

**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Ιατρικής
Εργαστήριο Βιοχημείας**

BIOΧΗΜΕΙΑ Ι

- Πληροφορίες για το μάθημα
- Οδηγός μελέτης
 - Σκοποί
 - Δεξιότητες
 - Αναλυτική Ύλη
 - Βιβλιογραφία
- Υλικό Φροντιστηρίων
- Εργαστηριακές Ασκήσεις

Όνομα Φοιτητή:

Λάρισα 2012

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
Πληροφορίες	2
Οδηγός Μελέτης	3
Σκοποί Μαθήματος	3
Δεξιότητες	3
Αναλυτική Ύλη	4
Βιβλιογραφία	11
Υλικό Φροντιστηρίων	12
1 ^ο Φροντιστήριο	13
2 ^ο Φροντιστήριο	18
3 ^ο Φροντιστήριο	22
Εργαστηριακές Ασκήσεις	28
Κανόνες Ασφάλειας Εργαστηρίου	29
Ασκήσεις 1-3	30
Κινητική Ενζυμικών Αντιδράσεων	
Άσκηση 1	35
Κινητική Ενζυμικών Αντιδράσεων Α	
Άσκηση 2	38
Κινητική Ενζυμικών Αντιδράσεων Β	
Άσκηση 3	47
Κινητική Ενζυμικών Αντιδράσεων Γ	
Άσκηση 4	52
Προσδιορισμός και Ηλεκτροφόρηση Αιμοσφαιρινών	
Άσκηση 5	59
Προσδιορισμός Λιπιδίων του Αίματος	
Ευχαριστίες	69

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΑΘΗΜΑ ΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ Ι

Η διδασκαλία του μαθήματος της Βιοχημείας Ι συνίσταται από διαλέξεις, φροντιστήρια και εργαστηριακές ασκήσεις.

Οι **διαλέξεις** αναπτύσσουν την ύλη που περιγράφεται γενικά στον οδηγό σπουδών και με λεπτομέρεια στην **Αναλυτική Ύλη** που επισυνάπτεται σε αυτό το Φυλλάδιο.

Τα **φροντιστήρια** ανακεφαλαιώνουν και εμβαθύνουν στην ύλη με την χρήση παραδειγμάτων κλινικών περιστατικών που αναδεικνύουν την εφαρμογή των Βιοχημικών γνώσεων στην διάγνωση και αντιμετώπιση σοβαρών ασθενειών.

Οι **εργαστηριακές ασκήσεις** αποτελούν την πρακτική άσκηση των φοιτητών και είναι απαραίτητο συμπλήρωμα των διαλέξεων. Σκοπός τους είναι να σας εξοικειώσουν με την χρήση διαφόρων τεχνικών, την λειτουργία διαφόρων οργάνων και την διεξαγωγή διαφόρων δοκιμασιών που χρησιμοποιούνται συχνά στην Βιοχημεία, καθώς και στο να σας βοηθήσουν να κατανοήσετε μερικές έννοιες που δεν γίνονται σαφώς αντιληπτές θεωρητικά.

Οι ασκήσεις γίνονται σε ομάδες **τριών** φοιτητών. Οι ομάδες σχηματίζονται στην αρχή του εξαμήνου και δεν αλλάζουν στην διάρκεια του εξαμήνου. Η **συμμετοχή στις ασκήσεις** καθώς και η **γραφτή αναφορά** των αποτελεσμάτων των ασκήσεων, η οποία γίνεται από τους φοιτητές στην διάρκεια των εργαστηρίων στο φυλλάδιο του εργαστηρίου, είναι **υποχρεωτική**. Δεν επιτρέπεται **καμία** απουσία.

Οι φοιτητές πρέπει να προσέρχονται στα εργαστήρια κατάλληλα προετοιμασμένοι (έχοντας διαβάσει το Φυλλάδιο) και εξοπλισμένοι (μολύβια, χάρακες, κομπιουτεράκια κλπ) για να εκτελέσουν σωστά τα πειράματα και να επεξεργαστούν τα αποτελέσματα συμπληρώνοντας με επιτυχία την αναφορά των αποτελεσμάτων. Η αναφορά περιλαμβάνει τις μετρήσεις (παρουσιασμένες σε πίνακες, σχεδιαγράμματα κ.λ.π.), και τα συμπεράσματα που βγάξετε (π.χ. αν πήρατε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, αν όχι γιατί όχι, πηγές πιθανών λαθών στα πειράματα κ.λ.π) όπως ζητά κάθε άσκηση. Στο τέλος κάθε άσκησης, η γραπτή αναφορά ελέγχεται από τους διδάσκοντες και **υπογράφεται**, εφόσον έχει συμπληρωθεί σωστά. Η επιτυχής συμμετοχή στην άσκηση πιστοποιείται από την υπογραφή του διδάσκοντος στη γραπτή αναφορά των αποτελεσμάτων.

Στο τέλος του εξαμήνου οι φοιτητές εξετάζονται γραπτά στο περιεχόμενο των Εργαστηρίων. Στις **εξετάσεις του Εργαστηρίου** εξεταστέα ύλη είναι η θεωρία, η μεθοδολογία και οι τρόποι επεξεργασίας αποτελεσμάτων που περιλαμβάνονται στο Φυλλάδιο ή αναπτύσσονται από τους διδάσκοντες κατά την διάρκεια των εργαστηρίων. Δικαίωμα συμμετοχής στις εξετάσεις του Εργαστηρίου έχουν μόνον όσοι συμμετείχαν με επιτυχία στις εργαστηριακές ασκήσεις.

Οι **εξετάσεις του μαθήματος** είναι γραπτές, διάρκειας 3 ωρών, και αποτελούνται από θέματα προς ανάπτυξη ή πολλαπλής επιλογής. Εξεταστέα ύλη αποτελεί η Αναλυτική Ύλη που επισυνάπτεται σε αυτό το Φυλλάδιο. Δικαίωμα συμμετοχής σε αυτές τις εξετάσεις έχουν μόνον όσοι φοιτητές πέρασαν τις εξετάσεις του Εργαστηρίου. Ο **τελικός βαθμός του μαθήματος** υπολογίζεται κατά **80%** από τον βαθμό των γραπτών εξετάσεων του μαθήματος και κατά **20%** από τον βαθμό των γραπτών εξετάσεων του Εργαστηρίου.

ΟΔΗΓΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοποί του μαθήματος

Η κατανόηση των βασικών κυτταρικών λειτουργιών σε μοριακό επίπεδο με την μελέτη:

- της δομής και των ιδιοτήτων των πρωτεϊνών και ενζύμων
- των τρόπων παραγωγής και αποθήκευσης ενέργειας
- του ενδιάμεσου μεταβολισμού των κυρίων βιομοριών και των μηχανισμών ρύθμισής τους.

Η **αναλυτική ύλη** του μαθήματος Βιοχημεία Ι έχει διαμορφωθεί ως εξής:

A. Οι δεξιότητες που πρέπει να αποκτήσουν οι φοιτητές για να θεωρείται επιτυχημένη η παρακολούθησή τους.

B. Η ύλη που πρέπει να γνωρίζουν καλά οι φοιτητές για να επιτύχουν στο μάθημα καθώς και το υλικό που πρέπει να έχουν ακούσει οι φοιτητές για να είναι ολοκληρωμένη η διδασκαλία του μαθήματος.

A. Δεξιότητες που απαιτούνται στα Εργαστήρια της Βιοχημείας Ι

Γενικές δεξιότητες

Οι δεξιότητες αποκτώνται κατά την υποχρεωτική παρακολούθηση των εργαστηριακών ασκήσεων και φροντιστηρίων. Ο φοιτητής που θα ολοκληρώσει με επιτυχία τα παραπάνω θα πρέπει να έχει αποκτήσει

- την ικανότητα να παρατηρεί φαινόμενα στο εργαστήριο, να καταγράφει και να αναλύει δεδομένα
- την ικανότητα να βγάζει συμπεράσματα από δεδομένα
- την ικανότητα να λύνει προβλήματα
- την ικανότητα να κατασκευάζει γραφικές παραστάσεις από δεδομένα
- την ικανότητα να εξάγει πληροφορίες από γραφικές παραστάσεις
- την ικανότητα να χειρίζεται τον βασικό εξοπλισμό εργαστηρίου Κλινικής Χημείας και Βιοχημείας
- την ικανότητα να εργάζεται αποτελεσματικά σε μια ομάδα
- την ικανότητα να εργάζεται με ασφάλεια σε εργαστηριακό περιβάλλον
- την ικανότητα να ακολουθεί οδηγίες
- την ικανότητα να αντιλαμβάνεται τα εργαστηριακά λάθη και να αναγνωρίζει τις πηγές τους

Ειδικές δεξιότητες

Ο φοιτητής θα πρέπει να είναι σε θέση να

- προσδιορίζει την επίδραση της θερμοκρασίας, του pH και της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης.
- υπολογίζει πειραματικά τις ενζυμικές κινητικές παραμέτρους K_m και V_{max} .
- να χρησιμοποιεί την κινητική ανάλυση για να προσδιορίσει το είδος της ενζυμικής ρύθμισης.
- προσδιορίζει την συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης στο αίμα με την αντίδραση Drabkin
- αναλύει τις αιμοσφαιρίνες δείγματος αίματος με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή και να διαγνώσει την ύπαρξη μεταλλαγμένων αιμοσφαιρινών
- προσδιορίζει ποσοτικά σε ορό αίματος τα τριγλυκερίδια, την ολική χοληστερόλη, την χοληστερόλη HDL και LDL με ενζυμικές μεθόδους.

B. Αναλυτική ύλη

Ένζυμα: Καταλυτικοί μηχανισμοί

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά τα παρακάτω:

- Βασικές αρχές κατάλυσης
- Μηχανισμοί πρωτεασών με έμφαση τη δράση της χυμοθρυψίνης, καταλυτική τριάδα
- Φαρμακολογικές εφαρμογές αναστολέων πρωτεασών
- Μηχανισμοί ανθρακικών ανυδρασών, καταλύση με τη βοήθεια μετάλλου
- Μηχανισμοί περιοριστικών νουκλεασών και ο ρόλος του μαγνησίου
- Μηχανισμοί κινασών μονοφωσφορικών νουκλεοζιτών, ο ρόλος της θηλιάς P

Ο φοιτητής που θα παρακολουθήσει το μάθημα θα πρέπει να έχει ακούσει τα παρακάτω:

- Εξελικτικές σχέσεις των ενζυμικών μηχανισμών

Ένζυμα: Ρυθμιστικοί μηχανισμοί

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά τα παρακάτω:

- Αλλοστερικά ένζυμα: χαρακτηριστικά, ομότροπες και ετερότροπες επιδράσεις, συνεργατική σύνδεση υποστρώματος με το ένζυμο (μοντέλα), σιγμοειδή διαγράμματα
- Αλλοστερική ρύθμιση της ασπαραγινικής τρανσκαρβαμοϋλάσης
- Ισοένζυμα
- Ομοιοπολική τροποποίηση-φωσφορυλίωση
- Πρωτεολυτική ενεργοποίηση - πεπτικά ένζυμα και πήξη του αίματος

Πρωτεΐνες μεταφοράς οξυγόνου

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά

- την γενική δομή της αίμης
- τα χαρακτηριστικά και τα κύρια αμινοξέα του θύλακα της αίμης
- για την καμπύλη σύνδεσης O_2 της μυοσφαιρίνης
- για τη δομή και τις υπομοναδες της αιμοσφαιρίνης
- για τη καμπύλη σύνδεσης O_2 της αιμοσφαιρίνης
- για τη μοριακή βάση και σημασία του αλλοστερικού φαινομένου της αιμοσφαιρίνης
- για την επίδραση του 2,3-BPG και το φαινόμενο BOHR
- για τη μοριακή βάση και ανίχνευση της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας
- γενικά για τις θαλασσαιμίες.

