προσεγγίσεις, όπως τα ούρα μπορούν να παράσχουν, για τη διάγνωση των αναδυόμενων ιογενών ασθενειών. Επομένως, είναι φανερό πως τα ούρα, μπορούν να αποτελέσουν ένα διαγνωστικό εργαλείο τόσο για νεφρικές παθήσεις όσο και για καρδιαγγειακές νόσους, διαφόρων ειδών καρκίνο, διαβήτη, ιούς, λοιμώξεις κ.α.

A.3 Πρωτεϊνικοί βιοδείκτες ούρων

Τα ανθρώπινα ούρα περιέχουν χιλιάδες διαφορετικές πρωτεΐνες [15,16]. Η υψηλή παρουσία ορισμένων εξ αυτών συνδέεται με ορισμένες ασθένειες σχετικές όχι μόνο με νεφρικές παθήσεις, αλλά και με καρκίνο, διαβήτη και λοιμώξεις. Αυτά τα μόρια που συνδέονται με μια ορισμένη παθολογική κατάσταση ονομάζονται βιοδείκτες. Οι περισσότεροι από αυτούς τους βιοδείκτες στα ανθρώπινα ούρα, ταυτοποιήθηκαν συγκρίνοντας ασθενείς με υγιή άτομα με τις μεθόδους της χρωματογραφίας ή του ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού ακολουθούμενες από φασματοσκοπία μάζας ή απ' την ανοσοδοκιμασία (οι μέθοδοι εξηγούνται παρακάτω). Ορισμένα συμπεράσματα που έχουν διεξαχθεί βιβλιογραφικά απ' τη μελέτη των εν λόγω βιοδεικτών είναι:

- Η ανάλυση πρωτεΐνης ούρων είναι χρήσιμη όχι μόνο για νεφρικές παθήσεις. Πρωτεϊνικοί βιοδείκτες ούρων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διαγνωστική προσέγγιση τουλάχιστον 15 παθολογικών

καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένων 8 ειδών καρκίνου, 5 ειδών νεφρικών επιπλοκών και τουλάχιστον 3 διαφορετικών λοιμώξεων. Η λίστα με τις επιπλοκές στην υγεία που μπορεί να διαγνωστεί από την ανάλυση ούρων είναι μεγαλύτερη εάν περιλαμβάνονται και μη πρωτεϊνικές ουσίες, όπως πεπτίδια, νουκλεϊκά οξέα, χαμηλής μοριακής μάζας ταβολίτες κ.λπ. όπως αναφέρεται σε διάφορες επιστημονικές εργασίες [17,18,19,20].

- Νέοι δυνητικοί βιοδείκτες πρωτεΐνης ούρων εντοπίζονται κυρίως με τη μέθοδο της φασματομετρίας μάζας (ως επί το πλείστον σε συνδυασμό με χρωματογραφία), σήμερα. Οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι, ωστόσο, είναι αυτές τις ανοσοδοκιμασίας, εξαιτίας του χαμηλού κόστους και της ευκολίας τους σε σύγκριση με τη χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας, στις οποίες θα αναφερθούμε και παρακάτω [21].

A.4 Πρωτεϊνουρία

Η πρωτεϊνουρία είναι η κύρια κλινική εκδήλωση των σπειραματικών παθήσεων. Τα σπειράματα είναι πολύπλοκα τριχοειδή που βρίσκονται στους νεφρώνες – νεφρικά κύτταρα [22]. Οι σπειραματικές παθήσεις μπορεί να είναι, πρωτοπαθείς, όταν η ασθένεια προκαλείται από ασθένειες των νεφρών (όπως η σπειραματονεφρίτιδα), ή δευτεροπαθείς, όταν το νεφρικό σπειράμα γίνεται όργανο-στόχος που επηρεάζεται από διάφορες ασθένειες όπως ο διαβήτης και οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι αυτοάνοσες και φλεγμονώδεις διαταραχές, αμυλοείδωση και νεοπλάσματα, καρκίνος και πολλά άλλα, συμπεριλαμβανομένων των γενετικών διαταραχών [22,23]. Τα επίπεδα της πρωτεϊνουρίας που συνήθως μετρούνται σε κλινικές συνθήκες, μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με τη σοβαρότητα της νόσου και τη σπειραματική βλάβη, παρά την όποια αιτία της ασθένειας. Οποιαδήποτε ανιχνεύσιμη πρωτεϊνουρία στα ούρα συγκεντρώσεως μεταξύ 30-300 mg/24ωρο ονομάζεται αλβουμινουρία (ή μικροαλβουμινουρία), ενώ πάνω από τα 300 mg/24h – πρωτεϊνουρία (ή μακροαλβουμινουρία).

Ανάλογα με την βαρύτητα της πρωτεϊνουρίας, συνηθίζεται να ονομάζεται πρωτεϊνουρία νεφριτιδικού εύρους κάτω από 3,5 g/24h και πρωτεϊνουρία νεφρωσικού εύρους όταν η εκκρινόμενη πρωτεΐνη υπερβαίνει τα 3,5 g/24h (βαριά πρωτεϊνουρία). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η πρωτεϊνουρία που προκαλείται από καρδιαγγειακές παθήσεις περιορίζεται σε πρωτεϊνουρία νεφριτιδικού εύρους (νεφριτιδικό σύνδρομο), ενώ αντίθετα σε νεφρικές παθήσεις και καρκίνο η πρωτεϊνουρία μπορεί να φτάσει το νεφρωσικό εύρος πρωτεϊνουρίας (νευρωσικό σύνδρομο) [24,25]. Επειδή τα ούρα σχηματίζονται στους νεφρούς, η ανάλυση των ούρων είναι σημαντική για τη διάγνωση νεφρικών παθήσεων, όπως π.χ. η χρόνια νεφρική νόσος. Αρκετές ιογενείς λοιμώξεις όπως ο ιός Epstein-Barr, ιοί ηπατίτιδας Β και C, έρπης ζωστήρας, COVID-19 και πολλοί άλλοι, επίσης, μπορεί να οδηγήσουν σε πρωτεϊνουρία [26,27]. Οι πιθανοί μηχανισμοί της πρωτεϊνουρίας σχετίζονται με πρωτογενή προσβολή στο σπειράμα ή/και δευτερογενή, στην αυτοάνοση απόκριση στη μόλυνση [28,29]. Η χρόνια νεφρική νόσος (ΧΝΝ) είναι ένα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας. Αλβουμινουρία, ανωμαλία ιζήματος ούρων και άλλοι δείκτες νεφρικής βλάβης αποτελούν κριτήρια της ΧΝΝ, σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες γραμμές [30]. Ο Fassett κ.α. συνόψισαν τους βιοδείκτες για την ΧΝΝ στα ούρα, μεταξύ άλλων και οι : cystatin C, β -trace protein, NGAL, KIM-1, NAG [31]. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, υπολογίστηκε το 2003 ότι το 11% του ενήλικου πληθυσμού (ηλικίας 20 ετών και άνω) έχει χρόνια νεφρική νόσο [32]. Σε μια ανασκόπηση σχετικά με την ΧΝΝ από τον Zhang κ.α. , οι συγγραφείς μελέτησαν σχετικά δεδομένα στην Αμερική, την Ευρώπη, την Ασία και την Αυστραλία [33]. Ανέφεραν ότι ο επιπολασμός της ΧΝΝ ήταν 7,2% σε άτομα ηλικίας 30 ετών και άνω. Σε άτομα ηλικίας 64 ετών και άνω, ο επιπολασμός της ΧΝΝ κυμαινόταν από 23,4% έως 35,8%. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι παγκοσμίως, η ΧΝΝ γίνεται μια κοινή ασθένεια στον γενικό πληθυσμό.

Κεφάλαιο Β: Μέθοδοι Διαχωρισμού Πρωτεϊνών

B.1 Ηλεκτροφόρηση (Electrophoresis)

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ηλεκτροκινητική διαδικασία, η οποία διαχωρίζει φορτισμένα σωματίδια (μακρομόρια, όπως πρωτεΐνες) σε ένα ρευστό χρησιμοποιώντας ένα πεδίο ηλεκτρικού φορτίου [34]. Τα σωματίδια θα μπορούσαν να διαχωριστούν με βάση το φορτίο ή τη μάζα τους. Η εν λόγω μέθοδος είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος σε ένα σύγχρονο ερευνητικό εργαστήριο, αλλά όχι τόσο σε ένα κλινικό εργαστήριο. Η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται συνήθως για ανάλυση πρωτεϊνών, πεπτιδίων και νουκλεϊκών οξέων [35]. Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να εφαρμοστεί ως ποιοτική ή ποσοτική αναλυτική τεχνική από μόνη της, εάν δίνεται μια ουσία αναφοράς, ή ως τεχνική διαχωρισμού σε ένα δείγμα που θα εξεταστεί περαιτέρω με άλλες τεχνικές, όπως φασματομετρία μάζας, φασματομετρία φθορισμού κ.λπ.

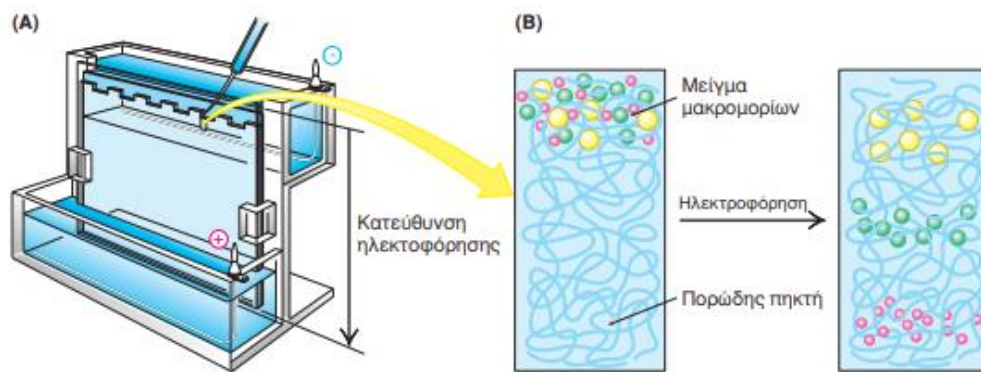
Η κύρια χρησιμοποιούμενη μέθοδος ηλεκτροφόρησης για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών είναι η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, ένα μόριο με καθαρό φορτίο, θα μετακινηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα (u) μετακίνησης της πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z) και το συντελεστή τριβής (f).

$$u = E \frac{z}{f}$$

Η ηλεκτροστατική δύναμη Ez που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι αντίθετη της τριβής fu , που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου που μετακινείται και του μέσου.

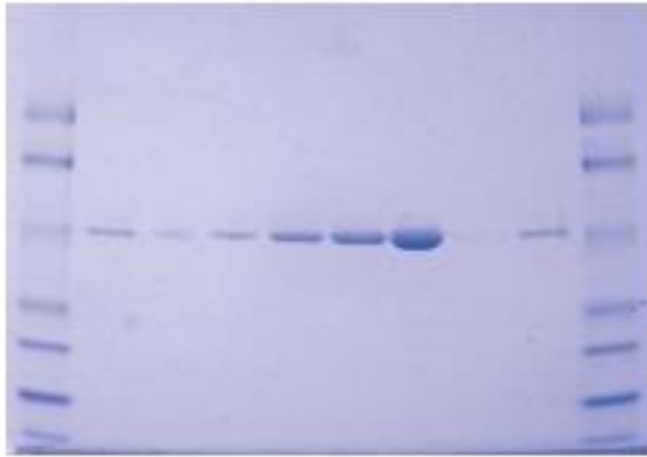
Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σχεδόν πάντοτε σε πηκτή, η οποία λειτουργεί ως μοριακός ηθμός, που ενισχύει το διαχωρισμό. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα δια μέσου αυτής, ενώ τα μεγάλα μόρια μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους, μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες. Το ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται έτσι ώστε οι πρωτεΐνες να μετατοπίζονται από το αρνητικό στο θετικό. Η

ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε μια λεπτή κατακόρυφη πλάκα πολυακρυλαμιδίου. Η κατεύθυνση ροής είναι από επάνω προς τα κάτω. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου προτιμάται διότι το υλικό είναι χημικά ουδέτερο και η παρασκευή της πηκτής εύκολη. Το ακρυλαμίδιο πολυμερίζεται με διασύνδεση μεθυλενο-δισακρυλαμιδίου.

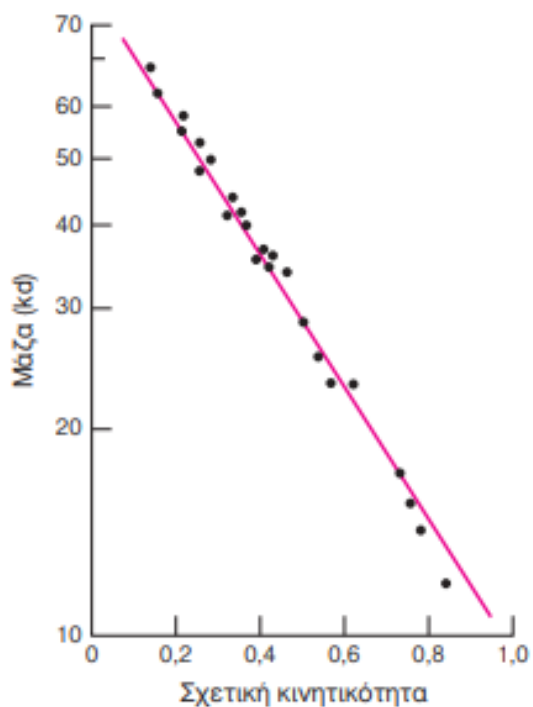


Εικόνα 1: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. (A) Μια συσκευή ηλεκτροφόρησης σε πηκτή. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε αρκετά δείγματα συγχρόνως με αυτήν την επίπεδη συσκευή, ενώ τα μείγματα των πρωτεϊνών τοποθετούνται στις εσοχές που δημιουργήθηκαν στην άνω πηκτή με τη χρήση ενός σιφωνίου ακρίβειας μικρολίτρων. Μετά την τοποθέτηση του άνω μέρους της συσκευής μπορούμε να συνδέσουμε το σύστημα στο ηλεκτρικό ρεύμα. Το ρεύμα περνώντας μέσα από την πηκτή αναγκάζει το σύμπλοκο πρωτεΐνης-SDS (sodium dodecyl sulfate = δωδεκακυλο-θειικό νάτριο) που έχει αρνητικό φορτίο να μετακινηθεί προς την άνοδο που βρίσκεται στο κάτω μέρος της συσκευής. (B) Καθώς οι πρωτεΐνες μετακινούνται μέσω της πηκτής η απόσταση που διανύουν ανά μονάδα χρόνου είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους, επομένως οι μικρότερες μετακινούνται ταχύτερα προς την άνοδο.

Στην ηλεκτροφόρηση παρατηρούμε το αντίθετο από ό,τι στη χρωματογραφία πηκτής διότι όλα τα μόρια, ανεξάρτητα από το μέγεθός τους, αναγκάζονται να μετακινηθούν μέσω της πηκτής. Η πηκτή συμπεριφέρεται σαν ένας κόκκος της στήλης χρωματογραφίας (όπως θα δούμε παρακάτω). Σε μια ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου κάτω από συνθήκες αποδιάταξης, οι πρωτεΐνες είναι δυνατόν να διαχωριστούν κυρίως βάσει της μάζας τους.



Εικόνα 2: Χρώση των πρωτεϊνών μετά την ηλεκτροφόρηση. Οι πρωτεΐνες που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου μπορούν να εμφανιστούν με χρώση με κυανούν του Coomassie.



Εικόνα 3: Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να προσδιορίσει την μάζα των πρωτεϊνών. Η κινητικότητα πολλών πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου είναι αντιστρόφως ανάλογη προς τον λογάριθμο της μάζας τους.