Πρωτεΐνες του συνδετικού ιστού

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά

- τα συστατικά του συνδετικού ιστού
- τη δομή, χαρακτηριστική σύσταση, τροποποιήσεις, βιοσύνθεση και ρόλο του κολλαγόνου
- τη δομή, χαρακτηριστική σύσταση, τροποποιήσεις και ρόλο της ελαστίνης
- τη δομή, χαρακτηριστική σύσταση και ρόλο των πρωτεογλυκανών και των γλυκοζαμινογλυκανών
- τις γενετικές και παθολογικές ανωμαλίες του συνδετικού ιστού (σκορβούτο, λαθυρισμός, σύνδρομο Ehlers-Danlos, ατελή οστεογένεση)

Ο φοιτητής που θα παρακολουθήσει το μάθημα θα πρέπει να έχει ακούσει

- για τους διαφορετικούς τύπους κολλαγόνου
- για τον ρόλο των κολλαγόνων μη-ινώδους τύπου
- για τον ρόλο και τη σύσταση του βασικού υμένα (κολλαγόνο τύπου IV, λαμίνη)

Λιπίδια, βιολογικές μεμβράνες και μεμβρανικές πρωτεΐνες

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά

- τα δομικά χαρακτηριστικά και την ονοματολογία των λιπιδίων
- τα δομικά χαρακτηριστικά, τη χημική σύσταση και τις ιδιότητες των βιολογικών μεμβρανών
- τον ρόλο πρωτεϊνών και λιπιδίων στη δομή και λειτουργία των μεμβρανών.
- τους παράγοντες που επηρεάζουν τη ρευστότητα των μεμβρανών
- για την κίνηση λιπιδίων και πρωτεϊνών μέσα στις μεμβράνες
- παραδείγματα δομής μεμβρανικών πρωτεϊνών.
- για την παθητική και ενεργό μεταφορά διαμέσου των μεμβρανών.
- γενικά για αντλίες ιόντων, συζευγμένους μεταφορείς, μεμβρανικά κανάλια, χασματοσυνδέσεις
- για τη δράσης της ασπιρίνης, τη λειτουργία των καρδιοτονωτικών, την πολυφαρμακευτική αντίσταση και τη κυστική ίνωση

Ο φοιτητής που θα παρακολουθήσει το μάθημα θα πρέπει να έχει ακούσει

- ο παραδείγματα σύστασης μεμβρανών σε λιπίδια
- ο εξειδικευμένες κυτταρικές λειτουργίες των λιπιδίων
- ο για τις υδρόφοβες προσθετικές ομάδες πρωτεϊνών
- ο για τις μεθόδους FRAP και FLIP παρακολούθησης της κίνησης των πρωτεϊνών στη μεμβράνη.

Μεταγωγή κυτταρικών σημάτων

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά

- τις βασικές πορείες μεταγωγής σήματος – μοριακών κυκλωμάτων
- την δομή και λειτουργία υποδοχέων επτά διαμεμβρανικών ελίκων, πρωτεϊνών G και αδενυλικής κυκλάσης
- την δομή και λειτουργία φωσφολιπάσης C και κινάσης C
- για το ασβέστιο ως κυτοσολικό αγγελιοφόρο

Εισαγωγή στο Μεταβολισμό

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά

- τις βασικές έννοιες του μεταβολισμού, τη σχέση μεταξύ αναβολισμού και καταβολισμού, τα κοινά μοτίβα αντιδράσεων.
- για την ελεύθερη ενέργεια αντίδρασης και τη σημασία της για την έννοια της σύζευξης αντιδράσεων.
- για τον ρόλο του ATP και τους τρόπους παραγωγής του
- τον ρόλο των οξειδοαναγωγικών συνενζύμων (NAD, νιασίνη, FAD, NADP) και του ακέτυλο-συνένζυμου A.
- για το ρόλο της φωσφορικής κρεατίνης στους μυς
- για τους τρόπους ρύθμισης μεταβολικών πορειών και για το ενεργειακό φορτίο του κυττάρου.

Ο φοιτητής που θα παρακολουθήσει το μάθημα θα πρέπει να έχει ακούσει

- ο για τους διαφόρους τύπους βασικών αντιδράσεων του μεταβολισμού

Πέψη και αποικοδόμηση υδατανθρακών - Γλυκόλυση

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά

- τον βιολογικό ρόλο και τη χημική φύση της γλυκόζης και των άλλων βασικών υδατανθρακών της διατροφής
- τις αντιδράσεις της γλυκόλυσης και τα ένζυμα που τις καταλύουν

- την ενεργειακή απόδοση της γλυκόλυσης
- τις μεταβολικές τύχες πυροσταφυλικού και τη διατήρηση του ισοζυγίου οξειδοαναγωγής
- τη σημασία της γλυκόλυσης ως αναερόβιας οδού, τη σημασία των ισοενζύμων της γαλακτικής δεϋδρογονάσης και την διαχείριση του γαλακτικού από τον ανθρώπινο οργανισμό
- τον μεταβολισμό της φρουκτόζης και γαλακτόζης
- για τη γαλακτοζαιμία και τη δυσανεξία σε φρουκτόζη και λακτόζη
- τη ρύθμιση της γλυκόλυσης:
 - ρύθμιση της φωσφοφρουκτοκινάσης και ο ρόλος της 2,6, διφωσφορικής φρουκτόζης
 - σημασία των ισοενζύμων για την ιστική μεταβολική εξειδίκευση (εξοκινάση/γλυκοκινάση, φωσφοφρουκτοκινάση, κινάση του πυροσταφυλικού)
 - ρύθμιση κατά την μυϊκή ηρεμία και την έντονη μυϊκή άσκηση
- για τους μεταφορείς γλυκόζης GLUT
- για τη σημασία της γλυκόλυσης στον καρκίνο

Ο φοιτητής που θα παρακολουθήσει το μάθημα θα πρέπει να έχει ακούσει

- για την σημασία της υποξίας και του παραγοντα HIF-1 στην ανάπτυξη και καταπολέμηση των συμπαγών όγκων

Γλυκονεογένεση

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά

- τα πρόδρομα μόρια σύνθεσης της γλυκόζης
- τις αντιδράσεις της γλυκονεογένεσης και το ενεργειακό της κόστος
- τη ρύθμιση των μη αντιστρεπτών αντιδράσεων
- για την αντίστροφη ρύθμιση γλυκόλυσης-γλυκονεογένεσης
- τον κύκλο του Cori και τον κύκλο της αλανίνης.

Ο φοιτητής που θα παρακολουθήσει το μάθημα θα πρέπει να έχει ακούσει

- για τους κύκλους υποστρωμάτων και τη φυσιολογική τους σημασία.

Κύκλος του κιτρικού οξέος (Krebs)

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά

- για την μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-συνένζυμο Α στα μιτοχόνδρια και τη ρύθμιση της αντίδρασης
- τις αντιδράσεις του κύκλου του Krebs και τα ένζυμα που τις καταλύουν, τη ρύθμιση των κομβικών ενζύμων και την ενεργειακή απόδοση
- την ρύθμιση του κύκλου από το ενεργειακό φορτίο και τις ορμόνες
- τις αναπληρωτικές αντιδράσεις του κύκλου
- για τα ενδιάμεσα του κύκλου που είναι βιοσυνθετικά πρόδρομα
- τη βιοχημική βάση της νόσου Μπέρι-μπερι και της δηλητηρίαση από υδράργυρο ή αρσενικό

Ο φοιτητής που θα παρακολουθήσει το μάθημα θα πρέπει να έχει ακούσει

- για την σχέση μεταξύ της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης και της α-κετο-γλουταρικής αφυδρογονάσης.
- για την ακονιτάση ως πρωτεΐνη σιδήρου-θείου
- για τον κύκλο του γλυοξυλικού οξέος

Αναπνευστική αλυσίδα – οξειδωτική φωσφορυλίωση

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά

- τα σύμπλοκα, τους κινητούς μεταφορείς ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας και τις προσθετικές ομάδες μεταφοράς ηλεκτρονίων
- για τη δομή και εξέλιξη του κυτόχρωματος c
- για την δημιουργία ριζών οξυγόνου (ROS) και την καταπολέμηση τους
- τι είναι και πως δημιουργείται το χημειοσμωτικό φαινόμενο (υπόθεση Mitchel).
- τη γενική δομή και λειτουργία της F_0F_1 -ΑΤΡάσης
- για την πρωτονιοκίνητη δύναμη και τη σύζευξη της αναπνευστικής αλυσίδας με την οξειδωτική φωσφορυλίωση
- τη ρύθμιση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (αναπνευστικός έλεγχος).
- την αναστολή και αποσύζευξη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.
- τους τρόπους μεταφοράς των ηλεκτρονίων του κυτταροπλασματικού NADH στο μιτοχόνδριο (συστήματα φωσφορικής γλυκερόλης και μηλικού/ασπαρτικού)
- για τη μεταφορά του ATP μέσα και έξω από το μιτοχόνδριο.
- την ενεργειακή απόδοση της αναπνευστικής αλυσίδας και της πλήρους καύσης της γλυκόζης

Ο φοιτητής που θα παρακολουθήσει το μάθημα θα πρέπει να έχει ακούσει

- ο για τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του μιτοχονδρίου
- ο για τα δυναμικά οξειδοαναγωγής
- ο για τον μηχανισμό μοριακού κινητήρα της F_0F_1 -ΑΤΡάσης
- ο για τις μιτοχονδριακές νόσους και τον ρόλο των μιτοχονδρίων στην απόπτωση, τον καρκίνο και τη γήρανση

Οδός των φωσφορικών πεντοζών

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά

- τη σημασία της οδού των φωσφορικών πεντοζών στην παραγωγή NADPH και πεντοζών και τον συντονισμό της με την γλυκόλυση
- σε ποιους ιστούς είναι ενεργή, πότε και γιατί
- τις γενικές αντιδράσεις οξειδωτικού και μη οξειδωτικού κλάδου.
- τις επιπτώσεις και βιοχημική βάση της ανεπάρκειας G6PD (φαρμακοεπαγόμενη αιμολυτική αναιμία, φαβισμός)
- για την ανεπάρκεια θειαμίνης και το σύνδρομο Wernicke-Korsakoff

Ο φοιτητής που θα παρακολουθήσει το μάθημα θα πρέπει να έχει ακούσει

- ο τις ειδικές αντιδράσεις της οδού των φωσφορικών πεντοζών

Μεταβολισμός γλυκογόνου

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά

- τη δομή, φυσικές και χημικές ιδιότητες του γλυκογόνου.
- για το ρόλο του γλυκογόνου ως αποθήκη γλυκόζης
- για την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και τη ρύθμιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αλλοστερικά και ορμονικά
- τον ρόλο του κυκλικού AMP ως ενδοκυττάριου μηνύματος και τη σημασία του «καταρράκτη αντιδράσεων»
- για τη σύνθεση γλυκογόνου και τη ρύθμιση της συνθάσης του γλυκογόνου.
- για τη σημασία της γλυκογονόλυσης και γλυκογονογένεσης στο ήπαρ και τους μυς
- για τις νόσους αποθήκευσης γλυκογόνου (γενικά και ειδικά για τις νόσους Von Gierke και McArdle)

Ο φοιτητής που θα παρακολουθήσει το μάθημα θα πρέπει να έχει ακούσει

- ο για τη γλυκογενίνη
- ο για τη φωσφορυλάση α ως αισθητήριο σύστημα της γλυκόζης στο ήπαρ
- ο για τον ρόλο της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 (PP1) στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου

Πέψη και αποικοδόμηση λιπιδίων

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά

- τη δομή και ονοματολογία των λιπιδίων
- για τη πέψη των λιπιδίων της τροφής και τη κινητοποίηση τους από το λιπώδη ιστό
- για τη σύγκριση της απόδοσης αποθήκευσης ενέργειας σε μορφή τριακυλογλυκερολών ή γλυκογόνου
- για την αξιοποίηση της γλυκερόλης των λιπιδίων
- για την ενεργοποίηση των λιπαρών οξέων και την μεταφορά τους στο μιτοχόνδριο (ρόλος καρνιτίνης)
- για τη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων και την ενεργειακή της απόδοση
- τη σημασία και ρόλο της βιταμίνης B₁₂ (κοβαλαμίνης)
- γιατί από λιπαρά οξέα δεν μπορούμε να συνθέσουμε γλυκόζη (εκτός από εκείνα με περιττό αριθμό ατόμων άνθρακα)
- για τα κετονοσώματα: παραγωγή, ρόλος, μεταβολισμός και σημασία τους στη νηστεία και το διαβήτη
- για τη διαβητική κετοξέωση

Ο φοιτητής που θα παρακολουθήσει το μάθημα θα πρέπει να έχει ακούσει

- ο για την αποικοδόμηση μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων
- ο για τον ρόλο των υπεροξειδοσωματίων και το σύνδρομο Zellweger

Βιοσύνθεση λιπαρών οξέων

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά

- τις βασικές αντιδράσεις και ενεργειακό κόστος της βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων (διαφορές με την αποικοδόμηση)
- την προέλευση του ακετυλο-CoA και του NADPH για την σύνθεση
- για τη ρύθμιση και συντονισμό της αποικοδόμησης και σύνθεσης λιπαρών οξέων σαν απόκριση στη διατροφή μέσω της καρβοξυλάσης του ακετυλο-CoA
- για τα απαραίτητα λιπαρά οξέα, τη κυκλοοξυγενάση και τη βιοχημική βάση της δράσης των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων

Ο φοιτητής που θα παρακολουθήσει το μάθημα θα πρέπει να έχει ακούσει

- ο για την επιμήκυνση και δημιουργία διπλών δεσμών κατά τη σύνθεση λιπαρών οξέων
- ο για τη βιολογική δράση του αραχιδονικού και των παράγωγων του