Η ηλεκτροφόρηση στις πρωτεΐνες των ούρων, πραγματοποιείται συνήθως κατά τη διάρκεια της εξέτασης ασθενών με υποψία μυελώματος και κατά την παρακολούθηση της δραστηριότητας της νόσου. Τα ούρα φυσιολογικά δεν περιέχουν

μεγάλες ποσότητες πρωτεΐνης, δηλαδή τα υγιή άτομα εκκρίνουν ποσότητες μικρότερες των 150 mg/24 h. Το σπείραμα χρησιμεύει ως φραγμός στις πρωτεΐνες, κρατά αποτελεσματικά τις μεγαλύτερες πρωτεΐνες (> 100 kDa), επιτρέπει ελεύθερα μικρότερες πρωτεΐνες (< 10-15 kDa) και επιλεκτικά συγκρατεί πρωτεΐνες μεσαίου μεγέθους. Φυσιολογικά, ένα μέρος των πρωτεϊνών μικρού μοριακού βάρους που διέρχονται ελεύθερα από το σπείραμα, επανααρροφώνται εύκολα από τα εγγύς σπειραμένα σωληνάρια. Διάφορες παθολογικές καταστάσεις τροποποιούν την ποσότητα και το προφίλ των πρωτεϊνών των ούρων δημιουργώντας μοναδικά ηλεκτροφορητικά προφίλ. Αυτές περιλαμβάνουν τις εξής:

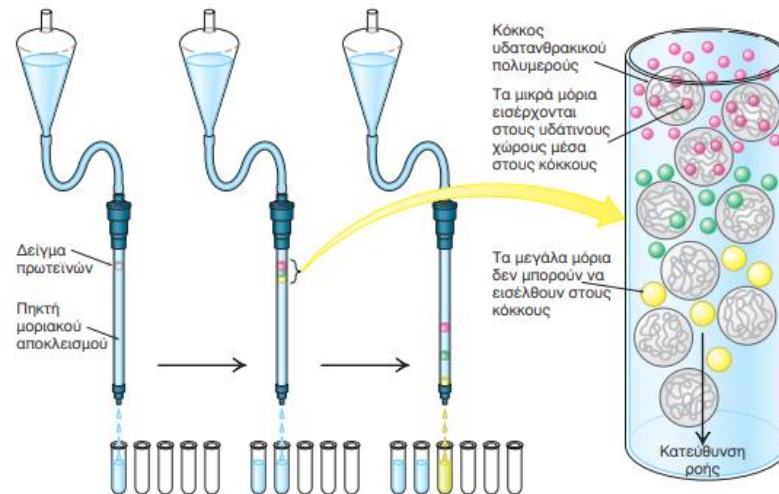
- Σπειραματική πρωτεϊνουρία:
 - α) Επιλεκτική πρωτεϊνουρία: υψηλή παρουσία κυρίως αλβουμίνης (π.χ. νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων)
 - β) Μη επιλεκτική: αντανακλά όλες τις πρωτεΐνες του πλάσματος (π.χ. διαβήτης, FSGS)
- Σωληναριακή πρωτεϊνουρία: Παρουσία κυρίως πρωτεΐνης Tamm-Horsfall και β2-μικροσφαιρίνης (π.χ. χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, υπέρταση)
- Ανώμαλες πρωτεΐνες: Ελαφρές αλυσίδες κ ή λ (π.χ. πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες)

B.2 Χρωματογραφία (Chromatography)

Μια άλλη ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική διαχωρισμού πρωτεϊνών είναι η χρωματογραφία. Η χρωματογραφία περιλαμβάνει σειρά μεθόδων διαχωρισμού μιγμάτων ανόργανων ή οργανικών ουσιών στα συστατικά τους, μέσω κατανομής των συστατικών μεταξύ δύο φάσεων, μιας στατικής και μιας κινητής. Η κινητή φάση, διερχόμενη δια μέσου της στατικής φάσης προκαλεί διάφορον επ' αυτής μετατόπιση των συστατικών του μίγματος. Οι διαφορετικές μέθοδοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη φύση της κινητής φάσης (υγρό ή αέριο) ή της στατικής

(στερεό ή υγρό επί στερεού υποστρώματος), ως προς τον μηχανισμό, στον οποίο οφείλεται ο διαχωρισμός (προσρόφηση, ιοντοανταλλαγή, κατανομή) και ως προς την μορφή της στατικής φάσης [36]. Μετά το διαχωρισμό, τα προκύπτοντα συστατικά μπορούν να αναλυθούν περαιτέρω από διάφορες τεχνικές, όπως φασματομετρία μάζας, φασματομετρία απορρόφησης UV, ανίχνευση φθορισμού κ.λπ. Οι βασικές χρωματογραφικές μέθοδοι για τον διαχωρισμό πρωτεϊνων είναι οι εξής:

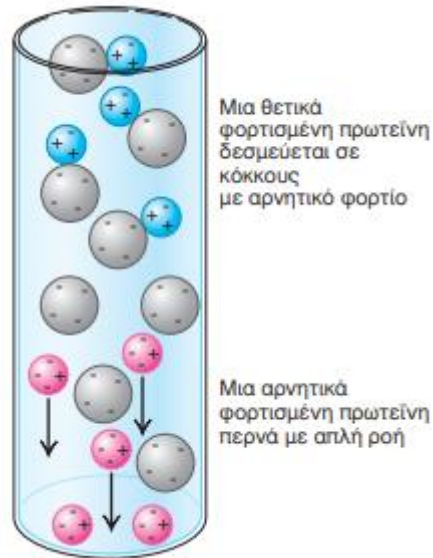
- Χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή: Ο καλύτερος διαχωρισμός βάσει του μεγέθους επιτυγχάνεται με την τεχνική της χρωματογραφίας διήθησης σε πηκτή (gel-filtration chromatography). Το δείγμα τοποθετείται στην κορυφή μιας στήλης που αποτελείται από πορώδεις κόκκους από αδιάλυτο πολυμερές, που μπορεί όμως να συγκρατήσει πολύ νερό, όπως π.χ. η δεξτράνη ή η αγαρόζη (υδατάνθρακες) ή το πολυακρυλαμίδιο. Μικρά μόρια περνούν μέσα από αυτούς τους κόκκους, αλλά τα μεγάλα δεν μπορούν να περάσουν. Αποτέλεσμα είναι ότι τα μικρά μόρια κατανέμονται στο υδάτινο περιβάλλον μέσα στους κόκκους και μεταξύ τους, ενώ τα μεγάλα μόρια βρίσκονται μόνο μεταξύ των κόκκων. Τα μεγάλα μόρια περνούν πιο εύκολα μέσα από τη στήλη και εμφανίζονται πρώτα διότι βρίσκονται σε μικρότερο όγκο υγρού. Τα μόρια με μέγεθος που τα επιτρέπει να περνούν περιστασιακά στους κόκκους θα εκλουστούν σε ενδιάμεσο χρόνο, ενώ τα μικρά θα εκλουστούν τελευταία διότι ακολουθούν μια δαιδαλώδη διαδρομή μέσα από τους κόκκους.



Εικόνα 4: Χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή. Ένα μείγμα πρωτεϊνών τοποθετείται σε στήλη πορώδους υλικού. Ο όγκος του δείγματος των πρωτεϊνών διατηρείται όσο το δυνατόν μικρότερος. Οι μεγάλες πρωτεΐνες εμφανίζονται στην έξοδο της στήλης πριν από τις μικρές πρωτεΐνες διότι δεν μπορούν να εισχωρήσουν στο εσωτερικό των κόκκων του υλικού.

- Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής: Οι πρωτεΐνες είναι δυνατόν να διαχωριστούν και βάσει των φορτίων τους με τη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (ionexchange chromatography). Αν το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης σε pH 7 είναι θετικό, αυτή συνήθως θα δεσμευθεί σε στήλη από κόκκους που περιέχουν καρβοξυλικά ιόντα, ενώ μια αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη δεν θα δεσμευθεί στη στήλη αυτή. Μια θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη που είναι δεσμευμένη σε μια τέτοια στήλη μπορεί στη συνέχεια να εκλουστεί (απελευθερωθεί) με αύξηση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου ή άλλου άλατος στο ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης. Τα ιόντα νατρίου συναγωνίζονται με τα θετικά φορτία της πρωτεΐνης για τη δέσμευση στη στήλη. Οι πρωτεΐνες που έχουν χαμηλή συγκέντρωση θετικών φορτίων θα εμφανιστούν πρώτες, ακολουθούμενες από εκείνες με υψηλότερη συγκέντρωση θετικών φορτίων. Αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες (ανιοντικές πρωτεΐνες) είναι δυνατόν να διαχωριστούν με χρωματογραφία σε θετικά φορτισμένη διαιθυλο-αμινοαιθυλοκυτταρίνη (DEAE-κυτταρίνη). Αντίθετα, θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες

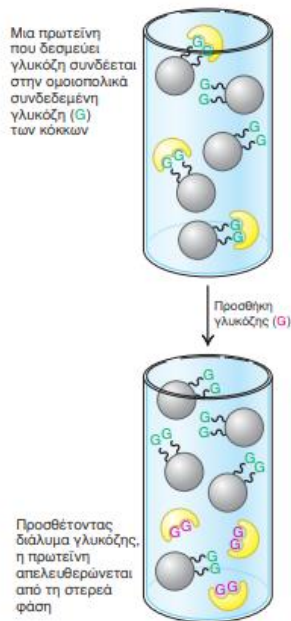
(κατιοντικές πρωτεΐνες) είναι δυνατόν να διαχωριστούν σε αρνητικά φορτισμένη καρβοξυμεθυλο-κυτταρίνη (CM-κυτταρίνη).



Εικόνα 5: Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Με την τεχνική αυτή οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως βάσει του καθαρού φορτίου τους.

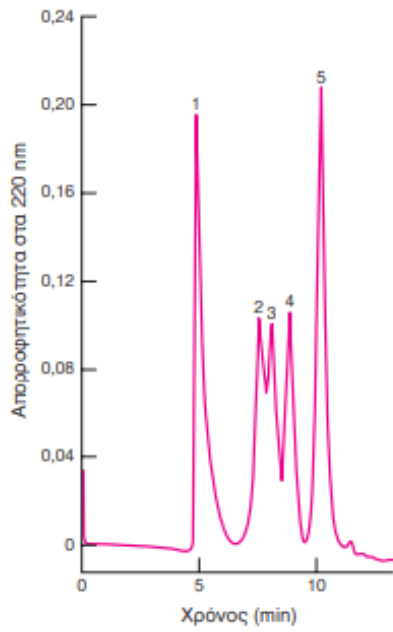
- Χρωματογραφία συγγένειας: Η χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography) είναι μια άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται γενικά για τον καθαρισμό πρωτεϊνών. Η τεχνική αυτή εκμεταλλεύεται την υψηλή συγγένεια πολλών πρωτεϊνών για ειδικές χημικές ομάδες. Παραδείγματος χάριν, η φυτική πρωτεΐνη κονκαναβαλίνη Α μπορεί να καθαριστεί με το πέρασμα ενός μείγματος μέσω μιας στήλης από κόκκους που περιέχουν ομοιοπολικά δεσμευμένη γλυκόζη. Η κονκαναβαλίνη Α δεσμεύεται στη στήλη αυτή διότι έχει συγγένεια με τη γλυκόζη, ενώ οι περισσότερες άλλες πρωτεΐνες δεν έχουν. Η δεσμευμένη κονκαναβαλίνη Α μπορεί να απελευθερωθεί από τη στήλη με προσθήκη γλυκόζης σε υψηλή συγκέντρωση. Η γλυκόζη στο διάλυμα αντικαθιστά τη γλυκόζη της στήλης στις θέσεις όπου αυτή δεσμεύεται στην κονκαναβαλίνη Α. Η χρωματογραφία συγγένειας είναι η μέθοδος επιλογής για την απομόνωση παραγόντων

μεταγραφής, πρωτεϊνών δηλαδή που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση δεσμευόμενες σε ειδικές θέσεις στο DNA. Ένα πρωτεϊνικό μείγμα διηθείται μέσω μιας στήλης που περιέχει ειδικές αλληλουχίες DNA δεσμευμένες σε αδρανές υλικό. Οι πρωτεΐνες που έχουν υψηλή συγγένεια με την αλληλουχία δεσμεύονται και παραμένουν στη στήλη. Στην περίπτωση αυτή, ο μεταγραφικός παράγοντας θα απελευθερωθεί με έκπλυση διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης άλατος. Γενικά, η χρωματογραφία συγγένειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στην απομόνωση πρωτεϊνών που αναγνωρίζουν μια ομάδα X, ως εξής: (1) ομοιοπολική δέσμευση του X ή παραγώγου του σε στήλη, (2) προσθήκη του μείγματος των πρωτεϊνών στη στήλη, που στη συνέχεια ξεπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες οι οποίες δεν δεσμεύθηκαν, και (3) έκλυση της επιθυμητής πρωτεΐνης με προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης διαλυτής μορφής του X. Η χρωματογραφία συγγένειας είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική όταν οι αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης και του μορίου που χρησιμοποιείται ως δόλωμα είναι πολύ εξειδικευμένες.



Εικόνα 6: Χρωματογραφία συγγένειας. Στο παράδειγμα η κονκαναβαλίνη Α (που φαίνεται κίτρινη) διαχωρίζεται λόγω συγγένειας με τη γλυκόζη (G) που βρίσκεται ομοιοπολικά δεσμευμένη στη στερεά φάση της στήλης.

- Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης: Όλες οι μέθοδοι χρωματογραφίας αποκτούν καλύτερη διαχωριστική ικανότητα όταν χρησιμοποιούμε την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (high-pressure liquid chromatography, HPLC). Με την τεχνική HPLC επιτυγχάνουμε την ενίσχυση των μεθόδων που ήδη περιγράφηκαν και στηρίζονται σε διαχωρισμό στήλης. Το υλικό της στήλης αυτής είναι πολύ λεπτό και επομένως προσφέρει περισσότερες θέσεις αλληλεπίδρασης άρα και μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα. Επειδή το υλικό είναι τόσο λεπτόκοκκο πρέπει να εφαρμοστεί πίεση προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητική ροή. Το τελικό αποτέλεσμα είναι υψηλή διαχωριστική ικανότητα αλλά και γρήγορος διαχωρισμός.



Εικόνα 7: Γρήγη χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Η διήθηση με την τεχνική HPLC έχει μεγάλη διαχωριστική ικανότητα και μας επιτρέπει να προσδιορίσουμε με ακρίβεια αρκετές πρωτεΐνες στα ούρα

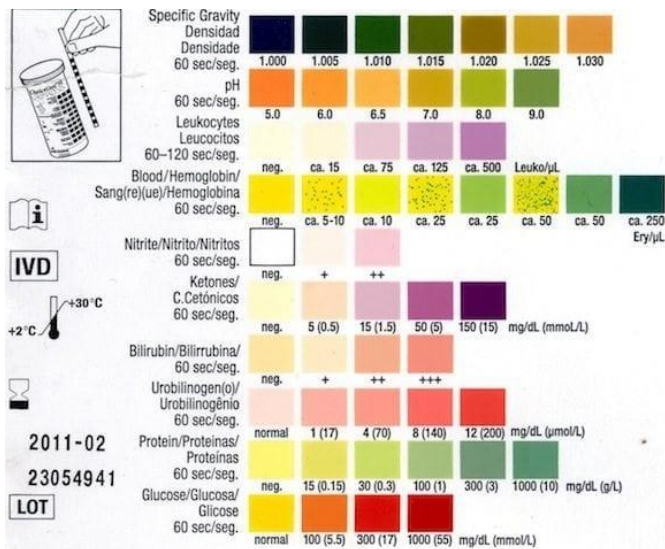
Κεφάλαιο Γ: Μέθοδοι Ανίχνευσης Αλβουμινουρίας

Γ.1 Συμβατικές Μέθοδοι Ανίχνευσης Αλβουμινουρίας

Γ.1.1 Ταινίες εμβάπτισης αλβουμίνης (Albumin Dipsticks)

Η αλβουμινουρία παραδοσιακά ελέγχεται με τη χρήση μιας ποικιλίας ημιποσοτικών ταινιών εμβάπτισης (semiquantitative dipsticks). Αυτή η μέθοδος, περιλαμβάνει τη διαβροχή μιας χημικά εμποτισμένης ταινίας μέτρησης με ούρα. Για παράδειγμα, οι ράβδοι μικροαλβουμινουρίας Clinitek (Bayer Corporation, Tarrytown, NY) ανιχνεύουν τη μικροαλβουμινουρία μέσω της δέσμευσης αλβουμίνης σε χρώση σουλφονεφθαλεΐνης, η οποία παράγει μια έγχρωμη αντίδραση που διαβάζεται ανακλαστικά στον φορητό αναλυτή χημείας ούρων Clinitek 50 (Bayer Corporation, Tarrytown, NY). Οι συγκρίσεις αυτής της ράβδου μέτρησης με εργαστηριακές δοκιμές αναφοράς έδειξαν ότι η ευαισθησία (sensitivity) κυμαίνεται από 79% έως 95,4% και ότι η ειδικότητα (specificity) κυμαίνεται από 73% έως 81%. [39,40,41]

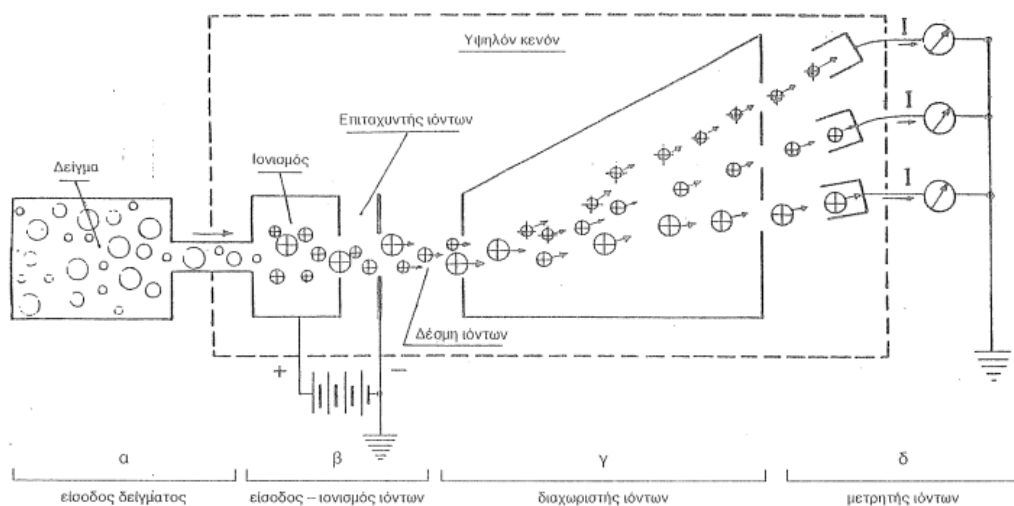
Ένα άλλο τεστ ράβδου μέτρησης είναι η ταινία μέτρησης Micral-Test II (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Σε αυτή τη δοκιμή, η αλβουμίνη, όπου συνδέεται με συγκεκριμένα, επισημασμένα με χρυσό αντισώματα, ρέει σε ένα επίθεμα ανίχνευσης [41,42]. Μια χημική αντίδραση στο επίθεμα ανίχνευσης παράγει ένα χρώμα που συγκρίνεται οπτικά με μπλοκ χρώματος. Οι συγκρίσεις αυτής της δοκιμής με τα εργαστηριακά αποτελέσματα αναφοράς έχουν δείξει ότι η ευαισθησία κυμαίνεται από 93% έως 97,1%, και η ειδικότητα κυμαίνεται από 33,3% έως 81% [41,42,43].



Εικόνα 8: Διάγραμμα ανάλυσης ούρων με τη χρήση ταινίας εμβάπτισης

Γ.1.2 Φασματομετρία μάζας (Mass spectrometry)

Η φασματομετρία μάζας είναι μια ισχυρή τεχνική ανάλυσης που μετρά την αναλογία μάζας προς το φορτίο ιόντων. Πρώτον, τα μόρια σε ένα δείγμα πρέπει να είναι ιονισμένα, το οποίο αναγκάζει ένα μεγάλο μόριο να κατακερματιστεί σε μικρότερα ιόντα. Τότε αυτά τα ιόντα διαχωρίζονται από ένα μαγνητικό πεδίο ανάλογα με την αναλογία μάζας προς φορτίο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται τυπικά ως φάσμα μάζας, ένα διάγραμμα έντασης ως συνάρτηση του λόγου μάζας προς φορτίο. Συνήθως, η φασματομετρία μάζας χρησιμοποιείται μετά από προεπεξεργασία του δείγματος από ηλεκτροφόρηση ή χρωματογραφία. [44]



Εικόνα 9: Βασικά μέρη φασματομέτρου μάζας

Η φασματομετρία μάζας είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για τη μελέτη του πρωτεώματος. Το πρωτέωμα είναι το σύνολο των πρωτεϊνών που παράγεται ή τροποποιείται από έναν οργανισμό. Η έρευνα για τις πρωτεΐνες των ούρων είναι σημαντική για την ταυτοποίηση αξιόπιστων βιοδεικτών που βοηθούν στη διάγνωση μιας ασθένειας [45]. Σε ερευνητική μελέτη του Kalantari κ.α. σχετικά με την πρωτεομική των ούρων, αναφέρεται ότι μια κοινή τεχνική για την ανάλυση πρωτεώματος ούρων είναι η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση πτήσης (two-dimensional gel electrophoresis) ακολουθούμενη από φασματομετρία μάζας, η υγρή χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματομετρία μάζας κ.α [46]. Η φασματομετρία μάζας από μόνη της, δεν προτιμάται για την ποσοτική ανάλυση εξαιτίας των διαφορετικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων των διαφορετικών πεπτιδίων και πρωτεϊνών [47,48,49]. Ωστόσο, η ποσοτικοποίηση είναι δυνατή αν χρησιμοποιείται ένα εσωτερικό πρότυπο, γι' αυτό υπάρχουν προσεγγίσεις που βασίζονται στην επισήμανση με σταθερά ισότοπα (όπως N-15, O-18), που περιλαμβάνουν τεχνητή επισήμανση πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν προσεγγίσεις χωρίς επισήμανση, στις οποίες τα δείγματα διατηρούν τη φυσική τους σύνθεση ισωτόπων και συγκρίνονται μεταξύ διαφορετικών μετρήσεων. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι μέθοδοι που βασίζονται σε επισήμανση είναι σχετικά ακριβείς, ενώ οι μέθοδοι χωρίς επισήμανση είναι λιγότερο ακριβείς [47]. Ένα παράδειγμα ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών, σε αυτήν την περίπτωση είναι η αλβουμίνη σε

διάλυμα ούρων με μεθόδους φασματομετρίας μάζας, όπως περιγράφεται σε μια ερευνητική εργασία του Singh κ.α. [50]. Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε N-15 ισοτοπικά επισημασμένη αλβουμίνη, ως πρότυπο. Οι ερευνητές πέτυχαν το όριο ανίχνευσης (LOD) των 4,84 mg/L, όριο ποσοτικοποίησης 10,5 mg/L με το γραμμικό εύρος να είναι από 4 έως 625 mg/L και $R^2 = 0,999$. Επιπλέον, η φασματομετρία μάζας σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την ανακάλυψη και την ανάλυση βιοδεικτών από δείγματα βιοϋγρών, η οποία περιλαμβάνει και την πρωτεομική μελέτη των ούρων [51]. Πολλοί από τους βιοδείκτες πρωτεώματος των ούρων ανακαλύφθηκαν μέσω αυτής της τεχνικής.

Γ.1.3 Ανοσοδοκιμασία (Immunoassay)

Η ανοσοδοκιμασία είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως σε κλινικά και ερευνητικά εργαστήρια για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό μακρομορίων (συνήθως πρωτεϊνών) που παράγονται από οργανισμούς [52]. Η ανοσοδοκιμασία βασίζεται σε μια αντίδραση μεταξύ ενός αντιγόνου και ενός αντισώματος [53]. Η αντίδραση πραγματοποιείται *in-vitro* (όχι σε ζωντανό οργανισμό) και το αποτέλεσμα αυτού είναι ο σχηματισμός ενός συμπλέγματος αντισώματος-αντιγόνου που έχουν συμπληρωματικό σχήμα, όπως η κλειδαριά και το κλειδί. Επομένως, τέτοιες αλληλεπιδράσεις είναι εξαιρετικά επιλεκτικές. Τα συμπλέγματα αντισώματος-αντιγόνου οριοθετούνται από ασθενείς δυνάμεις όπως ηλεκτροστατικές δυνάμεις, δεσμούς υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δυνάμεις van der Waals, που σημαίνει ότι τέτοιες δεσμεύσεις είναι αναστρέψιμες. Το συγκεκριμένο κομμάτι του αντιγόνου στο οποίο συνδέεται ένα αντίσωμα ονομάζεται επίτοπος. Οι μέθοδοι ανοσοδοκιμασίας έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πολλούς τομείς της φαρμακευτικής ανάλυσης όπως για τη διάγνωση ασθενειών, παρακολούθηση θεραπευτικών φαρμάκων κ.α. [54]. Η ευρεία διάδοση μεθόδων ανοσοδοκιμασίας στη φαρμακευτική ανάλυση αποδίδεται στην εγγενή τους ειδικότητα, στην υψηλή απόδοση και ευαισθησία τους για την ανάλυση ενός πλατύ φάσματος αναλυτών σε βιολογικά δείγματα, όπως επίσης και στο σχετικά χαμηλό κόστος των οργάνων, των εργαλείων ή των αντιδραστηρίων [55].

Με βάση την ανίχνευση σήματος, οι ανοσοδοκιμασίες θα μπορούσαν να ταξινομηθούν ως εξής:

- ανταγωνιστικές και
- μη ανταγωνιστικές [106,109].

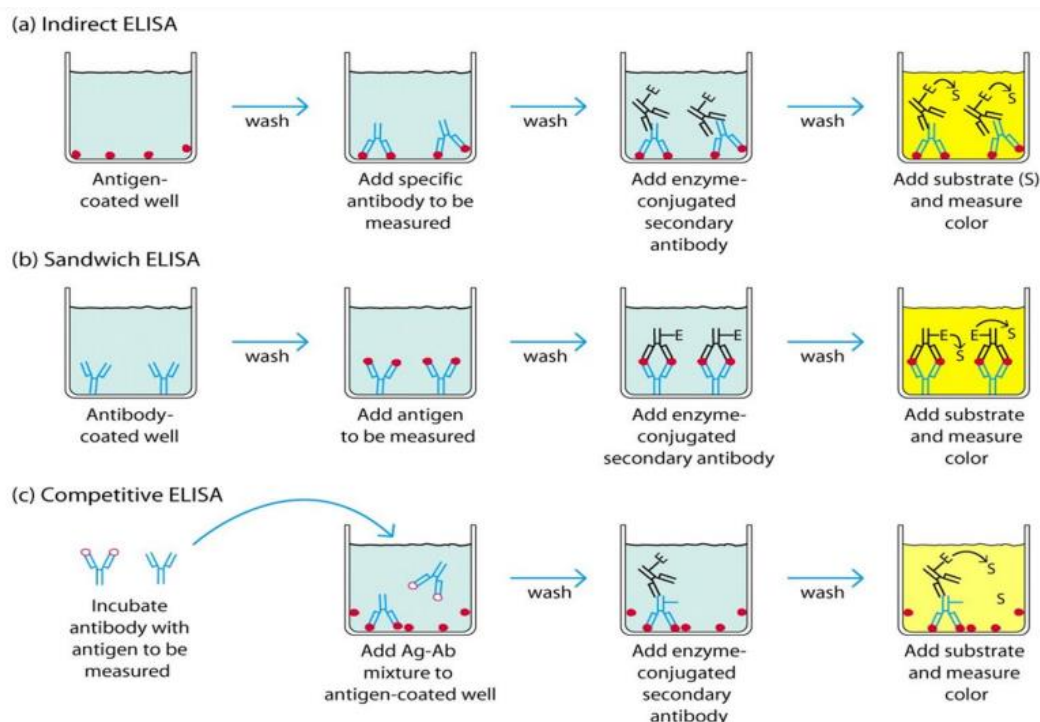
Η ανταγωνιστική ανοσοδοκιμασία βασίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ του αντιγόνου ενδιαφέροντος (αναλυτής) και μια σταθερή ποσότητα ενός παρόμοιου αλλά επισημασμένου αντιγόνου για περιορισμένη ποσότητα ειδικού αντισώματος. Όταν αυτά τα ανοσοαναλυτικά αντιδραστήρια αναμιγνύονται και επωάζονται, ο αναλυτής δεσμεύεται στο αντίσωμα, σχηματίζοντας ένα ανοσοποιητικό σύμπλεγμα. Αυτό το σύμπλεγμα διαχωρίζεται από το μη δεσμευμένο αντιδραστήριο με φυσική ή χημική τεχνική διαχωρισμού, αν και μερικές φορές δεν απαιτείται διαχωρισμός. Με βάση το αν το βήμα διαχωρισμού είναι ή δεν είναι απαραίτητο, οι μέθοδοι ανοσοδοκιμασίας μπορούν να ταξινομηθούν σε ετερογενείς ή ομοιογενείς μεθόδους, αντίστοιχα.

Από την άλλη πλευρά, η μη ανταγωνιστική ανοσοδοκιμασία, που ονομάζεται επίσης και ανοσομετρική, χρησιμοποιεί περίσσεια επισημασμένου ειδικού αντισώματος προς τον αναλυτή ενδιαφέροντος. Απαιτεί δύο αντισώματα που συνδέονται με μη επικαλυπτόμενους επίτοπους στο μόριο του αναλύτη. Το ένα από τα δύο αντισώματα είναι συνδεδεμένα με τη στερεά φάση και το δεύτερο είναι επισημασμένο και χρησιμοποιείται για ανίχνευση. Οι ετικέτες που χρησιμοποιούνται συνήθως σε ανοσοδοκιμασίες περιλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα, φθοροφόρα και ένζυμα. Οι βασικές ανοσοδοκιμαστικές μέθοδοι για την ανίχνευση πρωτεϊνών στα ούρα, είναι οι:

- Ραδιοανοσοδοκιμασία (Radioimmunoassay-RIA)
- Ενζυμική ανοσοδοκιμασία (Enzyme immunoassay-EIA)
- Φθοριοανοσοδοκιμασία (Fluoroimmunoassay-FIA)
- Ανοσοδοκιμασία χημειοφωταύγειας (Chemiluminescence immunoassay-CLIA)
- Ανοσονεφελομετρία (Immunonephelometry –IN)
- Ανοσοθολυμετρία (Immunoturbidimetry-IT)

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ανοδοκιμαστικής ανίχνευσης πρωτεϊνών με σημαντικές κλινικές εφαρμογές (π.χ. σε επιδημίες) είναι η τεχνική ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) η οποία διακρίνεται σε:

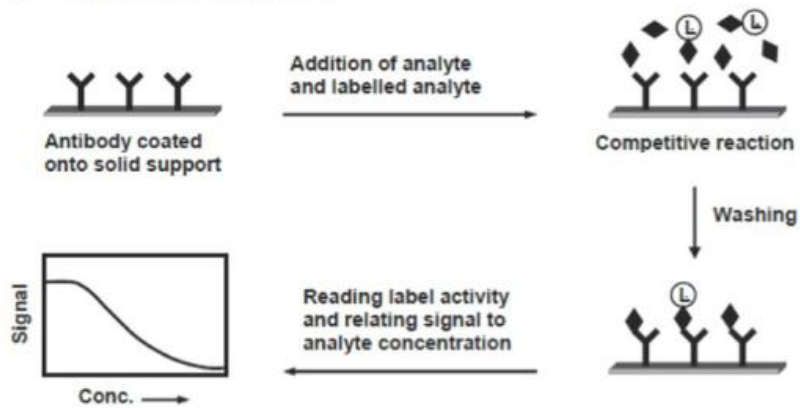
- έμμεση ELISA
- διπλή ELISA
- ανταγωνιστική ELISA



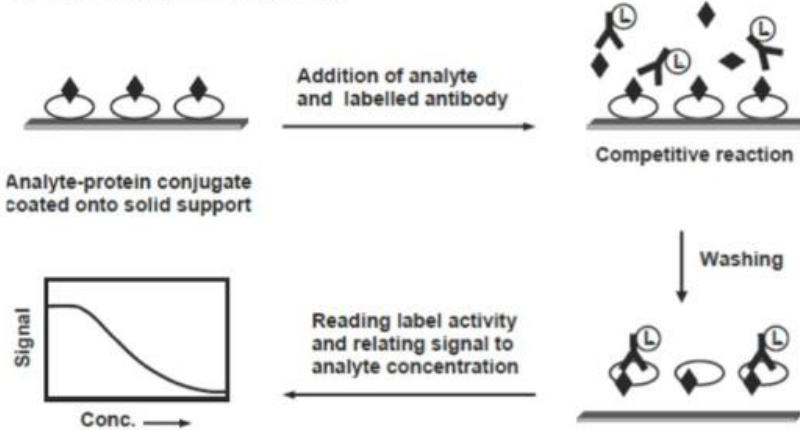
Εικόνα 10: Τεχνικές μεθόδου ELISA. α) Έμμεση ELISA β) Διπλή (ή Sandwich) ELISA γ) Ανταγωνιστική ELISA

Όπως αναφέρθηκε στο εισαγωγικό μέρος, η συγκέντρωση της αλβουμίνης υψηλότερη από 30 mg/1,5 L θα μπορούσε να είναι ενδεικτική παθήσεων των νεφρών. Για πολλές μεθόδους ανοσοδοκιμασίας για τον προσδιορισμό της αλβουμίνης στα ούρα, το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection-LOD) μεγέθους περίπου 1 mg/L θα ήταν αρκετό για κλινικούς σκοπούς, επομένως προτεραιότητα θα πρέπει να δίνεται σε παραμέτρους όπως η ειδικότητα, η ακρίβεια, το κόστος, κ.λπ. Ωστόσο για πρωτεΐνες χαμηλής συγκέντρωσης, η επίτευξη χαμηλότερου LOD είναι σημαντική [56].

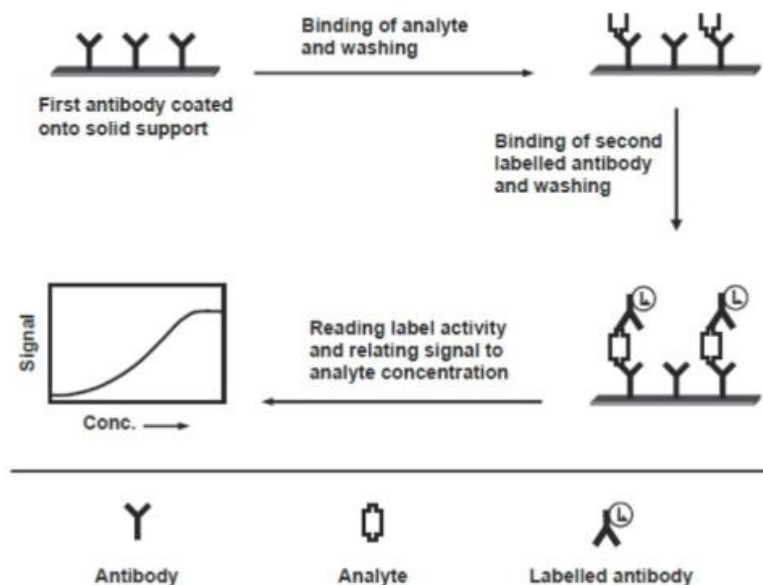
(A) Antigen-Capture Immunoassay



(B) Antibody-Capture Immunoassay



Εικόνα 11: Σχηματικό διάγραμμα ανταγωνιστικής ανοσοδοκιμασίας [55]



Εικόνα 11: Σχηματικό διάγραμμα μη ανταγωνιστικής ανοσοδοκιμασίας [55]

Γ.1.4 Φασματομετρία Υπέρυθρων και φασματομετρία Raman

(The Infrared and Raman spectroscopies)

Η απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας (IR) διεγείρει τις δονητικές μεταβάσεις των μορίων. Η υπέρυθρη φασματική περιοχή καλύπτει μήκη κύματος από 780 nm έως 1000 μm που μπορούν να υποδιαιρεθούν περαιτέρω σε περιοχή εγγύς υπέρυθρη από 780 nm έως 2500 nm, στην περιοχή μεσαίας υπέρυθρης από 2500 nm έως 50 μm και στην περιοχή άπω υπέρυθρης από 50 μm έως 1000 μm.

Η κύρια περιοχή που παρουσιάζει ενδιαφέρον για αναλυτικούς σκοπούς είναι το μέσο του IR, από 4000 έως 400 κυματαριθμούς, cm^{-1} (κυματαριθμός = $1/\lambda$, λ: μήκος κύματος σε cm).

Η υπέρυθρη φασματομετρία είναι οπτική μέθοδος ανάλυσης και στηρίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ένωσης τα οποία διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης που είναι κβαντισμένες. Η υπέρυθρη φασματομετρία διερευνά τις μοριακές δονήσεις (τάσης και κάμψης) και όχι τις ηλεκτρονιακές διεγέρσεις και μπορεί να δώσει πληροφορίες για τη δομή της ουσίας. Απαραίτητη είναι η ύπαρξη μεταβολής στο μέγεθος και τη διεύθυνση της διπολικής ροπής του δεσμού. Έτσι διακρίνονται οι ενώσεις σε ενεργές και σε ανενεργές στο IR.

Σε ένα τυπικό φάσμα υπέρυθρης φασματομετρίας διακρίνουμε δύο περιοχές, αυτή των χαρακτηριστικών ομάδων $4.000 - 1.400 \text{ cm}^{-1}$ που οι ζώνες απορρόφησης οφείλονται στη δόνηση ομάδων, και στην περιοχή $1.400 - 600 \text{ cm}^{-1}$ όπου οι απορροφήσεις σχετίζονται με τις δονήσεις ολόκληρου του μορίου και η περιοχή αυτή αποτελεί το «δακτυλικό αποτύπωμα» της κάθε ένωσης.