Μεταβολισμός λιπιδίων και χοληστερόλης

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά

- γενικά για το μεταβολισμό των τριακυλογλυκερολών, φωσφολιπιδίων και σφιγγολιπιδίων και τον ρόλο του φωσφατιδικού και των ενεργοποιημένων αλκοολών
- για το βιολογικό ρόλο και δομή των σφιγγολιπιδίων, γαγγλιοζιτών, πλασμαλογόνων και αιθερικών φωσφολιπιδίων
- για τις σφιγγολιπιδώσεις, το σύνδρομο αναπνευστικής δυσφορίας και τη νόσο Tay-Sachs
- για τους βιολογικούς ρόλους της χοληστερόλης
- τις βασικές αρχές σύνθεσης της χοληστερόλης

- για την αναγωγή του HMG-CoA και την ρύθμιση της
- Ο φοιτητής που θα παρακολουθήσει το μάθημα θα πρέπει να έχει ακούσει για
- ο τη σύνθεση των πλασμαλογόνων και αιθερικών φωσφολιπιδίων

Βιοχημεία λιποπρωτεϊνών και στεροειδών ορμονών

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά

- για την κατάταξη, σύνθεση, λειτουργία και διαγνωστική σημασία των λιποπρωτεϊνών
- για δομή και λειτουργία του υποδοχέα της LDL και την σημασία του στην υπερχοληστερολαιμία και αθηροσκλήρωση.
- για τη δομή και λειτουργία των χολικών αλάτων.
- τη βιοχημική βάση της φαρμακευτικής αντιμετώπισης της υπερχοληστερολαιμίας
- γενικά για τις κατηγορίες, ονοματολογία και δράση των στεροειδών ορμονών.
- για την βιολογική δράση του κυτοχρώματος P450
- τις βασικές πορείες σύνθεσης των στεροειδών ορμονών
- για την παραγωγή και φυσιολογική λειτουργία της Βιταμίνης D

Ο φοιτητής που θα παρακολουθήσει το μάθημα θα πρέπει να έχει ακούσει

- ο για τον μηχανισμό του κυτοχρώματος P450
- ο για τις χημικές δομές των στεροειδών ορμονών

Αποικοδόμηση πρωτεϊνών και αμινοξέων – κύκλος ουρίας

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά

- τη διαδικασία της πέψης των πρωτεϊνών
- τη διαδικασία ενδοκυττάριας αποικοδόμησης των πρωτεϊνών
- τις γενικές αρχές και ιστοειδικότητα του καταβολισμού των αμινοξέων
- τις αντιδράσεις μεταφοράς και απελευθέρωσης αζώτου: τρανσαμίνωση, οξειδωτική και υδρολυτική απαμίνωση, υδρόλυση γλουταμίνης.
- τη σημασία και ρόλο της βιταμίνης B₆ και της φωσφορικής πυριδοξάλης
- την κλινική σημασία των τρανσαμινασών
- το ρόλο της αλανίνης και γλουταμίνης στη μεταφορά αμινομάδων στο ήπαρ
- τις γενικές αρχές της απέκκρισης του αζώτου
- τις αντιδράσεις του κύκλου της ουρίας
- τη μοριακή βάση, σημασία και αντιμετώπιση των υπεραμμονιαϊκών
- τις γενικές αρχές καταβολισμού του ανθρακικού σκελετού των αμινοξέων.
- για τις γενετικές ασθένειες του μεταβολισμού των αμινοξέων
- τη μοριακή βάση, διάγνωση και αντιμετώπιση της φαινυλκετονουρίας.

Ο φοιτητής που θα παρακολουθήσει το μάθημα θα πρέπει να έχει ακούσει

- ο για τον μηχανισμό της αντίδρασης τρανσαμίνωσης
- ο για τη δομή της αμινομεταφοράς του ασπαραγινικού
- ο για τα μονοπάτια καταβολισμού των ομάδων C3, C4 και C5 των αμινοξέων
- ο για τα μονοπάτια καταβολισμού της φαινυλαλανίνης και τυροσίνης

Βιοσύνθεση αμινοξέων και αίμης

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά

- τις κύριες οδούς ενσωμάτωσης του αζώτου σε βιομόρια
- τα απαραίτητα και μη απαραίτητα αμινοξέα
- τις αντιδράσεις σύνθεσης των μη-απαραίτητων αμινοξέων
- για τις αντιδράσεις μεταφοράς μονοανθρακικών ομάδων και τον ρόλο του τετραϋδροφολικού οξέος και της S-αδενοσυλμεθειονίνης

- για τον φυσιολογικό και παθολογικό ρόλο της ομοκυστεΐνης
- τις γενικές αρχές ελέγχου της βιοσύνθεσης των αμινοξέων
- για τα βιολογικώς σημαντικά παράγωγα των αμινοξέων
- τη δομή και λειτουργία της γλουταθειόνης
- τις γενικές αρχές βιοσύνθεσης και καταβολισμού της αίμης
- για τη βιολογική σημασία και απέκκριση της χολερυθρίνης
- τη μοριακή βάση και συμπτώματα των πορφυριών

Ο φοιτητής που θα παρακολουθήσει το μάθημα θα πρέπει να έχει ακούσει

- ο για την κατήλωση του αζώτου και το σύμπλοκο της αζωτογονάσης
- ο για την σύνθεση των απαραίτητων αμινοξέων
- ο για τη ρύθμιση της συνθετάσης της γλουταμίνης

Μεταβολισμός νουκλεοτιδίων

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά

- το δομή, ονοματολογία και βιολογικό ρόλο των νουκλεοτιδίων
- τις πρόδρομες ενώσεις και τις βασικές αρχές για την de novo σύνθεση των ριβονουκλεοτιδίων
- τις πορείες περίσωσης για τη βιοσύνθεση των ριβονουκλεοτιδίων
- τη βιοχημική βάση, συμπτώματα και φαρμακολογική αντιμετώπιση της νόσου Lesch-Nyhan
- την σύνθεση των δεοξυριβονουκλεοτιδίων από ριβονουκλεοτίδια
- για τα αντικαρκινικά φάρμακα που στοχεύουν την αναγωγή του τετραϋδροφολικού και τη συνθάση του θυμιδικού
- τη ρύθμιση της σύνθεσης των νουκλεοτιδίων
- τα προϊόντα καταβολισμού των νουκλεοτιδίων και τη βιοχημική βάση της ουρικής αρθρίτιδας.

Ο φοιτητής που θα παρακολουθήσει το μάθημα θα πρέπει να έχει ακούσει για

- ο τη δομή της συνθετάσης του φωσφορικού καρβαμυλίου
- ο τις αντιδράσεις της de novo σύνθεση των ριβονουκλεοτιδίων
- ο τον μηχανισμό της αναγωγής των ριβονουκλεοτιδίων

Σύνοψη και ολοκλήρωση του μεταβολισμού

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά

- τα επαναλαμβανόμενα μοτίβα στη μεταβολική ρύθμιση
- τις κύριες μεταβολικές πορείες, τις διασυνδέσεις και τις θέσεις ελέγχου τους
- για τα μόρια σημαντικούς κόμβους: 6-φωσφορική γλυκόζη, πυροσταφυλικό και ακετυλο-CoA
- τις κύριες μεταβολικές διεργασίες του εγκεφάλου, των μυών (σκελετικών και καρδιακών), του λιπώδους ιστού, των νεφρών και του ήπατος
- για τις κύριες ορμόνες του μεταβολισμού
- για τις μεταβολικές αλλαγές σε επίπεδο οργανισμού κατά τη μεταγευματική κατάσταση και τη κατάσταση νηστείας
- τις μεταβολικές διαταραχές στον σακχαρώδη διαβήτη
- για τις μεταβολικές αλλαγές κατά την άσκηση και την κατανάλωση αλκοόλ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A. ΘΕΩΡΙΑΣ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ

Προτεινόμενα συγγράμματα:

1. Berg J. M., Tymoczko J. L. & L. Stryer: ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ Τόμος I & II
Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
2. Γεωργιάτσου Ι. Γ.: Εισαγωγή στη Βιοχημεία (5^η Έκδοση)
Εκδόσεις Γιαχούδη

Άλλα συγγράμματα στα Ελληνικά:

- Baynes J. W. & M. H. Dominiczak: Ιατρική Βιοχημεία (2^η Έκδοση)
Επιστημονικές Εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε.
- Branden C. & J. Tooze: Εισαγωγή στη Δομή των Πρωτεϊνών
Ακαδημαϊκές Εκδόσεις
- Devlin T. M.: Βιοχημεία - Κλινικοί Συσχετισμοί Τόμος I & II
Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
- Koolman J. & K.-H. Roehm: Εγχειρίδιο Βιοχημείας
Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
- Loeffler G.: Βασικές Αρχές Βιοχημείας με στοιχεία παθοβιοχημείας
Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
- Nelson D. L. & M. M. Cox : Lehninger, Βασικές Αρχές Βιοχημείας, Τόμος 1, 2 & 3
Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
- Murray et al.: HARPER'S εικονογραφημένη Βιολογική Χημεία
Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
- Marshall W.J. & S.K. Bangert: Κλινική Χημεία
Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης

B. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Alexander R. R. & J. M. Griffiths: Basic Biochemical Methods
Wiley-Liss
- Anderson S. C. & S. Cockayne: Clinical Chemistry - Concepts and Applications
W. Saunders Co
- Clark J. M., Jr & R. L. Switzer: Πειραματική Βιοχημεία
Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
- Dryer R. L. & F. G. Lata: Experimental Biochemistry
Oxford University Press
- Holme D. J. & H. Peck: Analytical Biochemistry
Longman Scientific & Technical
- Plummer D. T.: Practical Biochemistry - An Introduction
McGraw-Hill
- Tietz N. W. (editor): Textbook of Clinical Chemistry
W. B. Saunders Co
- Wilson U. & K. H. Goulding: Principles and Techniques of Practical Biochemistry
Edward Arnold

ΥΛΙΚΟ ΦΡΟΝΤΙΣΤΗΡΙΩΝ

Κλινικά Περιστατικά

Γεώργιος Σίμος

1^ο ΦΡΟΝΤΙΣΤΗΡΙΟ

ENZYMA, ΦΑΡΜΑΚΑ & ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

“Chance favors only the prepared mind”, Louis Pasteur (1822-1895)

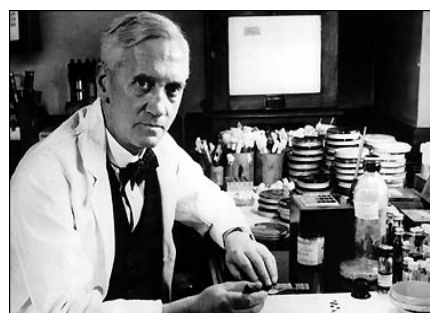
Η ΠΕΝΙΚΙΛΙΝΗ

Περιστατικό 1.

Ένα νεαρό κορίτσι ήρθε με τη μητέρα της στα εξωτερικά ιατρεία της παιδιατρικής κλινικής εξαιτίας μιας μολυσμένης πληγής στο γόνατο της. Της δόθηκε συνταγή για Πενικιλίνη G και της ζητήθηκε να επιστρέψει για επανεξέταση μετά από λίγες ημέρες. Στην επόμενη επίσκεψη δεν διαπιστώθηκε καλυτέρευση. Της δόθηκε συνταγή για Οξακιλίνη και της ζητήθηκε να επανέλθει. Στην τρίτη επίσκεψη διαπιστώθηκε ότι η μόλυνση είχε υποχωρήσει.