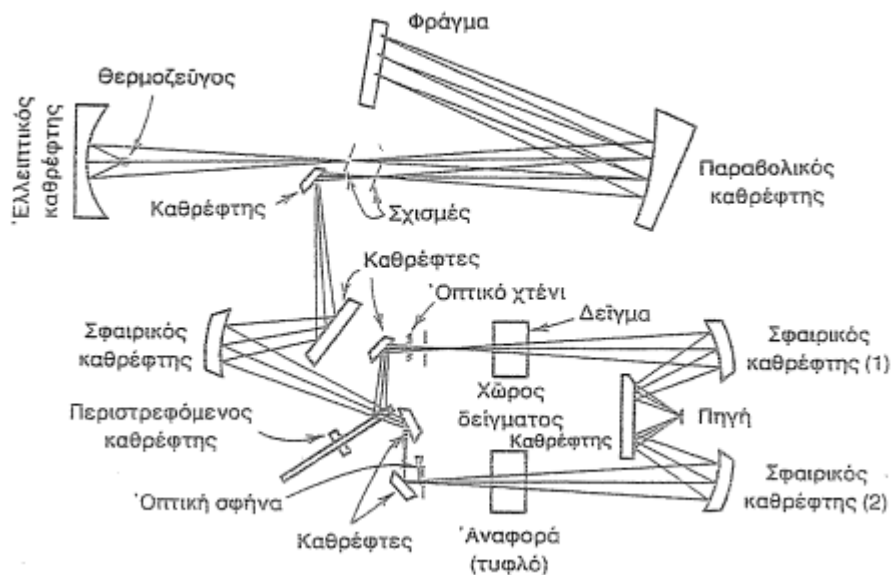
Υπάρχουν τρία είδη IR φασματομέτρων:

1. Τα συμβατικά IR με χρήση μονοχρωμάτορα (dispersive spectrometers)
2. FT – IR (Fourier Transformed Infrared)
3. Φασματοόμετρα IR για ειδικού τύπου αναλύσεις χωρίς παραγωγή φάσματος

Ο πρώτος τύπος φασματομέτρου, έχει περιορισμένη ευαισθησία και οι εντάσεις των απορροφήσεων είναι πολύ μικρές, με αποτέλεσμα ο «θόρυβος» να σκεπάζει τις ταινίες απορρόφησης. Η αδυναμία αυτών των κοινών φασματομέτρων ξεπεράστηκε με την φασματομετρία IR με μετασχηματισμό Fourier (FT – IR). Τα φασματοόμετρα FT – IR μπορούν να εξετάζουν ταυτόχρονα πολλά σημεία του φάσματος και το τελικό φάσμα προκύπτει από το μέσο όρο των επαναλήψεων που έχουν εκτελεστεί. Η εξέταση πολλών σημείων ταυτόχρονα προσδίδει στα όργανα μεγάλη ταχύτητα καταγραφής, υψηλή διαχωριστική ικανότητα, χαμηλό «θόρυβο». Σε αντίθεση, στα συμβατικά φασματοόμετρα IR κάθε σημείο εξετάζεται διαδοχικά και μία φορά. [44]

Υπάρχουν δύο τεχνικές λήψης φάσματος FT-IR. Η πρώτη αφορά στην τεχνική της διάχυσης ανάκλασης (Diffuse Reflectance Fourier Transformed Infrared

Spectroscopy – DRIFT) και η δεύτερη στην τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance Spectroscopy – ATR).

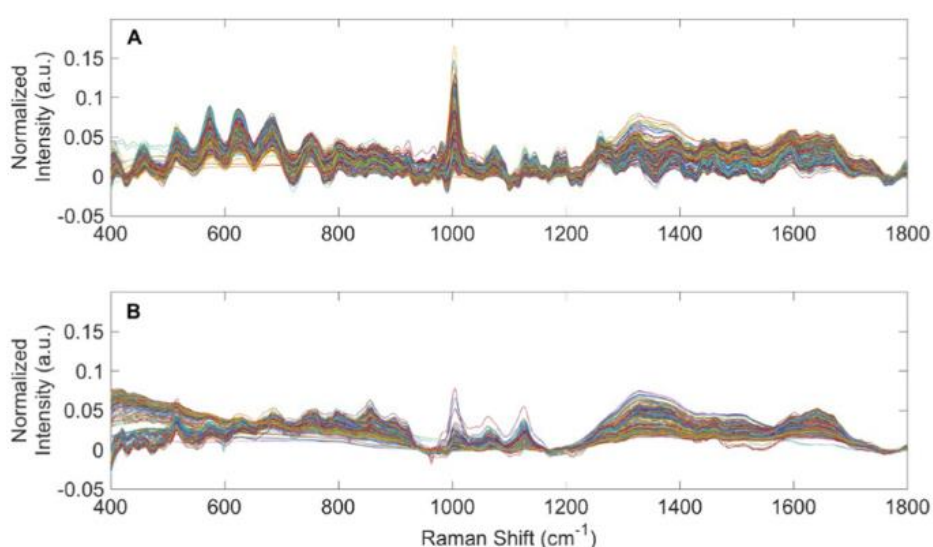


Εικόνα 12: Διάγραμμα οπτικού τμήματος φασματομέτρου IR

Μια άλλη αναλυτική τεχνική που βασίζεται σε μοριακές δονήσεις είναι Φασματοσκοπία Raman [58]. Η φασματοσκοπία Raman είναι μια ισχυρή τεχνική για τον προσδιορισμό του τρόπου δόνησης των μορίων με στόχο την παροχή ενός δομικού «δακτυλικού αποτυπώματος», όπως η υπέρυθη φασματοσκοπία, μέσω του οποίου τα μόρια μπορούν να ταυτοποιηθούν. Η υπέρυθη φασματοσκοπία συνήθως παρέχει παρόμοιες πληροφορίες επειδή ορισμένες μοριακές δονήσεις μπορούν να συμβούν και στις δύο τεχνικές αλλά μερικές ανιχνεύονται μόνο σε μια από τις δύο μεθόδους, γεγονός που τις καθιστά, επίσης, συμπληρωματικές. Επίσης, οι μεταβάσεις που έχουν μεγάλες εντάσεις Raman έχουν συχνά ασθενείς εντάσεις υπέρυθρων και αντίστροφα. Η φασματοσκοπία Raman βασίζεται στην ανελαστική σκέδαση φωτονίων. Το φως του λέιζερ αλληλεπιδρά με τις μοριακές δονήσεις, φωτόνια ή άλλες διεγέρσεις στο σύστημα, με αποτέλεσμα η ενέργεια των φωτονίων λέιζερ να μετατοπίζεται προς τα πάνω ή προς τα κάτω. Τα φάσματα Raman για τα βιομόρια είναι δύσκολο να αναλυθούν λόγω των επικαλυπτόμενων ζωνών όπως και

στη φασματοσκοπία IR. Ορισμένες μαθηματικές διαδικασίες πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε φάσματα Raman για την ανάλυση ενός δείγματος.

Παρά τις δυσκολίες στην ανάλυση μεγάλων βιομορίων όπως π.χ πρωτεΐνες, η φασματοσκοπία IR και η φασματοσκοπία Raman έχουν ορισμένα πλεονεκτήματα. Τέλος, θα πρέπει να τονιστεί ότι τα φάσματα IR και Raman είναι πλούσια σε δεδομένα, και οι μαθηματικές ερμηνείες αυτών μαζί με τη σωστή διαδικασία βαθμονόμησης είναι σημαντικά για την ανάλυση.



Εικόνα 13: Φάσμα Raman

Γ.2 Φασματοσκοπικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

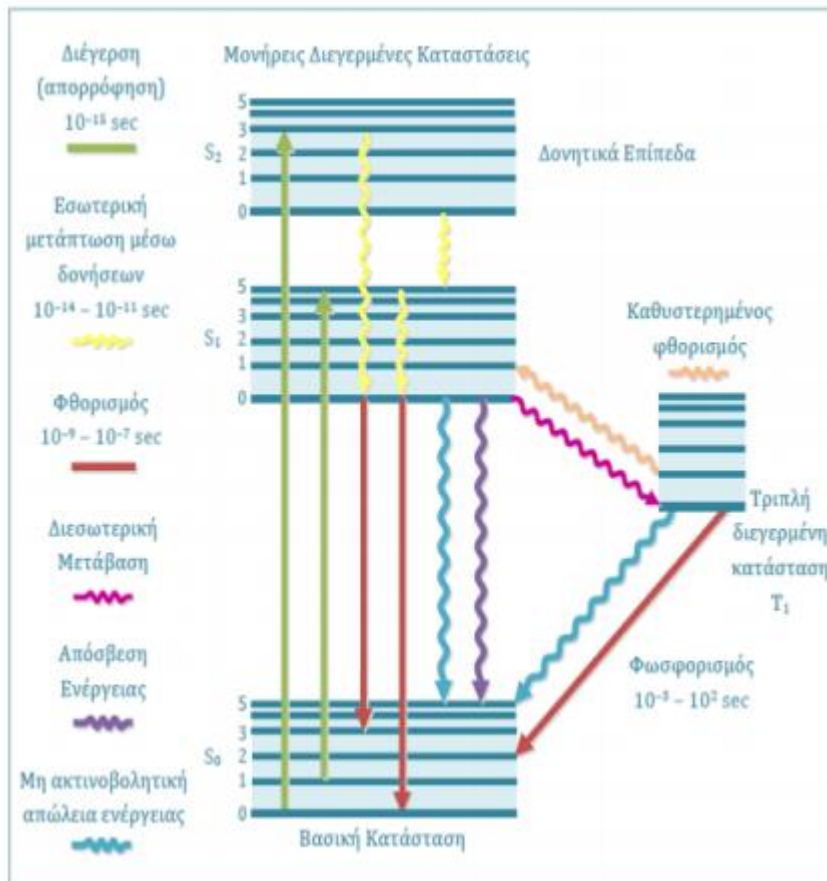
Γ.2.1 Φασματομετρία Φθορισμού (Fluorescence spectroscopy)

Ο φθορισμός είναι ένα φαινόμενο φωταύγειας κατά το οποίο μια χημική ένωση εκπέμπει φως μετά την απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας [59]. Η φασματοσκοπία φθορισμού είναι έως και 1000 φορές πιο ευαίσθητη από τη φασματοσκοπία υπεριώδους ή υπέρυθρης ακτινοβολίας. Η ένταση του φθορισμού εξαρτάται από το φθοροφόρο (ένωση που φθορίζει), τη συγκέντρωσή του, τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής και τη θερμοκρασία. Η φυσική πίσω από τον

φθορισμό περιλαμβάνει τις διαφορετικές ηλεκτρονιακές και δονητικές καταστάσεις στις οποίες μπορούν να υπάρχουν τα φθοροφόρα.

Μια ηλεκτρονιακή κατάσταση διαιρείται σε πολλαπλές καταστάσεις δόνησης. Τα φωτόνια, που έχουν ενέργειες από το υπεριώδες έως ένα μπλε-πράσινο εύρος του φάσματος μπορούν να προκαλέσουν μια ηλεκτρονιακή μετάβαση από τη χαμηλότερη δόνηση (στη θεμελιώδη κατάσταση) σε ένα από τα επίπεδα δόνησης σε μια υψηλότερη ηλεκτρονικά διεγερμένη κατάσταση. Μόλις σταματήσει η διέγερση, το μόριο φθοροφόρου υποβιβάζεται στο χαμηλότερο επίπεδο δόνησης της διεγερμένης ηλεκτρονιακής κατάστασης. Το φθοροφόρο παραμένει σε αυτή την κατάσταση για κάποιο χρονικό διάστημα (περίπου 10 νανοδευτερόλεπτα, γνωστό ως διάρκεια ζωής φθορισμού) και στη συνέχεια επιστρέφει στην βασική του κατάσταση. Αυτή η επιστροφή στη βασική κατάσταση σχετίζεται με μια απελευθέρωση ενέργειας, γνωστή ως εκπομπή φθορισμού.

Ο αριθμός των φωτονίων που εκπέμπονται από ένα φθοροφόρο, σε σχέση με τον αριθμό των φωτονίων που απορροφώνται, ονομάζεται κβαντική απόδοση. Ένα φθοροφόρο με μεγάλη κβαντική απόδοση, όπως η ροδαμίνη, θα εμφανίσει φωτεινή εκπομπή. Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία έχει πάντα μεγαλύτερο μήκος κύματος (χαμηλότερη ενέργεια) από την ακτινοβολία διέγερσης (υψηλότερη ενέργεια). Για παράδειγμα, εάν το εισερχόμενο φως ήταν μπλε (μικρότερο μήκος κύματος), τότε το κατάλληλο φθοροφόρο θα εκπέμψει πράσινο φως (μεγαλύτερο μήκος κύματος). Αυτή η παρατήρηση, η οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Sir George Gabriel Stokes, και επομένως σήμερα ονομάζεται μετατόπιση Stokes, προκαλείται από την ταχεία επιστροφή του διεγερμένου μορίου στη βασική του κατάσταση. Η διαδικασία που συμβαίνει μεταξύ διέγερσης και εκπομπής απεικονίζεται χρησιμοποιώντας διαγράμματα Jablonski. Αυτά τα διαγράμματα, όπως αυτό στην Εικόνα 14, δείχνουν τις διαφορετικές ηλεκτρονιακές και δονητικές καταστάσεις ενός μορίου.



Εικόνα 14: Διάγραμμα Jablonski

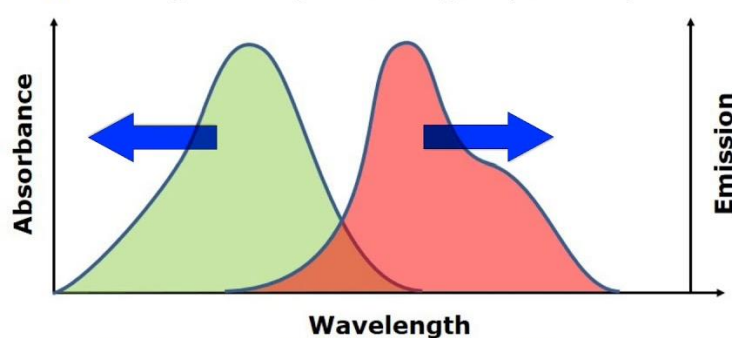
Στις περισσότερες περιπτώσεις, όπως προαναφέρθηκε, το εκπεμπόμενο φως έχει μεγαλύτερο μήκος κύματος και επομένως χαμηλότερη ενέργεια από την απορροφούμενη ακτινοβολία. Φθορίζοντα υλικά παύουν να λάμπουν σχεδόν αμέσως όταν η πηγή ακτινοβολίας σταματά, σε αντίθεση με τα φωσφορίζοντα υλικά, τα οποία συνεχίζουν να εκπέμπουν φως για λίγη ώρα μετά. Η φασματοσκοπία φθορισμού είναι μια από τις πιο κοινές τεχνικές με εφαρμογές στη γεωλογία, τη χημεία, την ιατρική και την αστρονομία [59]. Η φασματοσκοπία φθορισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με τη μέθοδο της υψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας ως ανιχνευτή. Συχνά χρησιμοποιείται ανίχνευση φθορισμού σε ανοσοδοκιμασίες είτε για επισήμανση αντιγόνου είτε αντισώματος. Συνήθως, τα μόρια του αναλύτη δεν εκπέμπουν ισχυρή φωταύγεια για την αναλυτική τους ανίχνευση. Ως εκ τούτου, ένας αναλύτης συνήθως τροποποιείται με ένα φθοροφόρο, ή φθορίζον ανιχνευτή (probe). Το φθοροφόρο (ή ο ανιχνευτής

φθορισμού) είναι μια φθορίζουσα χημική ένωση που μπορεί να επανεκπέμψει φως κατά την ελαφριά διέγερση.

Τα πιο κοινά φθοροφόρα είναι συνήθως οργανικά μόρια, τα οποία τυπικά περιέχουν πολλές συνδυασμένες αρωματικές ομάδες, επίπεδα ή κυκλικά μόρια με αρκετούς π-δεσμούς. Τα φθοροφόρα μερικές φορές χρησιμοποιούνται μόνα τους, ως ιχνηθέτης σε υγρά, ως υπόστρωμα ενζύμων ή ως ανιχνευτής ή δείκτης (όταν ο φθορισμός του επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η πολικότητα ή τα ιόντα). Πιο γενικά, είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα με ένα μακρομόριο, που χρησιμεύει ως δείκτης (ή ετικέτα, ή ανταποκριτής) για συγγενικά ή βιοδραστικά αντιδραστήρια (αντισώματα, πεπτίδια, νουκλεϊκά οξέα).

▣ A fluorophore:

- ▣ Absorbs light at lower wavelengths (excitation)
- ▣ Emits light at longer wavelengths (emission)

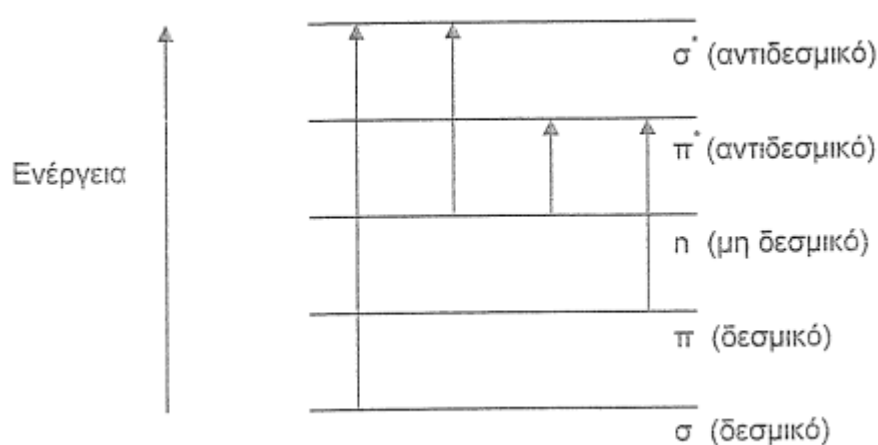


Εικόνα 15: Φάσμα απορρόφησης και εκπομπής ενός φθοροφόρου

Γ.2.2 Φασματομετρία απορρόφησης υπεριώδους – ορατού

(UV/Vis absorption spectrometry)

Η φασματομετρία υπεριώδους – ορατού φωτός στηρίζεται στην απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (100 – 800 nm) από τα μόρια μιας διαλυμένης ουσίας, τα οποία και υφίστανται ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις. Ειδικότερα, τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται στα μοριακά δεσμικά ή μη δεσμικά τροχιακά χαμηλής ενέργειας (σ, π, και η τροχιακά, αντίστοιχα) μεταπηδούν στα αντιδεσμικά τροχιακά υψηλότερης ενέργειας (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις από μοριακά δεσμικά ή μη δεσμικά τροχιακά χαμηλής ενέργειας σε αντιδεσμικά τροχιακά υψηλότερης ενέργειας

Σε ένα φασματοφωτόμετρο UV/Vis, το μετρούμενο μέγεθος είναι η διαπερατότητα (transmittance), η οποία ορίζεται από τη σχέση:

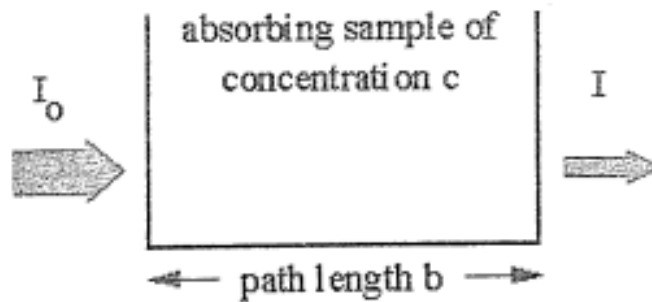
$$T = \frac{I}{I_0}$$

Όπου, I_0 : η αρχική ένταση της ακτινοβολίας

I : η ένταση της ακτινοβολίας μετά την μερική απορρόφηση της από το δείγμα.