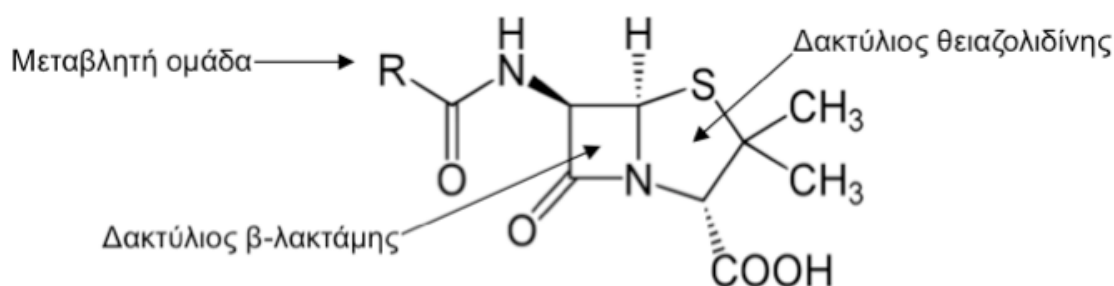
Ο ΦΛΕΜΙΝΓΚ

Ο Αλεξάντερ Φλέμινγκ (1881-1955) γεννήθηκε στη Σκωτία. Έλαβε μέρος στον Α΄ Παγκόσμιο Πόλεμο και υπηρέτησε ως επίατρος σε βρετανικό νοσοκομείο του Παρισιού. Συγκλονισμένος από τις εκατόμβες θυμάτων που προκαλούν οι λοιμώξεις στους πληγωμένους αποφάσισε να αφιερωθεί στη μικροβιολογία. Εντάχθηκε έτσι στο εργαστήριο του St Mary's Hospital όπου και εκπαιδεύτηκε από τον καθηγητή A. Wright (1861-1947). Το 1922 δημοσίευσε εργασία για την «λυσοζύμη», βιολογική ουσία που είχε ανακαλύψει και της οποίας απέδειξε την καταστροφική δύναμη στο τοίχωμα ορισμένων βακτηριδίων. Το 1928, παρατήρησε την καταστροφή μεγάλου μέρους μιας καλλιέργειας σταφυλόκοκκου που βρισκόταν σε τρυβλίο Πέτρι το οποίο είχε μολυνθεί από μούχλα. Ο Φλέμινγκ τότε, αντί να πετάξει τη χαλασμένη καλλιέργεια, καταπιάστηκε με την ταυτοποίηση της μούχλας. Η παρατήρησή του δημοσιεύτηκε το 1929. Μετά από 2 χρόνια ανακαλύφθηκε ότι επρόκειτο για τον μύκητα «*Penicillium notatum*» και ο Φλέμινγκ ονόμασε τη βακτηριοκτόνο ουσία «πενικιλίνη». Το 1933 πέτυχε επαρκώς δραστικό εκχύλισμα πενικιλίνης με το οποίο αντιμετώπισε επιτυχώς ένα περιστατικό επιτεφυκίτιδας. Αυτή είναι η πρώτη γνωστή θεραπεία με πενικιλίνη. Το 1940, δύο ανεξάρτητοι ερευνητές της Οξφόρδης, οι Howard Florey (1898-1968) και Ernst Chain (1906-1978), κατάφεραν μετά από εξαιρετικές έρευνες να λάβουν καθαρή πενικιλίνη και έφτιαξαν πυκνά διαλύματά της. Όμως λόγω των βομβαρδισμών του Λονδίνου αδυνατούσαν να παράγουν μεγάλες ποσότητες. Έτσι η έρευνα μεταφέρθηκε στις ΗΠΑ. Το 1942 άρχισε η βιομηχανική παραγωγή πενικιλίνης στις Η.Π.Α. Το 1945 απονεμήθηκε το βραβείο Νόμπελ από κοινού στους Φλέμινγκ, Φλόρεϋ και Τσέιν.

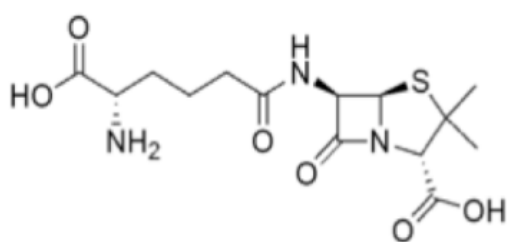


Η ΠΕΝΙΚΙΛΙΝΗ

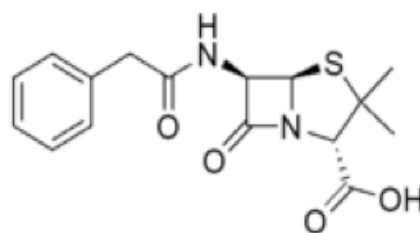
Η πενικιλίνη είναι αντιβιοτικό που λαμβάνεται από καλλιέργειες μερικών ειδών μυκήτων (πενικίλιον κλπ). Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των καλλιεργειών των μυκήτων ήταν γνωστές από τα παλιότερα χρόνια. Το 1943 η πενικιλίνη παρασκευάστηκε βιομηχανικά, έχει τη μορφή λευκής σκόνης ή κίτρινης άμορφης μάζας και είναι ευδιάλυτη στο νερό. Η πενικιλίνη είναι ένα από τα ισχυρότερα σύγχρονα θεραπευτικά μέσα. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της πνευμονίας, σηπτικών ή πυωδών ασθενειών, διαφόρων μορφών κυνάγχης, διφθερίτιδας, ερυσίπελα, οστρακιάς, βλεννόρροιας, σύφιλης κ.α. Ανθεκτικά στην πενικιλίνη είναι τα βακτήρια του τύφου, της δυσεντερίας, της φυματίωσης και άλλοι ακόμη μικροοργανισμοί.



Η γενική δομή της πενικιλίνης



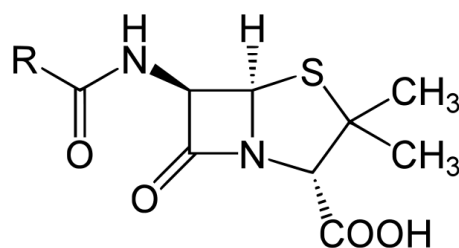
Πενικιλίνη Ν



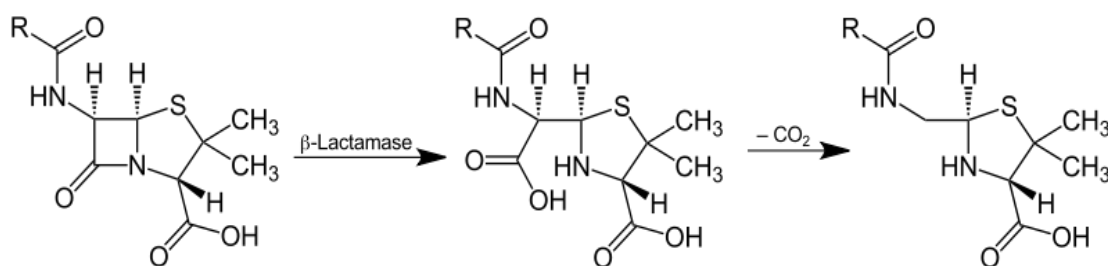
Πενικιλίνη Γ

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Η πενικιλίνη είναι παράγωγο ενός τριπεπτιδίου το οποίο περιέχει κατάλοιπα κυστεΐνης και βαλίνης. Σημειώστε πάνω στο μόριο της πενικιλίνης τους δυο πεπτιδικούς δεσμούς και τις ομάδες που προέρχονται από τα παραπάνω δύο αμινοξέα.

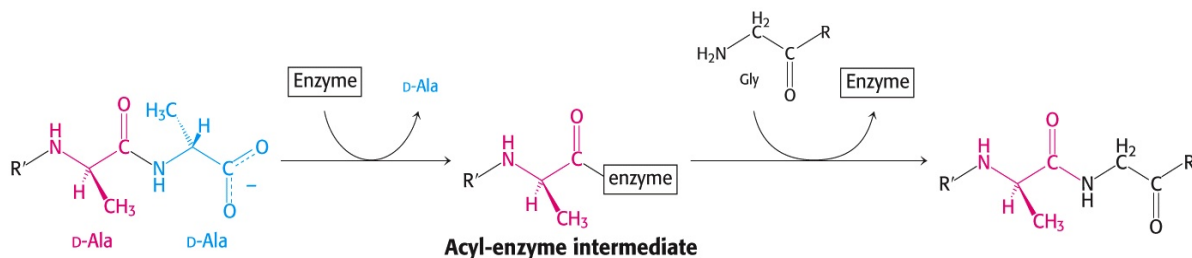


2. Τα ανθεκτικά στη πενικιλίνη βακτήρια εκφράζουν ένα ενζυμο, την πενικιλινάση ή β-λακταμάση που απενεργοποιεί την πενικιλίνη σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.



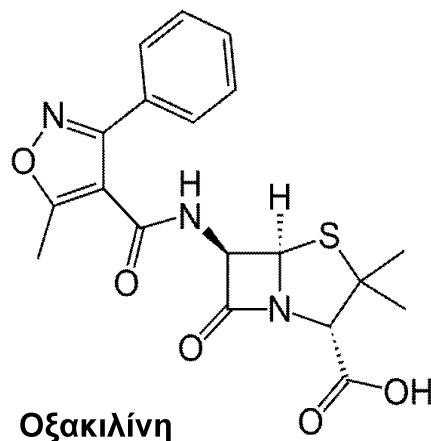
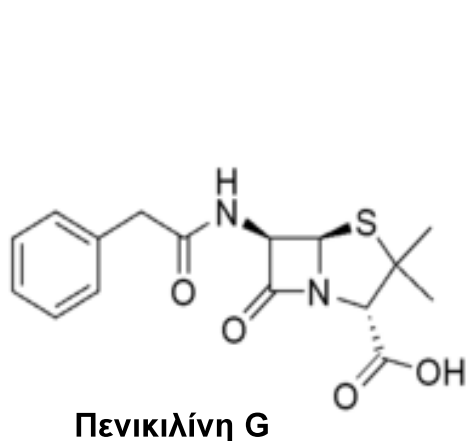
Τι ακριβώς αντίδραση καταλύει η β-λακταμάση; Ποιο τμήμα του μορίου της πενικιλίνης είναι απαραίτητο για την αντιβιοτική της δράση;

3. Η πενικιλίνη δρα αναστέλλοντας την δράση του βακτηριακού ενζύμου τρανσπεπτιδάση γλυκοπεπτιδίων που συμμετέχει στην δημιουργία του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Συγκεκριμένα, η τρανσπεπτιδάση στο πρώτο βήμα, υδρολύει τον πεπτιδικό δεσμό ανάμεσα σε δυο ακραία κατάλοιπα Αλανίνης ενός πεπτιδίου και δημιουργείται ένα ομοιοπολικό ενδιάμεσο ακυλοενζύμου. Στο δεύτερο βήμα, η ακυλομάδα μεταφέρεται στην αμινομάδα της ακραίας Γλυκίνης ενός άλλου πεπτιδίου δημιουργώντας έτσι διασύνδεση μεταξύ δυο αλυσίδων πεπτιδογλυκάνης.



Αν υποθέσουμε ότι ο καταλυτικός μηχανισμός του πρώτου βήματος είναι παρόμοιος με αυτό της δράσης της χυμοθρυψίνης, ποιος είναι ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο αναστέλλει η πενικιλίνη την τρανσπεπτιδάση των βακτηρίων; Ποιο αμινοξικό κατάλοιπο του ενεργού κέντρου της τρανσπεπτιδάσης είναι σημαντικό σε αυτό τον μηχανισμό;

4. Ορισμένα ημισυνθετικά παράγωγα της πενικιλίνης δεν καταστρέφονται από την β-λακταμάση και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση μολύνσεων από ανθεκτικά στην πενικιλίνη βακτήρια. Ένα τέτοιο αντιβιοτικό είναι η οξακιλίνη. Για ποιο λόγο πιστεύετε ότι η β-λακταμάση δεν μπορεί να υδρολύσει την οξακιλίνη;



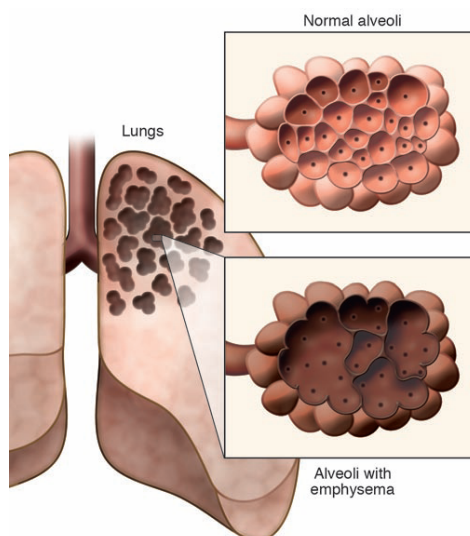
Η ANTIΘΡΥΨΙΝΗ α1

Περιστατικό 2.

Ο αδελφός ενός άνδρα που είχε πεθάνει από αποφρακτική πνευμονοπάθεια ζήτησε να εξετασθεί για να δει αν κινδυνεύει από την ίδια ασθένεια. Η συγκέντρωση της αντιθρυψίνης α1 στον όρο του βρέθηκε πολύ χαμηλή: 0,5 gr/lit (φυσιολογικό εύρος 1,5-3,5 gr/lit). Ο γιατρός του συνέστησε τακτικές εξετάσεις των πνευμόνων και του ήπατος, να μην καπνίζει και να αποφεύγει χώρους με καπνό (όπως για παράδειγμα οι καφετέριες στη Λάρισα!).

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Τι είναι ακριβώς η αντιθρυψίνη α1 και ποια η λειτουργία της;
2. Από ποια ασθένεια κινδυνεύουν άτομα με χαμηλή αντιθρυψίνη α1 και ποια τα χαρακτηριστικά της;
3. Γιατί απαγορεύεται η έκθεση ατόμων με χαμηλή αντιθρυψίνη α1 στον καπνό;
4. Κινδυνεύουν άτομα με φυσιολογικά επίπεδα αντιθρυψίνης α1 από την ίδια ασθένεια και κάτω από ποιες προϋποθέσεις;
5. Γιατί άτομα με χαμηλή αντιθρυψίνη α1 κινδυνεύουν από ηπατική νόσο;



ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ, ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ & ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

ΤΟ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ

Περιστατικό 3.