Η συσχέτιση μεταξύ απορροφητικότητας A (absorbance) και διαπερατότητας δίνεται απ' τη σχέση:

$$A = -\log T = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right)$$

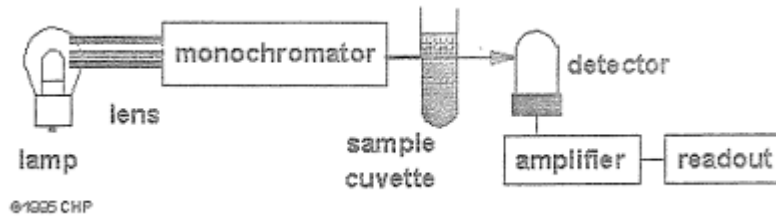


Εικόνα 17: Απορρόφηση ακτινοβολίας από ένα δείγμα

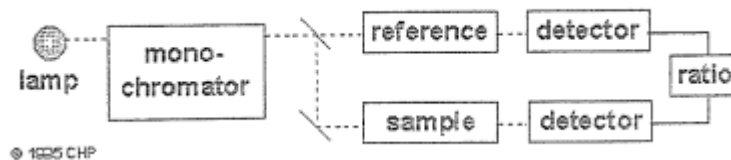
Η συγκέντρωση ενός στοιχείου σε διάλυμά του μπορεί να προσδιορισθεί με τη μέτρηση της απορροφητικότητάς του σε συγκεκριμένο μήκος κύματος και εφαρμογή του νόμου του Lambert-Beer. Στην εργαστηριακή πράξη, μετράται η απορρόφηση προτύπων διαλυμάτων και ακολούθως με μαθηματική επεξεργασία συσχετίζεται η συγκέντρωση με την απορρόφηση και τελικά σχεδιάζεται η καμπύλη αναφοράς (working curve). Έτσι, με τη μέτρηση της απορρόφησης του αγνώστου διαλύματος προκύπτει η αντίστοιχη συγκέντρωσή του απ' την καμπύλη αυτή.

Η φασματομετρία υπεριώδους – ορατού φωτός, χρησιμοποιείται κυρίως για ποσοτικούς προσδιορισμούς, αφού τα αντίστοιχα φάσματα δίνουν πληροφορίες για ορισμένες μόνο ομάδες ατόμων μέσα στο μόριο και δεν χαρακτηρίζουν το μόριο ως σύνολο.

Ως προς την οργανολογία της μεθόδου, η χρησιμοποιούμενη πηγή φωτός είναι συνήθως λυχνία υδρογόνου ή δευτερίου για μετρήσεις UV και λαμπτήρας βολφραμίου για μετρήσεις στην περιοχή του ορατού. Για την απομόνωση της ακτινοβολίας σε συγκεκριμένο μήκος κύματος χρησιμοποιείται μονοχρωμάτορας. Στις εικόνες 18 και 19, δίνονται φασματοφωτόμετρα απλής και διπλής δέσμης, αντίστοιχα [44].



Εικόνα 18: UV/Vis φασματοφωτόμετρο απλής δέσμης



Εικόνα 19: UV/Vis φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης

Η φασματομετρία υπεριώδους - ορατού, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναλυτική ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών στα ούρα, με ή χωρίς επισήμανση της πρωτεΐνης με κάποιο αντιδραστήριο. Η μέθοδος χωρίς επισήμανση βασίζεται στο γεγονός πως η μέγιστη απορρόφηση στα 280 nm αντιστοιχεί στην απόκριση των δακτυλίων των αρωματικών αμινοξικών καταλοίπων (τυροσίνη, τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη) των πρωτεϊνών. Οι βασικές τεχνικές της μεθόδου με επισήμανση είναι:

- Η τεχνική Biuret: Τα πρωτεϊνικά διαλύματα γίνονται μοβ αφού η πολυπεπτιδική αλυσίδα χηλοποιηθεί με ένα ιόν χαλκού. Ένα αλκαλικό διάλυμα αντιδραστηρίου Biuret που περιλαμβάνει θειικό χαλκό και άλας Rochelle προστίθεται σε διάλυμα πρωτεΐνης. Χρησιμοποιεί τη μέγιστη απορρόφηση στα 540 nm για τον προσδιορισμό της ποσότητας.
- Η τεχνική Lowry: Γίνεται με προσθήκη ενός αλκαλικού διαλύματος χαλκού σε ένα διάλυμα πρωτεΐνης. Η τυροσίνη, η τρυπτοφάνη και η κιστεΐνη των πρωτεϊνών μειώνουν το μολυβδαινικό οξύ και το φωσφοβολφραμικό οξύ

ενός αντιδραστηρίου φαινόλης, μετατρέποντας το διάλυμα σε μπλε. Χρησιμοποιεί τη μέγιστη απορρόφηση στα 750 nm για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης.

- Η τεχνική BCA: συνδυάζει τη μέθοδο Biuret και Bicinchoninic Acid (BCA). Το BCA έχει υψηλή ευαισθησία και επιλεκτικότητα για ιόντα χαλκού. Όταν ένα ιόν χαλκού που σχηματίζεται από τη δράση αναγωγής της πρωτεΐνης αντιδρά με 2 μόρια του BCA, το διάλυμα γίνεται μωβ. Χρησιμοποιεί τη μέγιστη απορρόφηση στα 560 nm για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης.
- Η τεχνική Bradford: Το μέγιστο απορρόφησης μιας πρωτεΐνης μετατοπίζεται από τα 465 nm στα 600 nm όταν η πρωτεΐνη δεσμεύεται από το Coomassie Brilliant Blue G250, ένα από τα μπλε χρωστικά τριφαινυλομεθάνσης. Χρησιμοποιεί τη μέγιστη απορρόφηση στα 600 nm για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης.
- Η τεχνική WST: Γίνεται μείωση του WST-8 με πρωτεΐνες υψηλού pH, κάνοντας το δείγμα μπλε. Χρησιμοποιεί τη μέγιστη απορρόφηση στα 650 nm για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης. [60]

Γ.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα UV/Vis φασματομετρίας απορρόφησης και φασματομετρίας φθορισμού

Απ' τα παραπάνω, καθίσταται προφανές ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές διαγνωστικές μέθοδοι για την εξακρίβωση της πρωτεΐνης και της αλβουμίνης των ούρων. Σε πολλές ερευνητικές εργασίες, μάλιστα, για την επίτευξη ακριβέστερων μετρήσεων μπορεί να γίνει και συνδυασμός ορισμένων εξ' αυτών, όπως επισταμένως αναφερθήκαμε, νωρίτερα.

Στην παρούσα εργασία, γίνεται χρήση των μεθόδων της UV/Vis φασματοσκοπίας απορρόφησης και της φασματοσκοπίας φθορισμού, χωρίς επισήμανση της αλβουμίνης με κάποιο αντιδραστήριο. Οι μέθοδοι αυτές,

παρουσιάζουν ορισμένα πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα συγκριτικά με τις άλλες μεθόδους που προαναφέραμε.

Συγκεκριμένα, η UV/Vis φασματοσκοπία απορρόφησης χωρίς επισήμανση της αλβουμίνης:

- Είναι μια οπτική μέθοδος χαμηλού κόστους
- Είναι εύκολη στην εφαρμογή της
- Δεν απαιτείται καμία προετοιμασία του δείγματος πριν την χρήση του
- Το δείγμα μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί και μετά την ακτινοβόλησή του
- Παρέχει τη δυνατότητα χαμηλού ορίου ανίχνευσης (LOD) (στην παρούσα εργασία με την συγκεκριμένη φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης, το όριο ανίχνευσης της αλβουμίνης βρέθηκε ίσο με 0,1 µg/ml)

Στην φασματοσκοπία φθορισμού επιπλέον, εκτός των παραπάνω, εξαιτίας της ευαισθησίας που παρέχει η μέθοδος:

- οι συγκεντρώσεις φθορίζοντος μορίου που μπορούν να μετρηθούν, μπορεί να είναι εξαιρετικά χαμηλές (ακόμη χαμηλότερο LOD)

Ωστόσο, οι δύο παραπάνω μέθοδοι, παρουσιάζουν ,επιπλέον, και ορισμένα μειονεκτήματα συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεθόδους που αναφέρθηκαν. Αυτά είναι τα εξής:

- Ορισμένες πρωτεΐνες με παρόμοια χημική δομή με την αλβουμίνη (πχ α1-γλυκοπρωτεΐνη) στα ούρα, απορροφούν μέγιστη ακτινοβολία στα ίδια μήκη κύματος μ' αυτήν, προσθέτοντας ένα σφάλμα στις μετρήσεις της συγκέντρωσής της. Ωστόσο, εξαιτίας της χαμηλής τους συγκέντρωσης στα ούρα, η συνεισφορά τους στην μετρούμενη συγκέντρωση είναι μικρή
- Τα ανθρώπινα ούρα είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη μήτρα. Επομένως, υπάρχει ο κίνδυνος να αθροίζονται σήματα από την

απορρόφηση της αλβουμίνης με αυτά άλλων οργανικών ή ανόργανων ενώσεων που απορροφούν φως στα επιθυμητά μήκη κύματος

Επιπλέον, στην φασματοσκοπία φθορισμού, εξαιτίας του υψηλού φθορισμού που παρουσιάζει η αλβουμίνη, σε υψηλές συγκεντρώσεις δεν είναι δυνατή η μέτρησή της, χωρίς κάποια επιπλέον αραίωση, η οποία όμως μειώνει το LOD.

Συμπερασματικά, οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν, στο πλαίσιο της εν λόγω διπλωματικής εργασίας, παρουσιάζουν ισχυρά πλεονεκτήματα μιας και απώτερος στόχος, είναι η μελλοντική εφαρμογή τους ως διαγνωστικά εργαλεία για την συστηματικότερη παρακολούθηση της αλβουμινουρίας, με τη χρήση ενός χαμηλού κόστους φορητού φασματοφωτομέτρου απορρόφησης ή/και φθορισμού, χωρίς τη χρεία ειδικά εξοπλισμένων κλινικών ή εργαστηρίων με εξειδικευμένο προσωπικό, στο οποίο θα έχει πρόσβαση το ευρύτερο κοινό για κατ' οίκον εξέταση. Η εφαρμογή των μεθόδων αυτών σε αυτή τη διάταξη καθίσταται δυνατή λόγω της ευκολίας, της ταχύτητας και του χαμηλού κόστους τους.

Μέρος δεύτερο

Πειραματικό κομμάτι

Κεφάλαιο Δ: Πειραματικές διατάξεις και ουσίες

Δ.1 Σκοπός της πειραματικής μελέτης

Η κρίσιμη συγκέντρωση αλβουμίνης για την εμφάνιση της μικροαλβουμινουρίας είναι τα 30 mg/24-ωρο, το οποίο αντιστοιχεί κατά μέσο όρο σε 30 mg/1,5L (ή 20 μg/ml) ενώ για την μακροαλβουμινουρία, η κρίσιμη συγκέντρωση αντιστοιχεί σε 300 mg/1,5L (ή 200 μg/ml) αλβουμίνης. Επομένως, για την πειραματική μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν έξι διαλύματα αλβουμίνης αραιωμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα φυσιολογικού ορού με συγκεντρώσεις:

- 10 μg/ml
- 20 μg/ml
- 50 μg/ml
- 100 μg/ml
- 150 μg/ml
- 200 μg/ml

Στα πλαίσια αυτά, η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία περιλαμβάνει τις εξής μελέτες:

- Φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης της αλβουμίνης στα διαλύματα με τις παραπάνω συγκεντρώσεις.
- Φασματοσκοπικές μελέτες φθορισμού της αλβουμίνης στα διαλύματα με τις παραπάνω συγκεντρώσεις.

Δ.2 Πειραματικές Διατάξεις

Δ.2.1 Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης

Στα πλαίσια της εν λόγω εργασίας τέθηκε απαραίτητη η χρήση μιας φασματοφωτομετρικής διάταξης απορρόφησης. Για τη λήψη και την καταγραφή των φασμάτων απορρόφησης, χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική συσκευή Perkin - Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer (Εικόνα 20).

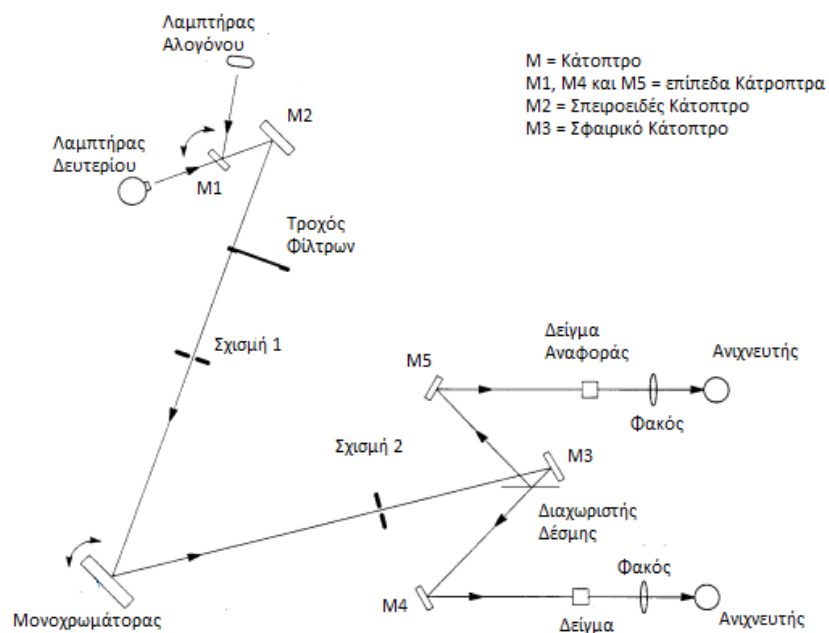
Δ.2.1.1 Εισαγωγή

Το Perkin - Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer είναι ένα ευέλικτο φασματοφωτόμετρο το οποίο λειτουργεί στις φασματικές περιοχές του υπεριώδους (UV) και του ορατού (VIS) φωτός. Διαθέτει ένα διπλής δέσμης, πλήρως ανακλαστικό οπτικό σύστημα. Το φασματοφωτόμετρο Lambda 35 μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών όπως υποδεικνύεται από τις προδιαγραφές του [61].



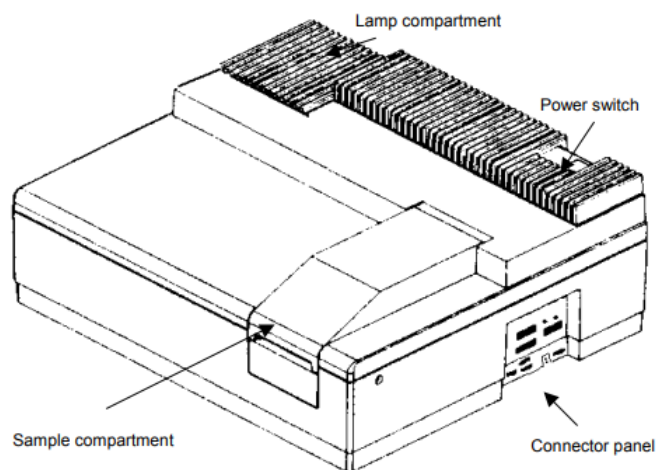
Εικόνα 20: Perkin - Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer

Παρακάτω ακολουθεί και το οπτικό διάγραμμα του οργάνου με την πορεία που ακολουθεί η φωτεινή δέσμη (Εικόνα 21):



Εικόνα 21: Οπτικό διάγραμμα που φασματοφωτομέτρου Perkin - Elmer Lambda 35 UV/VIS

Δ.2.1.2 Χαρακτηριστικά



Εικόνα 22: Χαρακτηριστικά φασματοφωτομέτρου Perkin - Elmer Lambda 35 UV/VIS

Το φασματόμετρο Lambda 35 UV/Vis διαθέτει ένα πλήρως ανακλαστικό οπτικό σύστημα. Τα οπτικά εξαρτήματα είναι επικαλυμμένα με πυρίτιο για ανθεκτικότητα. Το οπτικό σύστημα απεικονίζεται σχηματικά στην εικόνα 16. Ο μονοχρωμάτορας είναι ένα ολογραφικό κοίλο φράγμα με 1053 γραμμές/mm στο κέντρο. Δύο πηγές ακτινοβολίας, ένας λαμπτήρας Δευτερίου και ένας λαμπτήρας Αλογόνου, καλύπτουν το εύρος του μήκους κύματος λειτουργίας του φασματόμετρου. Για λειτουργία στο ορατό εύρος (Vis), το κάτοπτρο M1 ανακλά την ακτινοβολία από το λαμπτήρα Αλογόνου στο κάτοπτρο πηγής M2. Ταυτόχρονα το M1 μπλοκάρει την ακτινοβολία από το λαμπτήρα Δευτερίου. Για λειτουργία στην περιοχή του υπεριώδους (UV), το κάτοπτρο M1 ανυψώνεται ώστε να επιτρέπεται η ακτινοβολία από το λαμπτήρα Δευτερίου να χτυπήσει το κάτοπτρο της πηγής M2. Η αλλαγή πηγής γίνεται αυτόματα κατά την περιστροφή του μονοχρωμάτορα. Η ακτινοβολία από το λαμπτήρα πηγής ανακλάται από το κάτοπτρο πηγής M2 μέσω ενός οπτικού φίλτρου σε έναν τροχό φίλτρων. Ένας βηματικός κινητήρας οδηγεί τον τροχό των φίλτρων ώστε να βρίσκεται σε συγχρονισμό με το μονοχρωμάτορα. Ανάλογα με το μήκος κύματος που παράγεται, το κατάλληλο οπτικό φίλτρο βρίσκεται στη διαδρομή της δέσμης για να προ-φιλτράρει την ακτινοβολία πριν εισέλθει στον μονοχρωμάτορα. Από το οπτικό φίλτρο η ακτινοβολία διέρχεται από τη σχισμή εισόδου (σχισμή 1) στον μονοχρωμάτορα. Η φωτεινή δέσμη διασκορπίζεται στο φράγμα περίθλασης για να παραγάγει ένα φάσμα. Η περιστροφική θέση του πλέγματος επιλέγει αποτελεσματικά ένα τμήμα του φάσματος, ανακλώντας το μέσα απ' τη σχισμή εξόδου (σχισμή 1) στο κάτοπτρο M3. Η σχισμή εξόδου περιορίζει το τμήμα του φάσματος σε μια σχεδόν μονοχρωματική δέσμη ακτινοβολίας. Οι σχισμές στο εν λόγω φασματοφωτόμετρο είναι επιλέξιμες και παρέχουν μια φασματική ζώνη διέλευσης 0.5, 1, 2, ή 4 nm. Απ' το κάτοπτρο M3 η φωτεινή δέσμη θα ανακλαστεί σε έναν διαχωριστή δέσμης, ο οποίος επιτρέπει το 50% της να διέλθει στο κάτοπτρο M4 ενώ ανακλά το υπόλοιπο 50% στον καθρέφτη M5. Ο καθρέφτης M4 εστιάζει τη φωτεινή δέσμη στο κελί δείγματος. Εν συνεχεία, η δέσμη περνάει μέσα από έναν κυρτό φακό στον ανιχνευτή φωτοδιόδου. Τα δείγματα εξέτασης και αναφοράς τοποθετούνται σε δύο όμοιες κυβέττες οι οποίες εισάγονται στις κατάλληλες υποδοχές του οργάνου (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Υποδοχείς κυβεττών του οργάνου

Το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης που περιγράψαμε, ελέγχεται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή με τη βοήθεια του λογισμικού πακέτου UV WinLab. Αυτό επιτρέπει τη ρύθμιση διαφόρων παραμέτρων της εκάστοτε φασματοφωτομετρικής μέτρησης όπως επίσης και του τρόπου παρουσίασης των αποτελεσμάτων. Έτσι λοιπόν μπορούν να εκτελεστούν διεργασίες όπως:

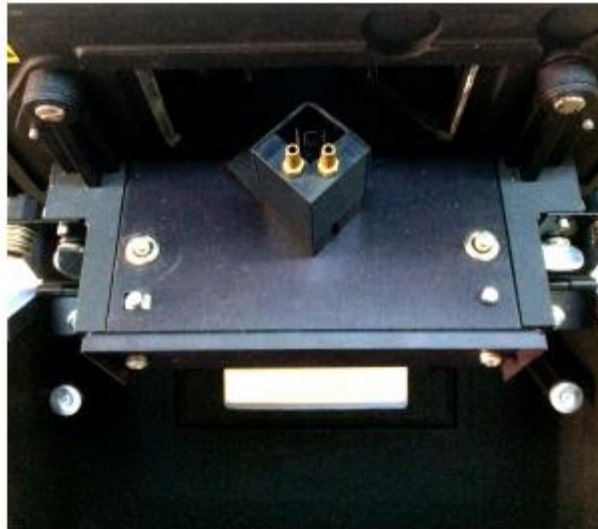
- Η επιλογή της περιοχής των μηκών κύματος για την οποία θα μετρήσουμε την απορρόφηση.
- Η επιλογή της ταχύτητας σάρωσης και του πλάτους της σχισμής του μονοχρωμάτορα.
- Ο μηδενισμός του σήματος που προέρχεται από το δείγμα αναφοράς και οφείλεται στον διαλύτη και το θόρυβο του οργάνου μέσω της επιλογής Autozero που διατίθεται.
- Η εξομάλυνση (smoothing).
- Η επεξεργασία των φασμάτων απορρόφησης που προκύπτουν [62].

Δ.2.2 Φασματοσκοπική διάταξη φθορισμού

Κατά τη διάρκεια διεξαγωγής της εργασίας χρειάστηκε επίσης η λήψη φασμάτων φθορισμού. Τα φάσματα αυτά πάρθηκαν με τη βοήθεια της φασματοσκοπικής διάταξης φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer (Εικόνα 24). Η συγκεκριμένη διάταξη μπορεί να ανιχνεύσει φθορισμό, φωσφορισμό, χημειοφωταύγεια ή βιοφωταύγεια. Η μέτρηση φασμάτων φθορισμού μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε για συνεχή σάρωση σε όλο το εύρος των μηκών κύματος του οργάνου (ή σε μέρος αυτής της περιοχής) είτε σε επιλεγμένα μήκη κύματος [63].

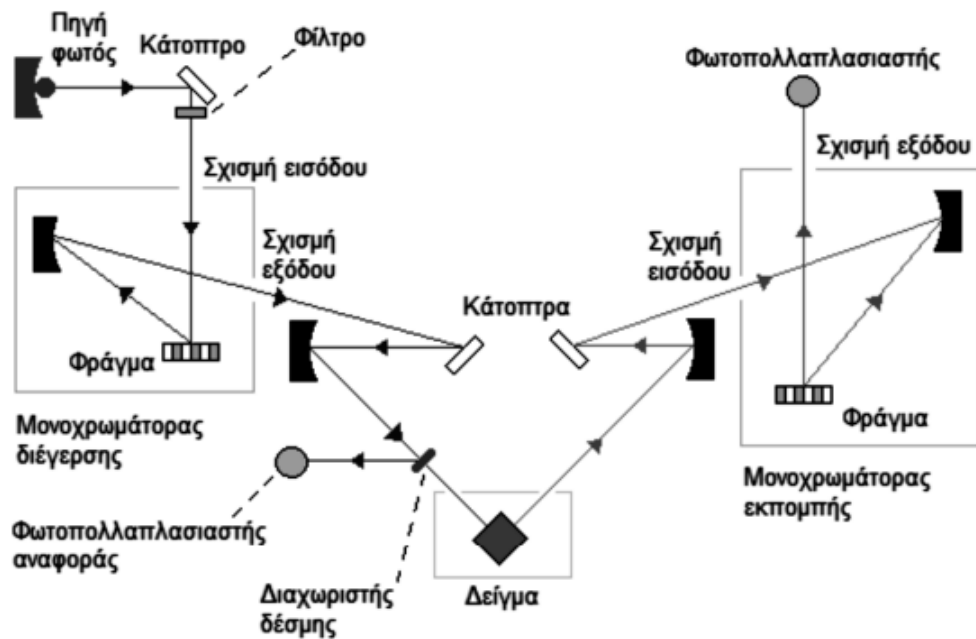


Εικόνα 24: Το φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer



Εικόνα 25: Υποδοχή κυβέττας οργάνου

Στη συνέχεια ακολουθεί το οπτικό διάγραμμα του οργάνου:



Εικόνα 26: Οπτικό διάγραμμα Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer

Η πηγή φωτός είναι μια λυχνία ξένου (Xenon flash tube), η οποία παράγει ένα ισχυρό παλμό μικρής χρονικής διάρκειας μέσα στο φασματικό εύρος του οργάνου. Όπως βλέπουμε και στην παραπάνω εικόνα, η ακτινοβολία από την πηγή εστιάζεται

από το ελλειψοειδές κάτοπτρο και ανακλάται από το τοροειδές κάτοπτρο μες στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα διέγερσης. Ο μονοχρωμάτορας αποτελείται από τη σχισμή εισόδου, ένα φράγμα 1440 γραμμών/mm, ένα σφαιρικό κάτοπτρο και τη σχισμή εξόδου. Μια συγκεκριμένη στενή φασματική περιοχή εξέρχεται από τη σχισμή εξόδου, με το κεντρικό μήκος κύματός της να καθορίζεται από τη θέση σάρωσης του φράγματος περίθλασης, η γωνία του οποίου ελέγχεται από βηματικό κινητήρα. Το μεγαλύτερο μέρος της δέσμης διέγερσης μεταφέρεται στην περιοχή του δείγματος μέσω ενός τοροειδούς κατόπτρου εστίασης. Ένα μικρό μέρος ανακλάται από το διαχωριστή δέσμης στο φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς. Προκειμένου να διορθώνεται η απόκλιση στο φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς, είναι αποθηκευμένη στο όργανο μια καμπύλη αναφοράς ροδαμίνης. Η τελευταία, απορροφά ενέργεια σε μήκος κύματος 230nm – 630nm και φθορίζει στα 650 nm, με σχεδόν σταθερή κβαντική απόδοση. Ο φθορισμός που εκπέμπεται από το δείγμα, εστιάζεται από το τοροειδές κάτοπτρο στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής. Ο μονοχρωμάτορας εκπομπής αποτελείται από τη σχισμή εισόδου, ένα σφαιρικό κάτοπτρο, ένα φράγμα περίθλασης 1200 γραμμών/mm και τη σχισμή εξόδου. Η στενή φασματική περιοχή που εξέρχεται από τη σχισμή εξόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής, το κεντρικό μήκος κύματος της οποίας καθορίζεται από τη θέση σάρωσης του φράγματος περίθλασης, η γωνία του οποίου ελέγχεται από ένα βηματικό κινητήρα, συγκεντρώνεται στο φωτοπολλαπλασιαστή για περαιτέρω ανάλυση.

Οι μονοχρωμάτορες διέγερσης και εκπομπής μπορούν να σαρώνουν ανεξάρτητα, συνδυαστικά ή οδηγούμενοι σε επιλεγμένα σημεία μέσα στο εύρος τους. Η σύγχρονη σάρωση μπορεί να είναι είτε μια σταθερή διαφορά μήκους κύματος είτε μια σταθερή διαφορά ενέργειας μεταξύ του μονοχρωμάτορα διέγερσης και εκπομπής. Το εύρος των μονοχρωματόρων είναι:

- Μονοχρωμάτορας διέγερσης: 200 nm έως 800 nm και μηδενικής τάξης
- Μονοχρωμάτορας εκπομπής: 200 nm έως 900 nm και μηδενικής τάξης

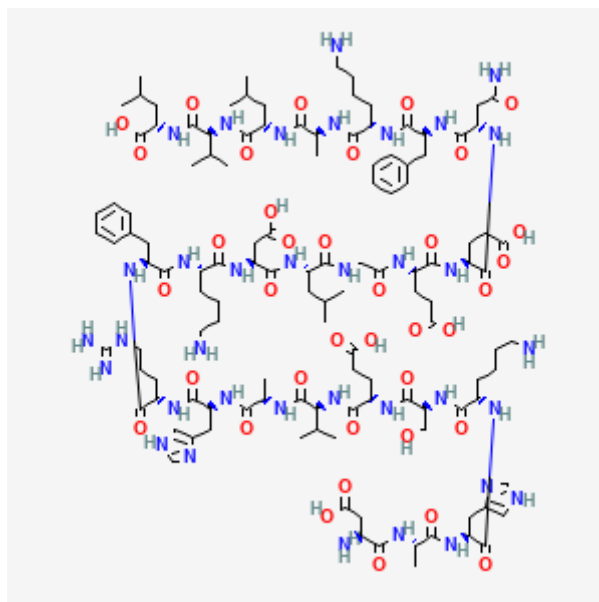
Όταν το όργανο χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του φθορισμού, εκτελούνται τέσσερις ολοκληρώσεις για κάθε κύκλο συλλογής δεδομένων: δύο ολοκληρώσεις λαμβάνονται από το κανάλι εκπομπής και δύο από το κανάλι διέγερσης. Οι ολοκληρώσεις αυτές εκτελούνται σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα σε σχέση με

την τελευταία αναλαμπή της λυχνίας ξένου. Λαμβάνεται μια ολοκλήρωση και των δύο κυρίων σημάτων διέγερσης και εκπομπής.

Οι δεύτερες ολοκληρώσεις πραγματοποιούνται στους δύο φωτοπολλαπλασιαστές για τη συλλογή του σήματος υπόβαθρου (σήμα που παράγεται όταν δεν προσπίπτει φως στη φωτοκάθοδο του φωτοπολλαπλασιαστή, dark current), το οποίο αφαιρείται από τα σήματα εξόδου των φωτοπολλαπλασιαστών. Τα σήματα που λαμβάνονται από τους φωτοπολλαπλασιαστές ενισχύονται και έπειτα ψηφιοποιούνται. Στη συνέχεια, σχηματίζεται ο λόγος του σήματος από το φωτοπολλαπλασιαστή δείγματος ως προς τον αντίστοιχο από τον φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς, για τη βελτίωση του λόγου σήματος προς το θόρυβο και για τη διόρθωση λόγω διακυμάνσεων στην εκπομπή της πηγής του φωτός. Κατόπιν, το σήμα πολλαπλασιάζεται με την καμπύλη διόρθωσης της ροδαμίνης που είναι αποθηκευμένη στο όργανο, για τη διόρθωση της φασματικής απόκρισης των φωτοπολλαπλασιαστών και την απόκριση διέλευσης του διαχωριστή δέσμης [96, 97]. Το φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer ελέγχεται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή με τη βοήθεια του λογισμικού πακέτου FL WinLab. Με το λογισμικό αυτό μπορούν να ρυθμίζονται οι παράμετροι του οργάνου και της μέτρησης καθώς και να εκτελούνται εργασίες όπως η επιλογή των μηκών κύματος, της ταχύτητας σάρωσης και του πλάτους της σχισμής κάθε μονοχρωμάτορα, η επιλογή του μήκους κύματος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται για τη διέγερση του δείγματος, ο μηδενισμός του σήματος που οφείλεται στο διαλύτη και το θόρυβο του φασματοφωτόμετρου φθορισμού (μέσω της κατάλληλης αφαίρεσης φάσματος φθορισμού της εν λόγω ουσίας) αλλά και η επεξεργασία των φασμάτων που προκύπτουν [64, 65].

Δ.3 Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν

Δ.3.1 Human Serum Albumin



Εικόνα 27: Μοριακή δομή της αλβουμίνης

- **Χημικός τύπος (chemical structure):** $C_{123}H_{193}N_{35}O_{37}$
- **Ακριβής μάζα (exact mass):** 2753.4330171
- **Μοριακό βάρος (molecular weight):** 2754.1

Η αλβουμίνη είναι η κύρια πρωτεΐνη του ανθρώπινου αίματος και αποτελεί περίπου το ήμισυ των πρωτεϊνών του ορού. Παράγεται στο ήπαρ και είναι διαλυτή στο νερό. Μεταφέρει ορμόνες, λιπαρά οξέα και άλλες ενώσεις, ρυθμίζει το pH και διατηρεί την ογκοτική πίεση, μεταξύ άλλων λειτουργιών. Κατά την διήθηση του αίματος στους νεφρούς ένα μικρό μόνο μέρος της πρωτεΐνης αυτής καταλήγει στα ούρα, ενώ το μεγαλύτερο μέρος συγκρατείται και επαναρρωφάται στην κυκλοφορία του αίματος. Σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης αυτής στα ούρα, γνωστή και ως πρωτεϊνουρία, πιθανότατα υποδηλώνει νεφρική βλάβη. Ανάλογα με τη συγκέντρωση

της αλβουμίνης στα ούρα καθώς και την ύπαρξη άλλων παθογνωμονικών πρωτεϊνών καθορίζεται και ο προσδιορισμός της εκάστοτε παθολογικής κατάστασης.

Κεφάλαιο Ε: Αποτελέσματα και Συμπεράσματα

E.1 Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης

Από το μητρικό μας διάλυμα αλβουμίνης συγκεντρώσεως 200 mg/ml με διαδοχικές αραιώσεις, φτιάχνουμε 6 διαλύματα με τις εξής συγκεντρώσεις (όπως επεξηγήθηκε και παραπάνω) :

- 10 μg/ml
- 20 μg/ml
- 50 μg/ml
- 100 μg/ml
- 150 μg/ml
- 200 μg/ml

Οι αραιώσεις γίνονται σε φυσιολογικό ορό. Τα διαλύματα αυτά εισάγονται σε κυβέττες φασματοφωτόμετρου απορρόφησης των 3ml. Πριν από την έναρξη των μετρήσεων γίνεται Autozero, δηλαδή μηδενισμός του σήματος για ελαχιστοποίηση του θορύβου αλλά και πιθανής απορρόφησης του διαλύτη. Για τη διεξαγωγή των μετρήσεων γίνεται χρήση του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης Perkin - Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer (όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο). Η λήψη των φασμάτων απορρόφησης για κάθε διάλυμα μετριέται από τα 200 μέχρι τα 400nm. Αναφέρεται ότι η σχέση που συνδέει την απορρόφηση με την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και την ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας περιγράφεται από το νόμο των Lambert – Beer:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon * b * c$$

Όπου: A: η απορρόφηση

I_0 : η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας

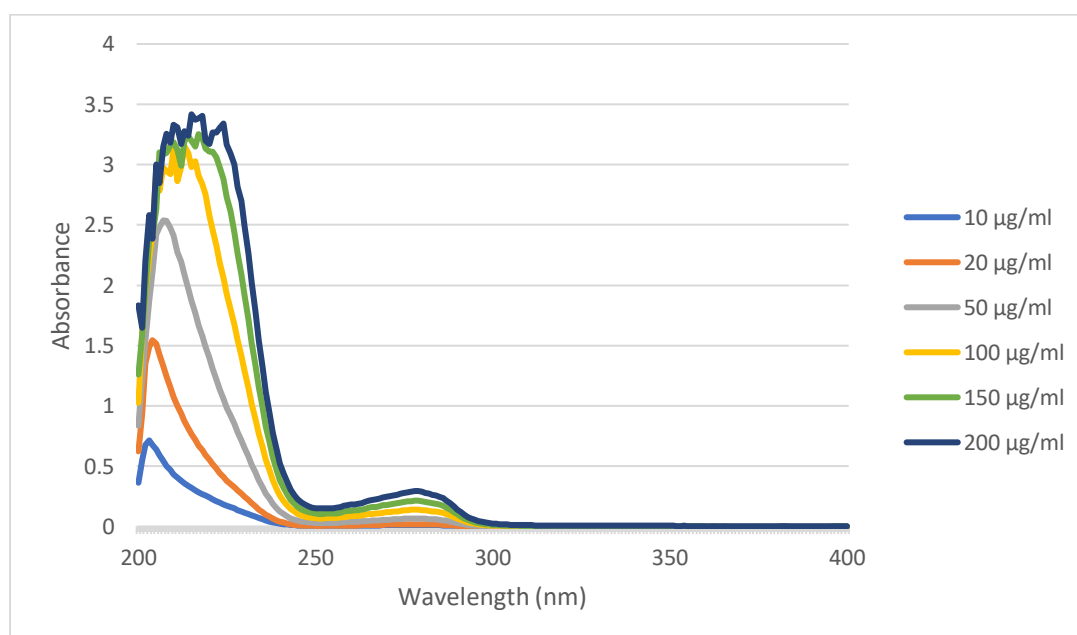
I: η ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας

ϵ : η μοριακή απορροφητικότητα ($l/mol \times cm$)

b: το πάχος της κυβέτας (cm)

c: η συγκέντρωση της απορροφούσας ουσίας (mol/l)