Ένα δεκάχρονο κορίτσι συνοδευόμενο από τη μητέρα του ήρθε στα επείγοντα με τραύμα στον αριστερό της πήχη. Είπε ότι χτύπησε το χέρι της στα κάγκελα καθώς κατέβαινε τις σκάλες και ανέφερε ότι παρόλο που το χτύπημα δεν ήταν πολύ δυνατό την ξάφνιασε η ένταση του πόνου. Σύμφωνα με την ασθενή και τη μητέρα της, το κορίτσι είχε υποστεί διάφορα κατάγματα στο παρελθόν που είχαν αποκατασταθεί χωρίς επιπλοκές.

Παρά τις επίμονες ερωτήσεις, τόσο το κορίτσι όσο και η μητέρα του αρνήθηκαν οποιαδήποτε περίπτωση κακοποίησης. Η ακτινογραφία έδειξε εγκάρσιο κάταγμα της ωλένης. Της τοποθετήθηκε νάρθηκας αλλά ο γιατρός ζήτησε και λήψη βιοψίας δέρματος για αλληλούχιση του DNA. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν μια μετάλλαξη στο γονίδιο COL1A1 του κολλαγόνου α1(I) που προκαλεί αντικατάσταση της γλυκίνης 94 από κυστεΐνη.



ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Από ποια ασθένεια πάσχει το κορίτσι;
2. Γιατί η μετάλλαξη επηρεάζει την αντοχή των οστών;
3. Το κορίτσι πάσχει από ήπια ή σοβαρή μορφή της ασθένειας;
4. Τι προβλέπετε για την σοβαρότητα της ασθένειας αν η μετάλλαξη είχε μετατρέψει την γλυκίνη α. σε αλανίνη ή β. σε τυροσίνη;
5. Μεταλλάξεις σε ποιες άλλες πρωτεΐνες είναι δυνατόν να προκαλέσουν ασθένειες του συνδετικού ιστού;

Η ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ

Περιστατικό 4.

Ένα δεκατετράχρονο αγόρι, που ήταν γνωστό ότι είχε δρεπανοκυτταρική νόσο, μεταφέρθηκε στο νοσοκομείο εξαιτίας πολύ έντονου πόνου στο γοφό και το κάτω μέρος της πλάτης. Δυο ημέρες πριν την εισαγωγή είχε πάει εκδρομή με τους προσκόπους αλλά τα συμπτώματα εμφανίστηκαν μια ημέρα μετά. Κατά την εξέταση διαπιστώθηκε μεγάλο μέγεθος του ήπατος και της σπλήνας (ηπατοσπληνομεγαλία). Ο αιματοκρίτης (ποσοστό του όγκου των ερυθροκυττάρων στον όγκο του αίματος) του ήταν 24% (φυσιολογικός >40%) ενώ συνήθως είχε 25-30%. Οι βιοχημικές εξετάσεις έδειξαν αυξημένη συγκέντρωση της χολερυθρίνης (προϊόν αποικοδόμησης της αίμης) του ορού. Στην ακτινογραφία παρατηρήθηκαν στοιχεία ισχαιμικής νέκρωσης της μηριαίας κεφαλής. Του χορηγήθηκε οξυγόνο με μάσκα και ενδοφλέβια αναλγητικά και η κατάσταση του άρχισε να καλυτερεύει.



ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Τι προκαλεί την δρεπανοκυτταρική νόσο; Τι προκάλεσε τη κρίση;
2. Γιατί η ηπατοσπληνομεγαλία είναι κοινή στους πάσχοντες από δρεπανοκυτταρική αναιμία;
3. Ποια είναι η αιτία της αναιμίας (χαμηλού αιματοκρίτη) και της αυξημένης χολερυθρίνης;
4. Είναι δυνατόν η ισχαιμική νέκρωση της μηριαίας κεφαλής να σχετίζεται με την δρεπανοκυτταρική νόσο;
5. Πως βοήθησε η παροχή οξυγόνου;

2° ΦΡΟΝΤΙΣΤΗΡΙΟ

Περιστατικό 1.

Ένας 56-χρονος άστεγος άνδρας με ιστορικό αλκοολισμού μεταφέρθηκε στο νοσοκομείο σε κωματώδη κατάσταση. Οι αναλύσεις αίματος που έγιναν άμεσα έδειξαν:

Αλκοόλ: 270 mg/dl

Γλυκόζη ορού: 62 mg/dl (φυσιολογικό = 100 mg/dl)

Γαλακτικό ορού: 27 mg/dl (φυσιολογικά όρια = 4,5 – 19,8 mg/dl)

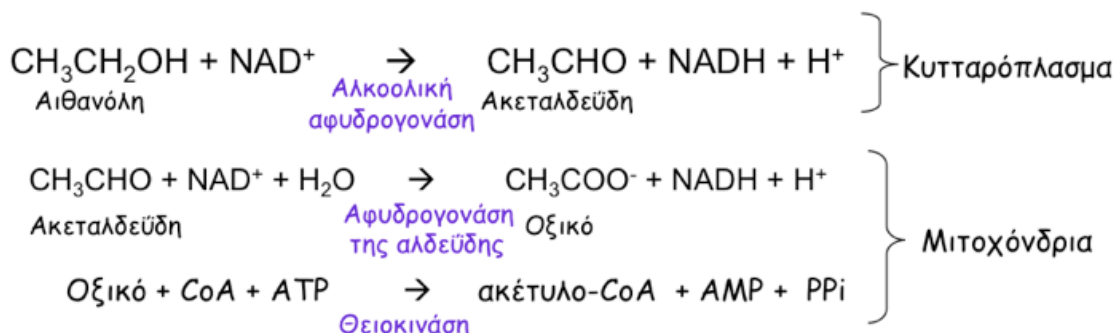
Του χορηγήθηκε ενδοφλέβιος ορός με γλυκόζη και θειαμίνη.

ΑΛΚΟΟΛΙΣΜΟΣ

Ο αλκοολισμός είναι μια χρόνια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από κατανάλωση υπερβολικών ποσοτήτων αλκοόλ και επαναλαμβανόμενες αλλά αποτυχημένες προσπάθειες να σταματήσει κανείς το ποτό παρά τις καταστροφικές κοινωνικές και επαγγελματικές επιπτώσεις. Ο αλκοολισμός αποτελεί ψυχολογική και φυσική εξάρτηση. Πολλοί αλκοολικοί καταστρέφουν την οικογένειά τους, χάνουν την δουλειά τους και συχνά καταλήγουν άστεγοι όπως ο ασθενής του παραδείγματος. Υπολογίζεται ότι 14 εκατομμύρια άνθρωποι στις ΗΠΑ είναι αλκοολικοί. Ο αλκοολισμός επηρεάζει το προσδόκιμο της ζωής και το μειώνει κατά περίπου 15 χρόνια. Ο θάνατος προκαλείται συνήθως από τροχαία ή άλλα ατυχήματα, πράξεις βίας (αυτοκτονίες ή δολοφονίες) και πολλά ιατρικά προβλήματα. Τα οξεία προβλήματα περιλαμβάνουν οξέωση, υπογλυκαιμία, ηπατική ανεπάρκεια και σύνδρομο στέρησης (delirium tremens: τρομώδες παραλήρημα). Τα χρόνια προβλήματα περιλαμβάνουν δυσλειτουργία του κεντρικού νευρικού, καρδιαγγειακού και γαστρεντερικού συστήματος και του ήπατος (κύρωση). Επίσης είναι συχνή η περιφερική νευροπάθεια, πιθανόν λόγω ανεπάρκειας της θειαμίνης.



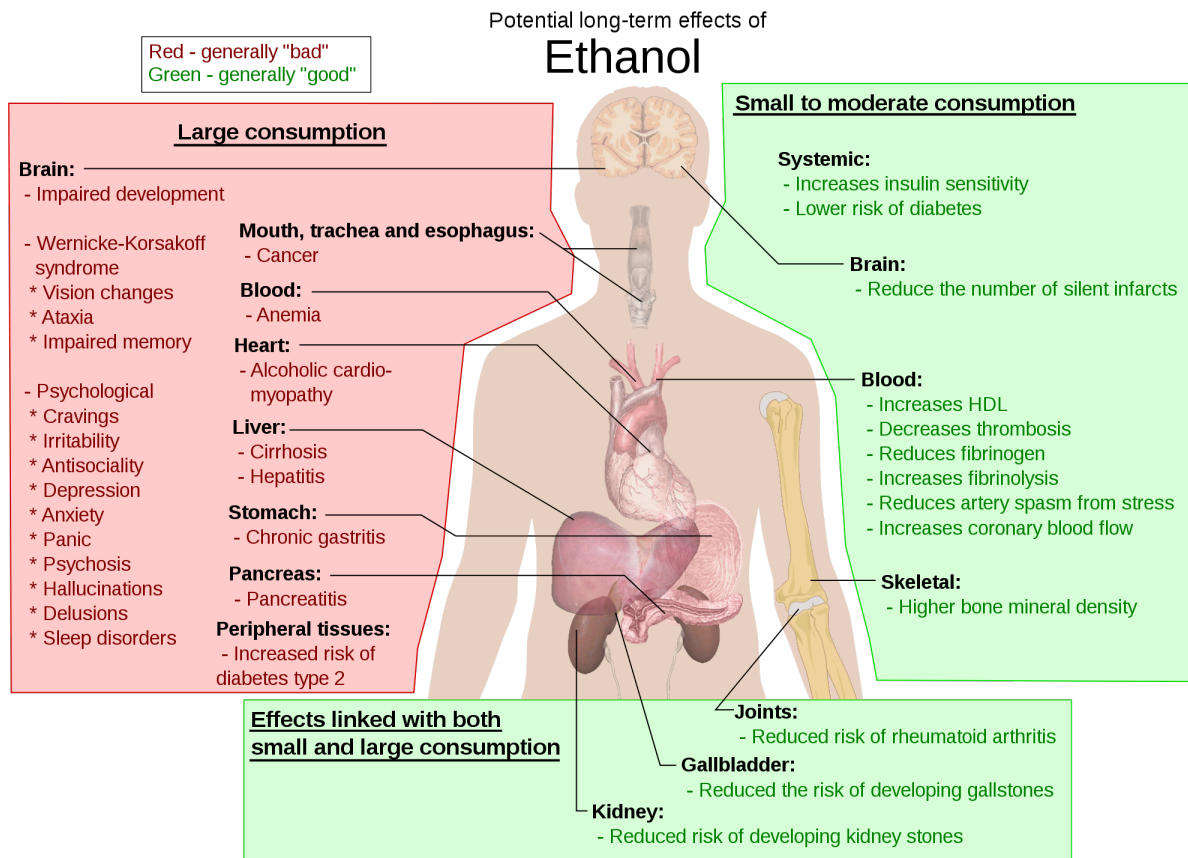
Μεταβολισμός του αλκοόλ (αιθανόλης) στο ήπαρ



ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Ποιο θα είναι το μεταβολικό αποτέλεσμα της υπερβολικής κατανάλωσης αιθανόλης; Τι παράγεται;
2. Ποιες μεταβολικές οδοί και ποιες συγκεκριμένες αντιδράσεις θα επηρεασθούν από τα παραπάνω παραγόμενα προϊόντα;
3. Πως εξηγείται η υπογλυκαιμία του ασθενή; Είναι επικίνδυνη;
4. Τι προκαλεί η υψηλή συγκέντρωση γαλακτικού στον ορό και που οφείλεται;

5. Γιατί χορηγήθηκε στον ασθενή θειαμίνη; Τι είναι η θειαμίνη; Ποια ενζύμα και ποιες μεταβολικοί οδοί απαιτούν την παρουσία της;



Περιστατικό 2.

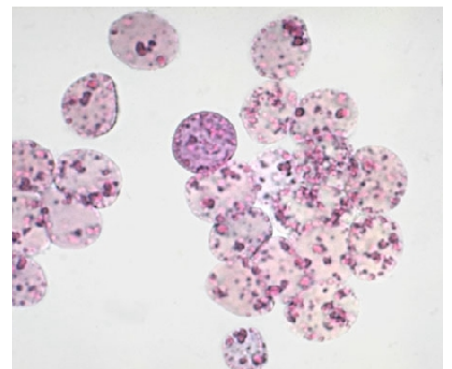
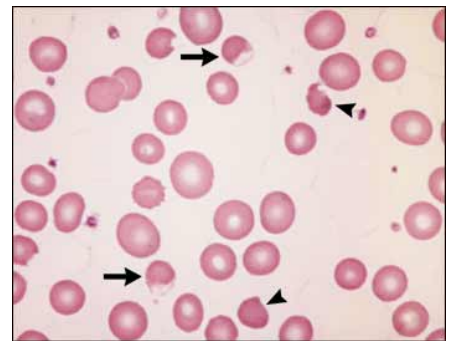
Ένας 22-χρονος άνδρας μεταφέρθηκε στο νοσοκομείο λόγω πόνων, έντονης ανησυχίας και τάσης για λιποθυμία. Λίγες ημέρες πριν είχε υποστεί τροφική δηλητηρίαση (μόλυνση από *Salmonella enteritis*) και λάμβανε συντηρητική θεραπεία. Είχε υπόταση (92/58 mmHg) και ταχυπαλμία (118 παλμοί/λεπτό). Οι αναλύσεις αίματος που έγιναν άμεσα έδειξαν:

Αιμοσφαιρίνη: 8,9 g/100 ml

(φυσιολογική για άνδρες: 14-18 g/100 ml)

Αιματοκρίτης: 29% (φυσιολογικός >40%)

Μικροσκοπική παρατήρηση του αίματος απέκάλυψε την παρουσία ανωμάτων μορφών ερυθροκυττάρων και χρώση με κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet) απέκάλυψε στο εσωτερικό τους την παρουσία σωματιδίων Heinz.



ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

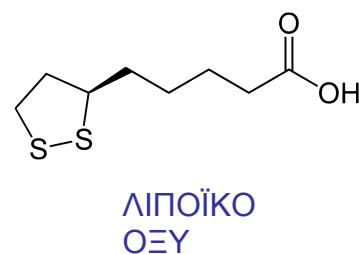
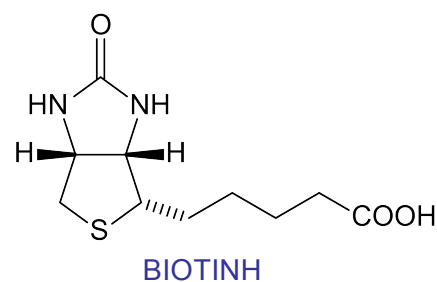
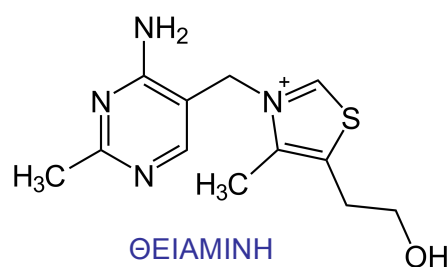
1. Τι είναι τα σωματίδια Heinz;
2. Ποια μπορεί να είναι η αιτία της αναιμίας;
3. Ανεπάρκεια ποιου ενζύμου είναι δυνατόν να εξηγή τα συμπτώματα;
4. Γιατί η συγκεκριμένη ανεπάρκεια επηρεάζει κυρίως τα ερυθροκύτταρα;
5. Με ποιο τρόπο τα ερυθροκύτταρα αντιστέκονται στις οξειδωτικές βλάβες;

Περιστατικό 3.

Ένα βρέφος 8 μηνών, που είχε γεννηθεί κανονικά, εμφάνισε καθυστερημένη ανάπτυξη, ελλιπές βάρος, υποτονία, μειωμένη μυϊκή μάζα και συχνούς εμετούς. Οι εξετάσεις έδειξαν επίμονη οξέωση (pH= 7-7,2) και πολύ αυξημένες συγκεντρώσεις γαλακτικού (9 mmol/L, φυσιολογικά όρια: 0,5-1,8 mmol/L), πυροσταφυλικού (2,4 mmol/L, φυσιολογικά όρια: 0,03-0,11 mmol/L) και αλανίνης (1,36 mmol/L, φυσιολογικά όρια: 0,3-0,6 mmol/L) στον ορό. Εφόσον αυτές οι τιμές υποδείκνυαν γενετική βλάβη στον μεταβολισμό του πυροσταφυλικού, επιχειρήθηκαν θεραπείες με θειαμίνη ή βιοτίνη αλλά η γαλακτική οξέωση επέμεινε. Στη συνέχεια δοκιμάστηκε χορήγηση από το στόμα λιποϊκού οξέος (25-50 mg / kg σωματικού βάρους) η οποία βελτίωσε σημαντικά την γαλακτική και πυροσταφυλική οξυαιμία και την συνολική εικόνα της υγείας του βρέφους.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Ποια διαδικασία παράγει πυροσταφυλικό στα ανθρώπινα κύτταρα;
2. Σε ποιες ουσίες είναι δυνατόν να μετατραπεί το πυροσταφυλικό και με την δράση ποιων ενζύμων;
3. Γιατί δοκιμάσθηκαν θεραπείες με θειαμίνη και βιοτίνη; Τι είναι αυτές οι ουσίες και ποιος ο βιολογικός τους ρόλος;
4. Σε ανεπάρκεια ποιου ενζύμου οφείλονται τα συμπτώματα; Ποιες μεταβολικοί οδοί επηρεάζονται;
5. Πως το λιποϊκό οξύ μπορεί να βοηθήσει τη δράση του παραπάνω ενζύμου;



Περιστατικό 4.

Ένα 15-χρονο αγόρι μεταφέρθηκε στο νοσοκομείο με ναυτία, εμετό, λήθαργο και παραγωγή ούρων με σκούρο χρώμα. Αναφέρθηκε προϊστορία εύκολης κούρασης και συχνών μυϊκών σπασμών που έκαναν το αγόρι να υπολείπεται των συνομηλίκων του και να αποφεύγει τις αθλητικές δραστηριότητες. Δυο ημέρες πριν την εισαγωγή και ενώ το αγόρι έπαιζε με τους φίλους του άρχισε να νιώθει μυϊκές ακαμψίες και κράμπες. Παρόλα αυτά, συνέχισε να παίζει γιατί ένιωσε να «αναζωογονείται» και να φεύγουν τα μυϊκά συμπτώματα. Όταν όμως γύρισε σπίτι, ένιωσε πολύ μεγάλη κούραση και την επόμενη ημέρα εμφάνισε μυαλγίες και ναυτία. Το πρωί της ημέρας της εισαγωγής δεν μπορούσε να ξυπνήσει, έκανε εμετό και η μητέρα του πρόσεξε ότι τα ούρα του είχαν σκούρο χρώμα.

Οι εξετάσεις στο ορό έδειξαν υψηλό κάλιο (5,5 mEq/L, φυσιολογικές τιμές 3,5 – 5,3 mEq/L), πολύ υψηλή κινάση κρεατίνης (2.114 IU/L, ανώτατα φυσιολογικά όρια: 195 IU/L). Επίσης ανιχνεύθηκε αυξημένη μυοσφαιρίνη στον ορό και τα ούρα.

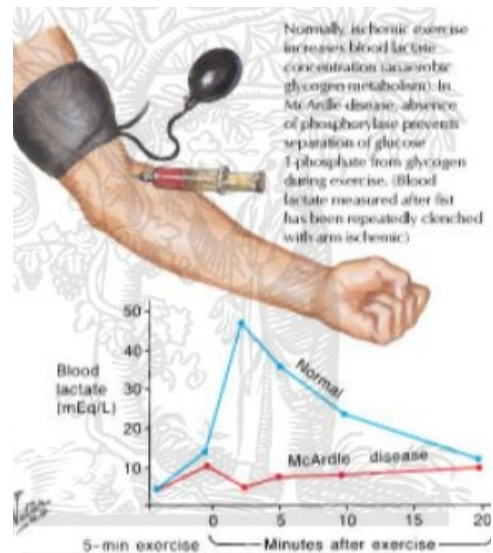
Διαγνώσθηκε ραβδομύολυση (μια επείγουσα και επικίνδυνη για τη ζωή κατάσταση που οφείλεται σε καταστροφή των κυττάρων των σκελετικών μυών) και δόθηκε η κατάλληλη αγωγή.

Για να βρεθεί η αιτία της υποτιθέμενης σκελετικής μυοπάθειας έγινε τεστ ισχαιμικής άσκησης που έδειξε απουσία αύξησης γαλακτικού και πυροσταφυλικού στον ορό. Έγινε βιοψία και ανοσοϊστοχημική ανάλυση σκελετικού μυός που έδειξε αύξηση του ενδοκυττάριου γλυκογόνου και απουσία της φωσφορυλάσης. Έγινε τελική διάγνωση για ασθένεια McArdle.

Συστήθηκε δίαιτα πλούσια σε πρωτεΐνες, αποφυγή έντονης άσκησης και ήπια άσκηση με πολύ χρόνο προθέρμανσης.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Γιατί διαγνώστηκε ραβδομύολυση και γιατί αυτή είναι επικίνδυνη για την ζωή;
2. Πως εξηγούνται τα αποτελέσματα του τεστ ισχαιμικής άσκησης; Ποια πρέπει να είναι τα αποτελέσματα σε ένα υγιές άτομο και γιατί;
3. Ποια είναι η δράση της φωσφορυλάσης;
4. Σε ποια οικογένεια ασθενειών ανήκει η νόσος McArdle;
5. Που μπορεί να οφείλεται η «αναζωογόνηση» που ένιωσε το αγόρι όταν έπαιζε; Γιατί επιτρέπεται ήπια άσκηση με προθέρμανση; Πως μπορεί να βοηθήσει η πλούσια σε πρωτεΐνες δίαιτα;



3^ο ΦΡΟΝΤΙΣΤΗΡΙΟ

Περιστατικό 1.

Μια 17-χρονη κοπέλα εισήχθηκε στο νοσοκομείο με βραδυκαρδία, ανωμαλίες στους ηλεκτρολύτες του ορού, θολή όραση και οίδημα στα κάτω άκρα. Είχε ύψος 152 cm και βάρος 43 kg, ήταν καχεκτική και είχε εμφανή απώλεια μυϊκής μάζας. Οι βιοχημικές αναλύσεις έδειξαν:

Κάλιο ορού: 2,8 mmol/l (φυσιολογικά 3,5 – 5,3 mmol/l)

Συνολικές πρωτεΐνες ορού: 5,5 g/dl (φυσιολογικά 6 – 8 g/dl)

Αλβουμίνη ορού: 2,5 g/dl (φυσιολογικά 3 – 5 g/dl)

Γλυκόζη ορού: 55 mg/dl

Αμινοτρανσφεράση αλανίνης (ALT): 1060 IU/l

(ανώτατο φυσιολογικό όριο 31 IU/l)

Αμινοτρανσφεράση ασπαραγινικού (AST): 1350 IU/l

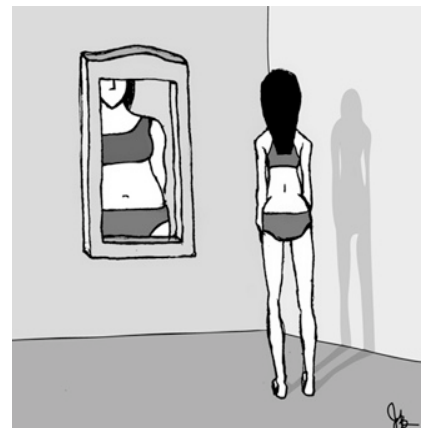
(ανώτατο φυσιολογικό όριο 31 IU/l)

Νευρική ανορεξία: Η κατάρα των «supermodels»;

Η νευρική (νευρογενής ή ψυχογενής) ανορεξία (anorexia nervosa) είναι μια διατροφική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από την άρνηση να διατηρήσει κανείς ένα υγιές σωματικό βάρος και ένα επίμονο φόβο ότι θα παχύνει. Συχνά ο/η ασθενής έχει μια διαστρεβλωμένη εικόνα του εαυτού του/της και διακατέχεται από προκαταλήψεις σχετικά με το σώμα, το φαγητό και τη διατροφή. Τα άτομα με νευρογενή ανορεξία εξακολουθούν να αισθάνονται πείνα, αλλά αρνούνται να καταναλώσουν παρά μόνο πολύ μικρές ποσότητες τροφίμων. Η μέση θερμιδική πρόσληψη ενός ατόμου με νευρική ανορεξία είναι 600-800 θερμίδες ανά ημέρα, αλλά υπάρχουν και ακραίες περιπτώσεις πλήρους ασιτίας. Πρόκειται για μια σοβαρή ψυχική ασθένεια με το υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας από οποιαδήποτε ψυχιατρική διαταραχή. Η νευρική ανορεξία τις περισσότερες φορές εμφανίζεται στην εφηβεία και είναι πιο διαδεδομένη μεταξύ των γυναικών.