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται το φάσμα απορρόφησης της αλβουμίνης στις τιμές συγκεντρώσεων που αναφέραμε παραπάνω:



Διάγραμμα 1: Φάσμα απορρόφησης της αλβουμίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις

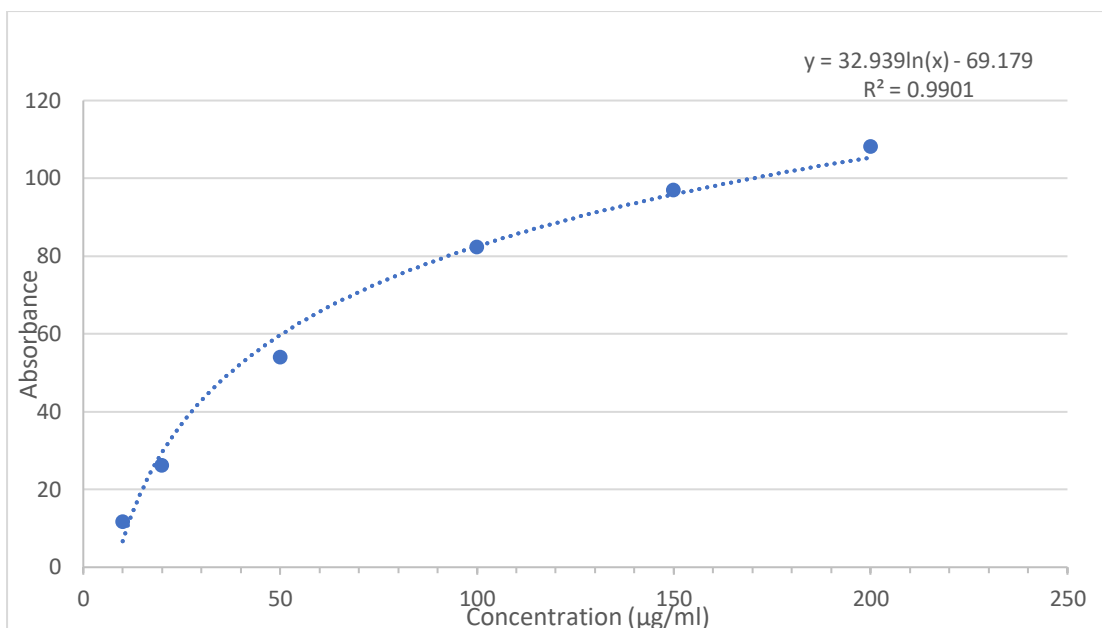
Απ' το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι η αλβουμίνη αραιωμένη σε φυσιολογικό ορό παρουσιάζει δύο μέγιστα. Ένα ισχυρό και ένα ασθενές. Το ασθενές μέγιστο είναι σταθερό ως προς τη συγκέντρωση σε μήκος κύματος 278 nm, ενώ το ισχυρό μετατοπίζεται δεξιότερα όσο μεγαλώνει η συγκέντρωση. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται solvatochromism.

Για την αναλυτικότερη επεξήγηση του φαινομένου αυτού, παρατίθεται ένας πίνακας στον οποίο αναγράφονται για καθένα από τα έξι διαλύματα η μέγιστη τιμή της απορρόφησης στο ισχυρό μέγιστο ($A_{\max(1)}$) καθώς και το μήκος κύματος εμφάνισής του:

Συγκέντρωση αλβουμίνης	Μήκος κύματος ισχυρού μεγίστου $\lambda_{\max(1)}$	Μέγιστη απορρόφηση $A_{\max(1)}$
10 $\mu\text{g/ml}$	203 nm	0,713
20 $\mu\text{g/ml}$	204 nm	1,544
50 $\mu\text{g/ml}$	207 nm	2,537
100 $\mu\text{g/ml}$	213 nm	3,152
150 $\mu\text{g/ml}$	214 nm	3,236
200 $\mu\text{g/ml}$	215 nm	3,417

Πίνακας 1: Μέγιστη απορρόφηση αλβουμίνης στις διάφορες συγκεντρώσεις στο ισχυρό μέγιστο

Επομένως, για την μελέτη της σχέσης της απορρόφησης ως προς την συγκέντρωση, χρησιμοποιούμε ένα εύρος μήκους κύματος από τα 200 nm έως τα 250 nm. Συγκεκριμένα, με βήμα 1 nm σε αυτήν την περιοχή, αθροίζουμε την απορρόφηση της αλβουμίνης στις διάφορες συγκεντρώσεις (απ' τα δεδομένα του παραπάνω διαγράμματος). Το διάγραμμα που προκύπτει φαίνεται παρακάτω:



Διάγραμμα 2: Μεταβολή της απορρόφησης της αλβουμίνης ως προς τη συγκέντρωση στην περιοχή μηκών κύματος 200 – 250 nm

Απ' το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρείται ότι η απορρόφηση της αλβουμίνης στη ζώνη μήκους κύματος από 200nm-250nm, μεταβάλλεται ως προς τη συγκέντρωση με βάση τη σχέση:

$$y = 32,939\ln(x) - 69,179 \text{ με } R^2 = 0,9901$$

Επομένως, η τεχνική αυτή μας παρέχει τη δυνατότητα της αναλυτικής ποσοτικοποίησης της αλβουμίνης, παρ' ότι δεν ακολουθείται η γραμμικότητα του νόμου Lambert – Beer.

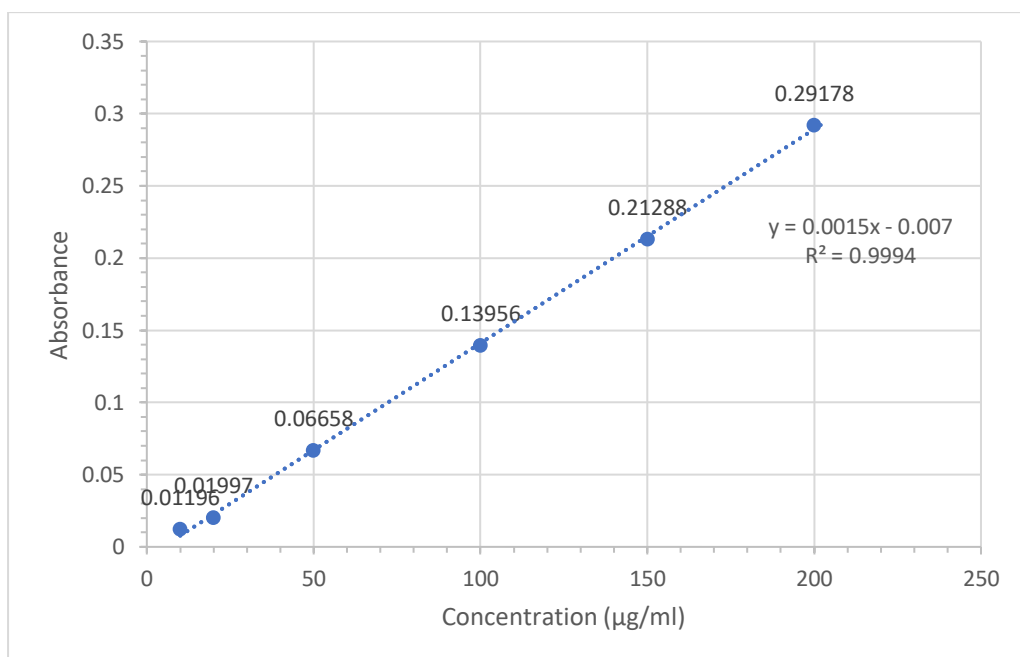
Παρακάτω, παρατίθεται ένας πίνακας στον οποίο αναγράφονται για καθένα από τα έξι διαλύματα η μέγιστη τιμή της απορρόφησης στο ασθενές μέγιστο ($A_{\max(2)}$) καθώς και το μήκος κύματος εμφάνισής της:

Συγκέντρωση αλβουμίνης	Μήκος κύματος ασθενούς μεγίστου $\lambda_{\max(2)}$	Μέγιστη απορρόφηση $A_{\max(2)}$
10 μg/ml	278 nm	0,011
20 μg/ml	278 nm	0,019
50 μg/ml	278 nm	0,066

100 µg/ml	278 nm	0,139
150 µg/ml	278 nm	0,212
200 µg/ml	278 nm	0,291

Πίνακας 2: Μέγιστη απορρόφηση αλβουμίνης στις διάφορες συγκεντρώσεις στο ασθενές μέγιστο

Ακολουθεί το διάγραμμα της απορρόφησης της αλβουμίνης ως προς τη συγκέντρωση σε μήκος κύματος 278 nm, όπου και παρατηρείται το δεύτερο μέγιστο της απορρόφησης (ασθενές μέγιστο):



Διάγραμμα 3: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης της αλβουμίνης ως προς τη συγκέντρωση σε μήκος κύματος 278 nm

Από το παραπάνω διάγραμμα εξάγεται το συμπέρασμα ότι η μέγιστη απορρόφηση της αλβουμίνης μεταβάλλεται ως προς τη συγκέντρωση με βάση τη σχέση:

$$y = 0,0015x - 0,007 \text{ με } R^2 = 0,9994$$

Επομένως, παρατηρείται ότι η μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης της αλβουμίνης σε σχέση με τη συγκέντρωση είναι γραμμική και ικανοποιεί απόλυτα της προϋποθέσεις του νόμου Lambert – Beer. Τα διαλύματα της ουσίας σε φυσιολογικό

ορό παρουσιάζουν υψηλή απορρόφηση για τιμή μήκους κύματος στα 278 nm και η απορρόφηση αυξάνεται προφανώς όσο αυξάνεται η συγκέντρωση.

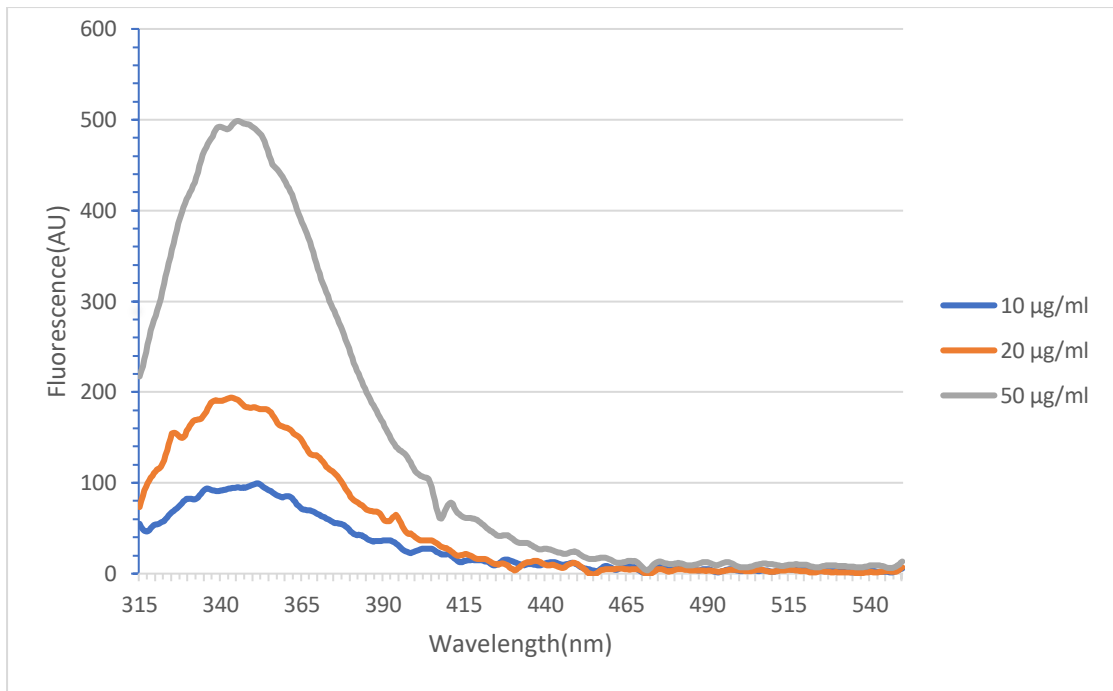
E.2 Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού

Από το μητρικό μας διάλυμα αλβουμίνης συγκεντρώσεως 200 mg/ml με διαδοχικές αραιώσεις, φτιάχνουμε 6 διαλύματα με τις εξής συγκεντρώσεις (όπως επεξηγήθηκε και παραπάνω):

- 10 µg/ml
- 20 µg/ml
- 50 µg/ml
- 100 µg/ml
- 150 µg/ml
- 200 µg/ml

Οι αραιώσεις γίνονται σε φυσιολογικό ορό. Τα διαλύματα αυτά εισάγονται σε κυβέττες φασματοφωτόμετρου φθορισμού των 3ml. Πριν από την έναρξη των μετρήσεων γίνεται μηδενισμός του σήματος για αποφυγή σφαλμάτων λόγω θορύβου αλλά και πιθανότητας φθορισμού του διαλύτη. Η διέγερση γίνεται σε μήκος κύματος 295 nm και η συλλογή σε εύρος από 315 nm έως 550 nm. Για τη διεξαγωγή των μετρήσεων γίνεται χρήση του φασματοφωτόμετρου φθορισμού PerkinElmer LS 45 Luminescence Spectrometer.

Στο παρακάτω διάγραμμα, παρουσιάζονται τα φάσματα που προέκυψαν από το φασματοφωτόμετρο φθορισμού:



Διάγραμμα 4: Φάσμα φθορισμού της αλβουμίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις

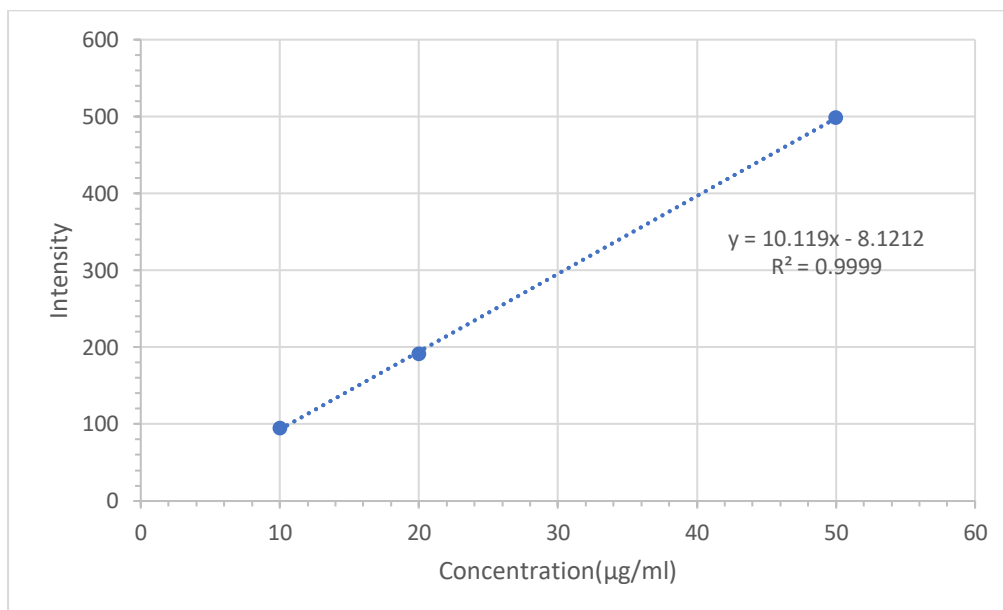
Παρατηρούμε ότι ο μέγιστος εκπεμπόμενος φθορισμός της αλβουμίνης καταγράφηκε στα 345 nm. Για τις συγκεντρώσεις αλβουμίνης των 100 µg/ml, 150 µg/ml και 200 µg/ml, ο φθορισμός ήταν πολύ υψηλός και δεν κατέστη δυνατή η μέτρησή του με το εν λόγω φασματοφωτόμετρο φθορισμού.

Επομένως, αναλυτικά, ο μέγιστος φθορισμός εντοπίζεται για τιμή μήκους κύματος 345 nm και λαμβάνει τις εξής τιμές:

Συγκέντρωση αλβουμίνης	Μέγιστος φθορισμός στα 345 nm
10 µg/ml	94,987
20 µg/ml	191,701
50 µg/ml	498,469
100 µg/ml	<i>Δεν μετρήθηκε</i>
150 µg/ml	<i>Δεν μετρήθηκε</i>
200 µg/ml	<i>Δεν μετρήθηκε</i>

Πίνακας 3: Μέγιστος φθορισμός αλβουμίνης στις διάφορες συγκεντρώσεις

Παρακάτω, ακολουθεί το διάγραμμα της μέγιστης τιμής φθορισμού (σε μήκος κύματος των 345 nm), σε σχέση με τις διάφορες συγκεντρώσεις της αλβουμίνης:



Διάγραμμα 5: Μεταβολή του μέγιστου φθορισμού της αλβουμίνης ως προς τη συγκέντρωση σε μήκος κύματος 345 nm

Απ' το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρείται ότι η καμπύλη μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ως προς τη συγκέντρωση της ουσίας περιγράφεται από την σχέση:

$$y = 10,119x - 8,1212 \text{ με } R^2 = 0,9999$$

όπου y είναι το σήμα φθορισμού που προκύπτει από τα μετρούμενα διαλύματα με συγκέντρωση x . Προκύπτει λοιπόν το συμπέρασμα ότι η ένταση του σήματος φθορισμού μεταβάλλεται γραμμικά σε σχέση με τη συγκέντρωση των διαλυμάτων που μετρήθηκαν.

Κεφάλαιο Ζ: Γενικά Συμπεράσματα

Z.1 Απορρόφηση της αλβουμίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις σε διάλυμα φυσιολογικού ορού

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν όσον αφορά την απορρόφηση της αλβουμίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, απέδειξαν ικανοποιητική συμπεριφορά της πρωτεΐνης αυτής. Η αλβουμίνη διατηρεί μια χαρακτηριστική μορφή φάσματος για κάθε τιμή της συγκέντρωσης. Παρατηρείται, πως η τιμή της απορρόφησης μεταβάλλεται γραμμικά ως προς τη συγκέντρωση σε μήκος κύματος 280 nm με βάση τη σχέση:

$$y = 0,0015x - 0,007$$

σύμφωνα με το νόμο Lambert - Beer ενώ μεταβάλλεται στο εύρος μήκους κύματος 200 nm – 250 nm με βάση τη σχέση:

$$y = 32,939\ln(x) - 69,179$$

Z.2 Φθορισμός της αλβουμίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις σε διάλυμα φυσιολογικού ορού

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν όσον αφορά την εκπομπή φθορισμού της αλβουμίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, απέδειξαν ικανοποιητική συμπεριφορά της πρωτεΐνης αυτής. Η αλβουμίνη διατηρεί μια χαρακτηριστική μορφή φάσματος φθορισμού για κάθε τιμή της συγκέντρωσης, όταν ως διέγερση ορίζεται το μήκος κύματος των 295 nm. Παρατηρείται, πως η τιμή του φθορισμού μεταβάλλεται γραμμικά ως προς την συγκέντρωση με βάση τη σχέση:

$$y = 10,119x - 8,1212$$

Επιπλέον, εμφανίζει μέγιστη εκπομπή για μήκος κύματος 345 nm.