Ερωτήσεις:

1. Τι αντιδράσεις καταλύουν οι ALT και AST και τι σηματοδοτεί η αυξημένη παρουσία τους στον ορό;
2. Γιατί παρατηρείται απώλεια μυϊκής μάζας κατά την ασιτία;
3. Τι εμποδίζει την υπερβολική απώλεια μυϊκής μάζας κατά την ασιτία σε ένα άτομο με φυσιολογικό βάρος;
4. Πως εξηγούνται τα υπόλοιπα αποτελέσματα των αναλύσεων στην παραπάνω ασθενή;



Παχυσαρκία: η μάστιγα του σύγχρονου πολιτισμού;

Η παχυσαρκία είναι μία παθολογική κατάσταση, κατά την οποία η συσσώρευση λίπους στο σώμα έχει αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία, οδηγώντας σε αύξηση των προβλημάτων υγείας και μειωμένη προσδοκώμενη διάρκεια ζωής. Ο δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ, ο λόγος του βάρους προς το τετράγωνο του ύψους, BMI: body mass index = kg/m^2) ορίζει ως υπέρβαρο ένα άτομο αν ο ΔΜΣ του είναι μεταξύ 25 και 30, και παχύσαρκο όταν είναι μεγαλύτερος από 30. Η παχυσαρκία σχετίζεται με διάφορες παθήσεις όπως **αντίσταση στην ινσουλίνη, διαβήτη τύπου 2, καρδιαγγειακές παθήσεις, αναπνευστικά προβλήματα κατά τον ύπνο ή την ήπια άσκηση, ορισμένες μορφές καρκίνου, προβλήματα γονιμότητας, οστεοαρθρίτιδα, χολολιθίαση και στεατοηπατίτιδα**. Η παχυσαρκία συνήθως προκαλείται από ένα συνδυασμό υπερβολικής πρόσληψης τροφής, έλλειψης σωματικής δραστηριότητας και γενετικής προδιάθεσης, αν και μερικές φορές προκαλείται από ενδοκρινικές διαταραχές, φαρμακευτική αγωγή ή ψυχιατρική νόσο. Η παχυσαρκία θεωρείται ως ένα από τα πιο σοβαρά για τη δημόσια υγεία προβλήματα του 21ου αιώνα και ως **η κύρια αποτρέψιμη αιτία θανάτου** σε παγκόσμιο επίπεδο. Η παχυσαρκία στιγματίζεται σε μεγάλο μέρος του Δυτικού κόσμου, αν και θεωρήθηκε ευρέως ως σύμβολο πλούτου και γονιμότητας σε άλλες στιγμές της ιστορίας, ή σε άλλα μέρη του κόσμου.



Περιστατικό 2.

Μια 43-χρονη παχύσαρκτη γυναίκα (ύψος 1,57 m, βάρος 113 kg) επισκέφθηκε τον παθολόγο της με τα αποτελέσματα των τελευταίων εξετάσεων της. Η γυναίκα υποφέρει από εκφυλιστική οστεοαρθρίτιδα στα γόνατα, δύσπνοια κατά την ήπια άσκηση και υπερβολική κόπωση. Δεν έκανε υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ και έπαιρνε μόνο ΜΣΑΦ για τους πόνους στις αρθρώσεις. Οι εξετάσεις της έδειξαν:

Γλυκόζη (σάκχαρο) ορού: 96 mg/dl

Τριγλυκερίδια: 452 mg/dl

Χοληστερόλη (TC): 238 mg/dl

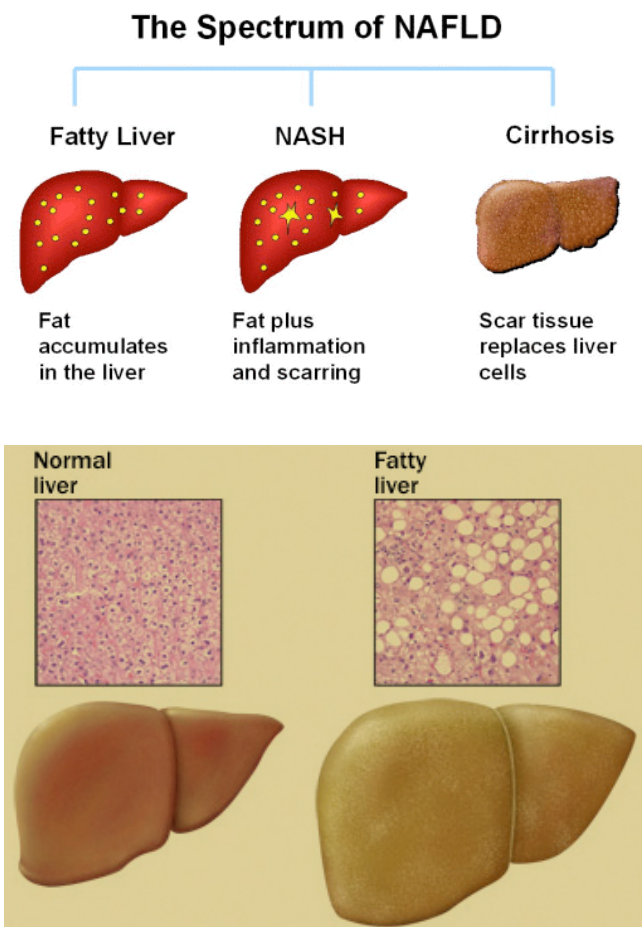
HDL: 49 mg/dl

LDL: 158 mg/dl

Αμινοτρανσφεράση αλανίνης (ALT): 112 IU/l

Αμινοτρανσφεράση ασπαραγινικού (AST): 88 IU/l

Η ασθενής υποβλήθηκε σε υπερηχογράφημα και αξονική τομογραφία που υπέδειξαν στεάτωση (λιπώδη διήθηση του ήπατος). Υποβλήθηκε στη συνέχεια σε βιοψία ήπατος που επιβεβαίωσε την στεάτωση και έδειξε επιπλέον σημεία φλεγμονής και ίνωσης. Έγινε διάγνωση μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας (NASH: non alcoholic steatohepatitis), μια ακραίας μορφής μη



αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος (NAFLD: non alcoholic fatty liver disease), που εξελίσσεται σε κίρρωση και αυξάνει την πιθανότητα ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Στην ασθενή υποδείχθηκε να χάσει σταδιακά βάρος με δίαιτα και χορηγήθηκαν στατίνες και ουρσοδεοξυχολικό οξύ (UDCA), ένα φυσικό χολικό οξύ με ηπατοπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Ερωτήσεις:

1. Πάσχει η ασθενής από διαβήτη; Κινδυνεύει από αθηρωμάτωση; Ποιος είναι ο ΔΜΣ της;
2. Ποια εργαστηριακά αποτελέσματα υπέδειξαν να υποβληθεί στις παραπάνω εξετάσεις και γιατί;
3. Η στεάτωση οφείλεται στην συσσώρευση τριγλυκεριδίων στα ηπατοκύτταρα. Που μπορεί να οφείλεται αυτό;
4. Η αντίσταση στην ινσουλίνη επιβαρύνει την στεάτωση. Γιατί;
5. Ενώ η σταδιακή μείωση βάρους ενδείκνυται στη NASH, οι πολύ αυστηρές δίαιτες χειροτερεύουν την κατάσταση. Γιατί;
6. Έχει προταθεί ότι η διαιτητική ανεπάρκεια κάποιων απαραίτητων αμινοξέων μπορεί να συνεισφέρει στην εμφάνιση της NASH εξαιτίας μειωμένης παραγωγής της απολιποπρωτεΐνης B-100. Πως εξηγείται αυτό;
7. Ορισμένα φάρμακα προκαλούν ως παρενέργεια NASH γιατί συνεισφέρουν στη πρόκληση βλαβών στα μιτοχόνδρια του ήπατος. Πως η μιτοχονδριακή βλάβη μπορεί να οδηγήσει σε NASH;
8. Υπάρχουν επίσης αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος και αλκοολική στεατοηπατίτιδα. Ποια είναι η αιτία της νόσου σε αυτές τις περιπτώσεις;
9. Πως δρουν οι στατίνες

Περιστατικό 3.

Ένας 49-χρονος άνδρας με ιστορικό υπέρτασης και υπερχοληστερολαιμίας μεταφέρθηκε στα επείγοντα νωρίς το πρωί με έντονο πόνο στο στήθος. Του δόθηκε αμέσως ασπιρίνη και υποβλήθηκε σε ηλεκτροκαρδιογράφημα που υπέδειξε έμφραγμα του μυοκαρδίου. Του χορηγήθηκε νιτρογλυκερίνη, ηπαρίνη, eptifibatide (αντι-αιμοπεταλιακός παράγοντας) και οξυγόνο και ο πόνος υποχώρησε μετά από 40 λεπτά. Οι εργαστηριακές αναλύσεις έδειξαν:

Αυξημένα επίπεδα κινάσης της κρεατίνης και τροπονίνης.

Τριγλυκερίδια: 252 mg/dl

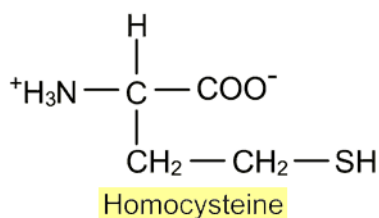
Χοληστερόλη (TC): 242 mg/dl

HDL: 40 mg/dl

LDL: 164 mg/dl

Ομοκυστεΐνη ορού: 52,4 μmol/L

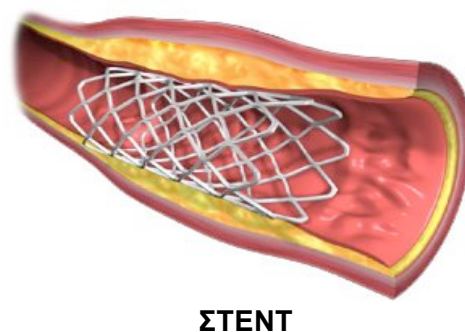
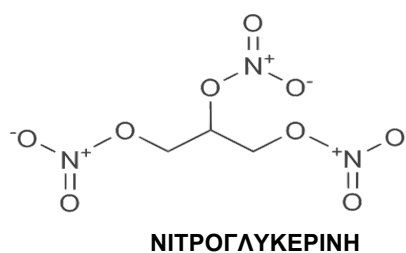
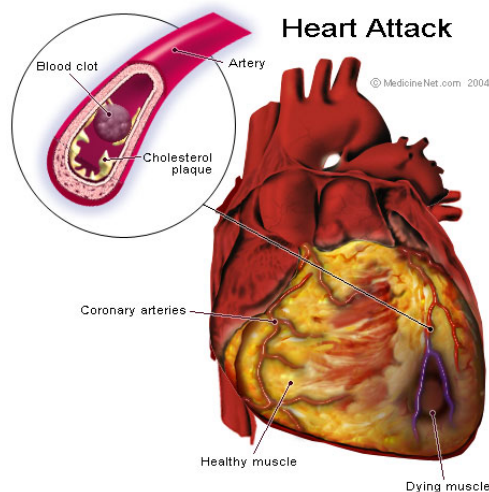
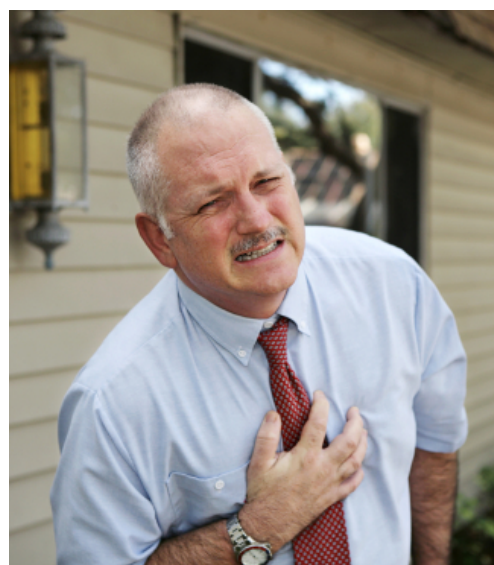
(ανώτατο φυσιολογικό όριο 15 μmol/L)



Ο ασθενής υποβλήθηκε σε καρδιακό καθετηριασμό και στεφανιαία αγγειογραφία που έδειξε στένωση της πρόσθιας κατιούσας αρτηρίας. Υποβλήθηκε σε επιτυχημένη αγγειοπλαστική της στεφανιαίας με τη εμφύτευση στεντ και 4 ημέρες αργότερα βγήκε από το νοσοκομείο με συνταγή για τη χορήγηση ασπιρίνης, clopidogrel (αντι-αιμοπεταλιακός παράγοντας), metoprolol (αναστολέας του β1-αδρενεργικού υποδοχέα), atorvastatin, valsartan (αγγειοδιασταλτικό), βιταμίνης B6, βιτ. B12 και φολικού.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Είναι οι αθηρωματικοί δείκτες του ασθενή συμβατοί με την κατάσταση του; Ποιος άλλος δείκτης είναι ιδιαίτερα επιβαρυντικός;
2. Ποιες αντιδράσεις παράγουν ομοκυστεΐνη; Ποιες καταναλώνουν;
3. Πως βοηθούν οι βιταμίνες B6, B12 και φολικό στη καταπολέμηση της υπερομοκυστεϊναιμίας;
4. Πως δρουν η ασπιρίνη, η νιτρογλυκερίνη, η ηπαρίνη, το atorvastatin;



ΣΤΕΝΤ

Περιστατικό 4.