Ζ.3 Προτάσεις για το μέλλον

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποδείχθηκαν ελπιδοφόρα και επιβεβαίωσαν την σημασία της φασματοφωτομετρικής μελέτης της αλβουμίνης για την ανίχνευση της αλβουμινουρίας. Μάλιστα, η χρήση μεθόδων όπως η φασματομετρία απορρόφησης και η φασματομετρία φθορισμού χωρίς επισήμανση της αναλυόμενης ουσίας, εμφανίζει σημαντικά πλεονεκτήματα λόγω της ευκολίας της μεθόδου, της ταχύτητάς της αλλά και της μη χρείας ειδικών οργάνων ή ειδικά εξοπλισμένων κλινικών ή εργαστηρίων.

Σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης των οπτικών ιδιοτήτων της αλβουμίνης με τις μεθόδους της φασματομετρίας απορρόφησης και φασματομετρίας φθορισμού χωρίς επισήμανση της αναλυόμενης ουσίας είναι η μελλοντική εφαρμογή τους ως διαγνωστικά εργαλεία για την συστηματικότερη παρακολούθηση της αλβουμινουρίας, με τη χρήση ενός χαμηλού κόστους φορητού βιοαισθητήρα, χωρίς τη χρεία ειδικά εξοπλισμένων κλινικών ή εργαστηρίων με εξειδικευμένο προσωπικό, στο οποίο θα έχει πρόσβαση το ευρύτερο κοινό για κατ' οίκον εξέταση. Πιο συγκεκριμένα, η επαναλαμβανόμενη ανίχνευση υψηλών συγκεντρώσεων αλβουμίνης με την παραπάνω διάταξη, θα αποτελέσει ένα ασφαλές προγνωστικό εργαλείο με στόχο την αντιμετώπιση της αλβουμινουρίας σε πρώιμο στάδιο.

Παρ' όλους τους περιορισμούς που προέκυψαν είναι εμφανές ότι αξίζει να διεξαχθούν περαιτέρω πειράματα και μελέτες έτσι ώστε να αντιμετωπιστούν κάποια από τα υπάρχοντα προβλήματα και να μπορέσει η φασματοφωτομετρική μελέτη της αλβουμίνης να αποτελέσει ένα ισχυρό διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση της αλβουμινουρίας.

Πιο συγκεκριμένα, πολύ σημαντικές προτάσεις και μελλοντικές προοπτικές είναι:

- Η αναλυτικότερη φασματοφωτομετρική μελέτη της αλβουμίνης με τις παραπάνω μεθόδους σε δείγμα ούρων ασθενών

- Η διερεύνηση όλων των συστατικών (π.χ. πρωτεΐνες παρόμοιας μοριακής δομής, αμινοξέα, ουρικό οξύ κ.λπ.) των ούρων που απορροφούν είτε φθορίζουν σε παρόμοια μήκη κύματος με την αλβουμίνη, με πιθανό αποτέλεσμα να επηρεάζουν τις πειραματικές μετρήσεις
- Η συγκριτική μελέτη των δειγμάτων με άλλες συμβατικές μεθόδους για την ενδεδειγμένη εξέταση της αξιοπιστίας των μεθόδων που εφαρμόστηκαν

BIBΛIOΓPAΦIA

- [1] S. Aitekenov, A. Gaipov, R. Bukasov, Review: Detection and quantification of proteins in human urine, *Talanta* 223 (2021) pp. 1-14.
- [2] G.C. Viberti, R.J. Jarrett, U. Mahmud, R.D. Hill, A. Argyropoulos, H. Keen, Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus, *Lancet* 319 (1982) 1430–1432.
- [3] H.J. Lambers Heerspink, J.W. Brinkman, S.J. Bakker, R.T. Gansevoort, D. de Zeeuw, Update on microalbuminuria as a biomarker in renal and cardiovascular disease, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 15 (2006) 631–636.
- [4] W.G. Miller, D.E. Bruns, G.L. Hortin, S. Sandberg, K.M. Aakre, M.J. McQueen, Y. Itoh, J.C. Lieske, D.W. Secombe, G. Jones, D.M. Bunk, G.C. Curhan, A. S. Narva, Current issues in measurement and reporting of urinary albumin excretion, *Clin. Chem.* 55 (2009) 24–38.
- [5] A. Marimuthu, RobertN. O’Meally, R. Chaerkady, Y. Subbannayya, V. Nanjappa, P. Kumar, D.S. Kelkar, S.M. Pinto, R. Sharma, S. Renuse, R. Goel, R. Christopher, B. Delanghe, RobertN. Cole, H.C. Harsha, A. Pandey, A comprehensive map of the human urinary proteome, *J. Proteome Res.* 10 (2011) 2734–2743.
- [6] R.A. Kyle, D.P. Steensma, History of multiple myeloma, in: T. Moehler, H. Goldschmidt (Eds.), *Multiple Myeloma*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2011, pp. 3–23.

- [7] P. Kutwin, T. Konecki, E.M. Borkowska, M. Traczyk-Borszynska, Z. Jablonowski, Urine miRNA as a Potential Biomarker for Bladder Cancer Detection – a Meta-Analysis, CEJU, 2018.
- [8] D. Theodorescu, S. Wittke, M.M. Ross, M. Walden, M. Conaway, I. Just, H. Mischak, H.F. Frierson, Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis, *Lancet Oncol.* 7 (2006) 230–240.
- [9] A. Bhasin, E.C. Sanders, J.M. Ziegler, J.S. Briggs, N.P. Drago, A.M. Attar, A. M. Santos, M.Y. True, A.F. Ogata, D.V. Yoon, S. Majumdar, A.J. Wheat, S.V. Patterson, G.A. Weiss, R.M. Penner, Virus bioresistor (VBR) for detection of bladder cancer marker DJ-1 in urine at 10 pM in one minute, *Anal. Chem.* 92 (2020) 6654–6666.
- [10] L.U. Zimmerli, E. Schiffer, P. Zürbig, D.M. Good, M. Kellmann, L. Mouls, A.R. Pitt, J.J. Coon, R.E. Schmieder, K.H. Peter, H. Mischak, W. Kolch, C. Delles, A. F. Dominiczak, Urinary proteomic biomarkers in coronary artery disease, *Mol. Cell. Proteomics* 7 (2008) 290–298.
- [11] K. Rossing, H. Mischak, M. Dakna, P. Zürbig, J. Novak, B.A. Julian, D.M. Good, J.J. Coon, L. Tarnow, P. Rossing, Urinary proteomics in diabetes and CKD, *J. Am. Soc. Nephrol.* 19 (2008) 1283–1290.
- [12] P. Raja, A.P. Maxwell, D.P. Brazil, The Potential of Albuminuria as a Biomarker of Diabetic Complications, *Cardiovasc Drugs Ther*, 2020.
- [13] M.T.S. Robles, P.G. Cantalupo, A.M. Duray, M. Freeland, M. Murkowski, A. van Bokhoven, A.J. Stephens Shields, J.M. Pipas, M.J.

Imperiale, Analysis of viruses present in urine from patients with interstitial cystitis, *Virus Gene*. 56 (2020) 430–438.

[14] M. Niedrig, P. Patel, A.A. El Wahed, R. Sch ¨ adler, S. Yactayo, Find the right sample: a study on the versatility of saliva and urine samples for the diagnosis of emerging viruses, *BMC Infect. Dis.* 18 (2018) 707.

[15] R.E. Gilbert, A. Akdeniz, G. Jerums
Detection of microalbuminuria in diabetic patients by urinary dipstick
Diabetes Res Clin Pract, 35 (1997), pp. 57-60

[16] O. Giampietro, G. Penno, A. Clerico, *et al.*
Which method for quantifying “microalbuminuria” in diabetics?
Comparison of several immunological methods (immunoturbidimetric assay, immunonephelometric assay, radioimmunoassay and two semiquantitative tests) for measurement of albumin in urine
Acta Diabetol, 28 (1992), pp. 239-245

[17] W.L. Roberts, C.B. Calcote, C.B. Cook, *et al.*
Comparison of four commercial urinary albumin (microalbumin) methods: Implications for detecting diabetic nephropathy using random urine specimens
Clin Chim Acta, 273 (1998), pp. 21-33

[18] J.L. Strobel, S.G. Cady, T.K. Borg, *et al.*
Identification of fibroblasts as a major site of albumin catabolism in peripheral tissues
J Biol Chem, 261 (1986), pp. 7989-7994

[19] S. Yedgar, T.E. Carew, R.C. Pittman, *et al.*
Tissue sites of catabolism of albumin in rabbits
Am J Physiol, 244 (1983), pp. E101-E107

[20] T.M. Osicka, W.D. Comper
Characterization of immunochemically nonreactive urinary albumin
Clin Chem, 50 (2004), pp. 2286-2291

[21] T.M. Osicka, W.D. Comper, Detection of urinary albumin, *Advances in Chronic Kidney Disease*, 12 (2005), pp. 170-176.

- [22] M.F. Carroll, J.L. Temte, Proteinuria in adults: a diagnostic approach, *Am. Fam. Physician* 62 (2000) 1333–1340.S.
- [23] C.S. Wingo, W. L. Clapp, Proteinuria: potential causes and approach to evaluation, *Am. J. Med. Sci.* 320 (2000) 188–194.
- [24] B. E, G. R, F.-S. P, M. E, B. M, Classification of renal proteinuria: a simple algorithm, *Clin. Chem. Lab. Med.* 40 (2002) 1143–1150.
- [25] G. D'Amico, C. Bazzi, Pathophysiology of proteinuria, *Kidney Int.* 63 (2003) 809–825.
- [26] J. Huart, A. Bouquegneau, L. Lutteri, P. Erpicum, S. Grosch, G. Resimont, P. Wiesen, C. Bovy, J.-M. Krzesinski, M. Thys, B. Lambermont, B. Misset, H. Pottel, C. Mariat, E. Cavalier, S. Burtey, F. Jouret, P. Delanaye, Proteinuria in COVID-19: Prevalence, Characterization and Prognostic Role, 2020.
- [27] A.I. Chaparro, C.D. Mitchell, C.L. Abitbol, J.D. Wilkinson, G. Baldarrago, E. Lopez, G. Zilleruelo, Proteinuria in children infected with the human immunodeficiency virus, *J. Pediatr.* 152 (2008) 844–849.
- [28] A.K.C. Leung, A.H.C. Wong, S.S.N. Barg, Proteinuria in children: evaluation and differential diagnosis, *Am. Fam. Physician* 95 (2017) 248–254.
- [29] J.E. Toblli, P. Bevione, F. Di Gennaro, L. Madalena, G. Cao, M. Angerosa, Understanding the mechanisms of proteinuria: therapeutic implications, *International Journal of Nephrology* (2012), e546039.
- [30] A.C. Webster, E.V. Nagler, R.L. Morton, P. Masson, Chronic kidney disease, *Lancet* 389 (2017) 1238–1252.
- [31] R.G. Fassett, S.K. Venuthurupalli, G.C. Gobe, J.S. Coombes, M.A. Cooper, W. E. Hoy, Biomarkers in chronic kidney disease: a review, *Kidney Int.* 80 (2011) 806–821.

[32] J. Coresh, B.C. Astor, T. Greene, G. Eknoyan, A.S. Levey, Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: third national health and nutrition examination survey, *Am. J. Kidney Dis.* 41 (2003) 1–12.

[33] Q.-L. Zhang, D. Rothenbacher, Prevalence of chronic kidney disease in population-based studies: systematic review, *BMC Publ. Health* 8 (2008) 117.

[34] P.G. Righetti, Electrophoresis: the march of pennies, the march of dimes, *J. Chromatogr. A* 1079 (2005) 24–40.

[35] V. Kasicka, Recent developments in capillary and microchip electroseparations of peptides (2017–mid 2019), *Electrophoresis* 41 (2020) 10–35.

[36] Θ.Π. Χατζηϊωάννου, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑΙ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, Ιδιωτική Έκδοση, 1980

[37] M. Zoccali, P.Q. Tranchida, L. Mondello, Fast gas chromatography-mass spectrometry: a review of the last decade, *Trac. Trends Anal. Chem.* 118 (2019) 444–452.

[38] F. Rigano, P.Q. Tranchida, P. Dugo, L. Mondello, High-performance liquid chromatography combined with electron ionization mass spectrometry: a review, *Trac. Trends Anal. Chem.* 118 (2019) 112–122.

[39] J.P. Le Floch, M. Marre, M. Rodier, *et al.*
Interest of Clinitek Microalbumin in screening for micro-albuminuria: Results of a multicenter study in 302 diabetic patients
Diab Metab, 27 (2001), pp. 36-39

[40] U. Meinhardt, R.A. Ammann, C. Fluck, *et al.*
Microalbuminuria in diabetes mellitus: Efficacy of a new screening method in comparison with timed overnight urine collection
J Diabetes Comp, 17 (2003), pp. 254-257

[41] M. Parsons, D.J. Newman, M. Pugia, *et al.*
Performance of a reagent strip device for quantitation of the urine albumin:creatinine ratio in a point of care setting
Clin Nephrol, 51 (1999), pp. 220-227

- [42] C.E. Mogensen, G.C. Viberti, E. Peheim, *et al.*
Multicenter evaluation of the Micral-Test II test strip, an immunologic rapid test for the detection of microalbuminuria
Diabetes Care, 20 (1997), pp. 1642-1646
- [43] R.E. Gilbert, A. Akdeniz, G. Jerums
Detection of microalbuminuria in diabetic patients by urinary dipstick
Diabetes Res Clin Pract, 35 (1997), pp. 57-60
- [44] Μ. Όξενκιουν-Πετροπούλου, Α. Παππά, ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ, συλλογική έκδοση εργαστηρίου ανόργανης και αναλυτικής χημείας, 2009
- [45] R.A. Alharbi, Proteomics approach and techniques in identification of reliable biomarkers for diseases, *Saudi J. Biol. Sci.* 27 (2020) 968–974.
- [46] S. Kalantari, A. Jafari, R. Moradpoor, E. Ghasemi, E. Khalkhal, Human urine proteomics: analytical techniques and clinical applications in renal diseases, *International Journal of Proteomics* (2015), e782798.
- [47] M. Nikolov, C. Schmidt, H. Urlaub, Quantitative mass spectrometry-based proteomics: an overview, in: K. Marcus (Ed.), *Quantitative Methods in Proteomics*, Humana Press, Totowa, NJ, 2012, pp. 85–100.
- [48] P.L. Urban, Quantitative mass spectrometry: an overview, *Phil. Trans. Math. Phys. Eng. Sci.* 374 (2016) 20150382.
- [49] S.K.G. Grebe, R.J. Singh, Clinical peptide and protein quantification by mass spectrometry (MS), *Trac. Trends Anal. Chem.* 84 (2016) 131–143.
- [50] R. Singh, F.W. Crow, N. Babic, W.H. Lutz, J.C. Lieske, T.S. Larson, R. Kumar, A liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantification of urinary albumin using a novel ¹⁵N-isotopically labeled albumin internal standard, *Clin. Chem.* 53 (2007) 540–542.
- [51] L. Denoroy, L. Zimmer, B. Renaud, S. Parrot, Ultra high performance liquid chromatography as a tool for the discovery and the analysis of biomarkers of diseases: a review, *J. Chromatogr. B* 927 (2013) 37–53.

- [52] K.M. Slagle, S.J. Ghosn, Immunoassays: tools for sensitive, specific, and accurate test results, *Lab. Med.* 27 (1996) 177–183.
- [53] A.B. Kapingidza, K. Kowal, M. Chruszcz, Antigen–antibody complexes, in: U. Hoeger, J.R. Harris (Eds.), *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and Other Body Fluid Proteins*, Springer International Publishing, Cham, 2020, pp. 465–497.
- [54] J.W.A. Findlay, W.C. Smith, J.W. Lee, G.D. Nordblom, I. Das, B.S. DeSilva, M. N. Khan, R.R. Bowsher, Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 21 (2000) 1249–1273.
- [55] I.A. Darwish, Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: basic methodology and recent advances, *Int. J. Biomed. Sci.* 2 (2006) 217–235.
- [56] S. Zhao, Y. Zhang, S. Ding, J. Fan, Z. Luo, K. Liu, Q. Shi, W. Liu, G. Zang, A highly sensitive label-free electrochemical immunosensor based on AuNPs-PtNPs-MOFs for nuclear matrix protein 22 analysis in urine sample, *J. Electroanal. Chem.* (2019) 33–42.
- [57] B. Stuart, Introduction. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, Ltd, 2005, pp. 1–13.
- [58] D. Yang, Y. Ying, Applications of Raman spectroscopy in agricultural products and food analysis: a review, *Appl. Spectrosc. Rev.* 46 (2011) 539–560.
- [59] A.J. Gomes, C.N. Lunardi, F.S. Rocha, G.S. Patience, Experimental methods in chemical engineering: fluorescence emission spectroscopy, *Can. J. Chem. Eng.* 97 (2019) 2168–2175.
- [60] <https://jascoinc.com/applications/protein-quantitation-spectrophotometer/>
- [61] https://people.bath.ac.uk/gp304/uv/PerkinElmer_Lambda35_manual_EN.pdf

[62]https://my.che.utah.edu/~tony/chen4903/equipment/A_Spectrometer/MANUAL_UV_Winlab_Software.pdf

[63]https://my.che.utah.edu/~tony/chen4903/equipment/A_Spectrometer/MANUAL_UV_Winlab_Software.pdf

[64] Κωνσταντίνος – Θωμάς Καζαντζής. Συγκριτική μελέτη φωτοευαίσθητων παραγώγων κουρκουμίνης με χρήση μικροσκοπίας και φασματοσκοπίας φθορισμού. Διπλωματική εργασία, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2017.

[65] Κουτσονικολή Αικατερίνη. Συγκριτικές μελέτες φωτοφυσικών ιδιοτήτων παραγώγων της κουρκουμίνης για ενδεχόμενη χρήση τους στη φωτοδυναμική θεραπεία. Διπλωματική εργασία, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2015.