Ένα βρέφος 6 μηνών παρουσίασε συχνούς εμετούς και σταμάτησε να βάζει βάρος. Μετά από δυο μήνες εισήχθηκε στο νοσοκομείο. Οι εξετάσεις ρουτίνας και εργαστηριακές αναλύσεις ήταν φυσιολογικές αλλά μετά από μια εβδομάδα έπεσε σε λήθαργο, ανέβασε πυρετό και παρουσίασε ταχυπαλμία και ηπατομεγαλία. Το εγκεφαλογράφημα έδειξε μεγάλες ανωμαλίες. Επειδή δεν μπορούσε να δεχθεί το γάλα που του δινόταν με διασωλήνωση, του χορηγήθηκε ενδοφλέβια γλυκόζη. Καλύτερευσε γρήγορα και βγήκε από το κώμα σε 24 ώρες. Ανάλυση των ούρων έδειξε μεγάλα ποσά γλουταμίνης και ουρακίλης, που υπεδείκνυν υψηλή συγκέντρωση αμμωνίας στο αίμα. Αυτό επιβεβαιώθηκε και εργαστηριακά. Στη συνέχεια χορηγήθηκε στο βρέφος δίαιτα με μειωμένη πρωτεΐνη (1,5 gr/kg σώματος, φυσιολογικά 2 gr/kg σώματος). Μετά από 2 χρόνια με την ίδια δίαιτα η ανάπτυξη του (ύψος, βάρος) κρίθηκε φυσιολογική για την ηλικία του.

Symptoms of Hyperammonemia

General

- Growth retardation
- Hypothermia

Muscular/Neurologic

- Poor coordination
- Dysdiadochokinesia
- Hypotonia or hypertonia
- Ataxia
- Tremor
- Seizures
- Decorticate or decerebrate posturing

Central

- Combativeness
- Lethargy
- Coma

Eyes

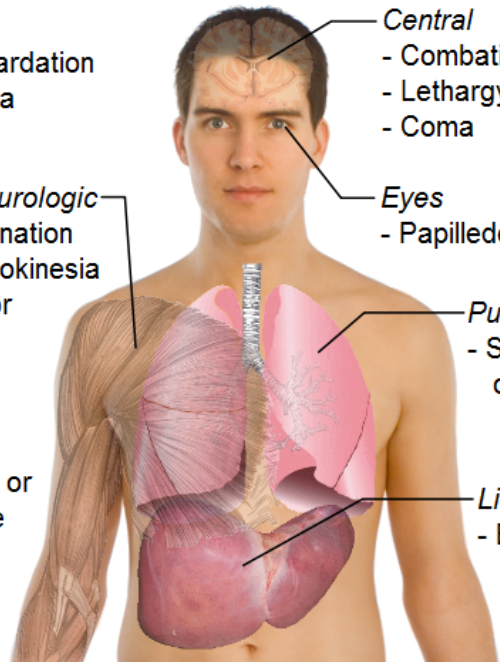
- Papilledema

Pulmonary

- Shortness of breath

Liver

- Enlargement



Ερωτήσεις.

1. Στη δυσλειτουργία ποιας μεταβολικής οδού οφείλεται η υπεραμμωναιμία του ασθενή; Ποια ενζύμα είναι δυνατόν να είναι ανεπαρκή;
2. Με βάση τα δεδομένα (υψηλή συγκέντρωση απεκκρινόμενης ουρακίλης), ποιο ακριβώς ενζύμο είναι ανεπαρκές;
3. Γιατί είναι αυξημένη η συγκέντρωση της γλουταμίνης στα ούρα;
4. Πως βοηθά η δίαιτα με μειωμένη πρωτεΐνη;
5. Αν η αλλαγή στην δίαιτα δεν είχε βοηθήσει, τι άλλα μέσα θα μπορούσαν να βοηθήσουν ως άμεση αντιμετώπιση της κατάστασης ή φαρμακευτική αγωγή;
6. Ποιο αμινοξύ γίνεται απαραίτητο σε ασθενείς με υπεραμμωναιμία και πρέπει να προστίθεται στη δίαιτα;

Περιστατικό 5.

Ένα νεογέννητο κοριτσάκι χρειάστηκε να νοσηλευτεί εξαιτίας αναπνευστικών προβλημάτων. Στη συνέχεια βρέθηκε ότι είχε μυοπάθεια, σοβαρή εγκεφαλική βλάβη και κακή ανάπτυξη. Όταν της δόθηκε διαίτα πλούσια σε υδατάνθρακες, τα ούρα της περιείχαν μεγάλες ποσότητες κετονοσωμάτων. Βιοψία του ήπατος έδειξε την σχεδόν πλήρη έλλειψη της δράσης καρβοξυλάσης του ακετύλο-CoA ενώ η δράσης της καρβοξυλάσης του προπιόνυλο-CoA ήταν φυσιολογική. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν μετά από καλλιέργεια ινοβλαστών του δέρματος.



Ερωτήσεις

1. Ποια μεταβολική οδός δυσλειτουργεί στην ασθενή σαν αποτέλεσμα της ανεπάρκειας της καρβοξυλάσης του ακετύλο-CoA;
2. Είναι δυνατόν η ανεπάρκεια της καρβοξυλάσης του ακετύλο-CoA να οφείλεται σε ανεπάρκεια της βιοτίνης (βιτ. B7);
3. Ποια στοιχεία κάνουν απίθανη της ανεπάρκεια της βιοτίνης;
4. Ποιες άλλες οδοί και ενζύμα απαιτούν την βιοτίνη;
5. Γιατί η διαίτα με υδατάνθρακες, προκάλεσε την απέκκριση κετονοσωμάτων;
6. Πως εξηγείται η αναπνευστική δυσκολία της ασθενούς;

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΥΛΙΚΟΥ ΦΡΟΝΤΙΣΤΗΡΙΩΝ

Marshall W.J. & S.K. Bangert: Κλινική Χημεία
Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης

Baynes J. W. & M. H. Dominiczak: Ιατρική Βιοχημεία (2^η Έκδοση)
Επιστημονικές Εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε.

Saltsman K., Berg J. and G. Tomaselli: A clinical companion to accompany Biochemistry.
W.H. Freeman and Company

Montgomery R., Conway T.W. and A.A. Spector: Biochemistry, a Case-Oriented Approach
The C.V. Mosby Company

<http://en.wikipedia.org/wiki/>

**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Ιατρικής
Εργαστήριο Βιοχημείας**

BIOΧΗΜΕΙΑ Ι

Εργαστηριακές Ασκήσεις

Σ. Μπονάνου, Γ. Σίμος, Ε. Γεωργάτσου, Π. Λιάκος

Λάρισα 2012

ΚΑΝΟΝΕΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Για την **ασφάλεια** όλων πρέπει να ακολουθούνται πάντα οι κάτωθι κανόνες:

- 1) **Κανείς** δεν πρέπει να εργάζεται μόνος του στο εργαστήριο χωρίς την παρουσία κάποιου μέλους του προσωπικού.
- 2) Αφήστε εξωτερικά ενδύματα και **ογκώδη αντικείμενα** (π.χ. σάκους) έξω από το εργαστήριο ή σε ειδικό χώρο του εργαστηρίου. Σκόρπια πράγματα σε πάγκους και πατώματα μπορεί να προκαλέσουν ατύχημα και υπάρχει κίνδυνος να καταστραφούν και τα ίδια.
- 3) Φοράτε πάντα **ποδιά** μόλις μπειτε στο εργαστήριο.
- 4) **Απαγορεύεται να καπνίζετε**, να τρώτε ή να πίνετε στο εργαστήριο.
- 5) **Διαβάστε το φυλλάδιο που περιγράφει την άσκηση πριν μπειτε στο εργαστήριο** και ακολουθήστε προσεκτικά τις οδηγίες που σας δίνονται για την εκτέλεση κάθε άσκησης. Επειδή συχνά δίνονται επιπλέον προφορικές εξηγήσεις στην αρχή του εργαστηρίου, είναι **απαραίτητο να προσέρχεστε εγκαίρως**. Αργοπορημένοι φοιτητές δεν θα γίνονται δεκτοί.

Γενική αρχή κάθε πειραματικής δουλειάς: Σκεφθείτε και προγραμματίσετε πριν ενεργήσετε.

- 6) **Μη ρουφάτε** τοξικά αντιδραστήρια με το στόμα - χρησιμοποιείτε τις pi-rumps ή poire που σας δίνονται για χρήση με τα σιφώνια. Αν δεν ξέρετε αν κάτι είναι τοξικό ρωτήστε. Ακόμα καλύτερα: Μη ρουφάτε τίποτα με το στόμα.
- 7) Χρησιμοποιείτε την **απαγωγό εστία** και φορέστε γυαλιά ασφαλείας κάθε φορά που χειρίζεστε πολύ καυστικά αντιδραστήρια, π.χ. πυκνά οξέα ή βάσεις, διαλύματα με αποπνικτικούς ατμούς κ.λ.π.
- 8) **Στρέψτε το στόμιο σωλήνων** που θερμαίνονται **μακριά** από σας και άλλα πρόσωπα. Προσοχή πώς πιάνετε θερμά γυαλικά. Μη φέρετε ποτέ εύφλεκτα υλικά (π.χ. αιθανόλη, αιθέρα) κοντά σε γυμνή φλόγα.
- 9) **Αν χύσετε** κάτι σκουπίστε το αμέσως με χαρτοπετσέτα - βρεγμένοι πάγκοι και πατώματα είναι επικίνδυνα. Αν χύσετε κάτι τοξικό αναφέρετέ το αμέσως στον υπεύθυνο του εργαστηρίου.
- 10) **Προσοχή στην χρήση βιολογικών υγρών**, (αίμα, οροί, κ.λ.π.) - μη ρουφάτε τίποτα με το στόμα, φοράτε γάντια και τοποθετείστε τα μεν αναλώσιμα (π.χ. χαρτικά, πλαστικά) που ήρθαν σε επαφή μαζί τους σε ειδικό σάκο απορριμμάτων, τα δε γυαλικά σε ειδικό δοχείο με απολυμαντικό.
- 11) **Εξοικειωθείτε με την λειτουργία κάθε οργάνου** και ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης του. Αν δεν είστε σίγουροι πώς να χρησιμοποιήσετε ένα όργανο ή μία συσκευή συμβουλευτείτε ένα μέλος του προσωπικού - έτσι προλαμβάνεται τυχόν βλάβη που μπορεί να προξενηθεί στο όργανο και εσείς έχετε εμπιστοσύνη στα αποτελέσματα που παίρνετε.
- 12) Βεβαιωθείτε ότι ξέρετε πού βρίσκονται στο εργαστήριο και πώς χρησιμοποιούνται ο **πυροσβεστήρας, το κουτί πρώτων βοηθειών και τα δοχεία για πλύσιμο ματιών**. Γρήγορη αντιμετώπιση ενός μικρού ατυχήματος μπορεί να εμποδίσει την δημιουργία ενός μεγάλου.
- 13) **Στο τέλος** κάθε άσκησης **αφήστε τον πάγκο σας καθαρό και τακτικό**. Ξεπλύνετε όλα τα βρώμικα γυαλικά και τοποθετείστε τα στα δοχεία για πλύσιμο και ακολουθήστε ό,τι οδηγίες σας δοθούν σχετικά με τα αντιδραστήρια.

ΑΣΚΗΣΕΙΣ 1-3

ΚΙΝΗΤΙΚΗ ENZYMIΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

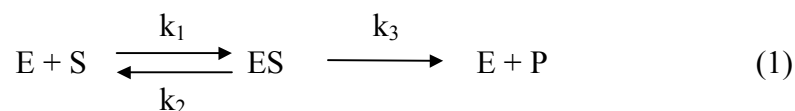
Εισαγωγή

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες που δρουν ως βιολογικοί καταλύτες επειδή έχουν την ικανότητα να προάγουν ειδικές χημικές αντιδράσεις κάτω από τις ήπιες συνθήκες που επικρατούν στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. Τα ένζυμα δεν αλλάζουν τη θέση της ισορροπίας σε μια αντιστρεπτή αντίδραση, αλλά επιταχύνουν την επίτευξή της χαμηλώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης, που απαιτείται κατά την μετατροπή υποστρώματος σε προϊόν, με το να διευκολύνουν τη δημιουργία της μεταβατικής κατάστασης. Τα ένζυμα έχουν τρία διακριτικά χαρακτηριστικά: Υψηλή ειδικότητα, υψηλή ταχύτητα αντίδρασης και μεγάλη ικανότητας ρύθμισης.

Όλα τα ένζυμα συνδέουν αντιστρεπτά το υπόστρωμά τους σε μια ειδική περιοχή δέσμευσης γνωστή ως το **ενεργό κέντρο**, που δημιουργείται από την τριδιάστατη δομή του πρωτεϊνικού μορίου. Το **σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος** υφίσταται μια καταλυτική αντίδραση, που προάγεται από ειδικά κατάλοιπα αμινοξέων στο ενεργό κέντρο, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό του προϊόντος. Οι καταλυτικές ιδιότητες ενός ενζύμου συχνά εξαρτώνται από την ύπαρξη μη-πεπτιδικών μορίων, γνωστών ως συμπαραγόντες ή συνένζυμα, τα οποία συνδέονται με το ένζυμο και προάγουν την αντίδραση. Ορισμένα ένζυμα (αλλοστερικά) μπορεί να περιέχουν, εκτός από το ενεργό κέντρο, ξέχωρες ρυθμιστικές ή αλλοστερικές περιοχές για την σύνδεση άλλων μορίων, τα οποία, όταν συνδεθούν, τροποποιούν την καταλυτική δράση του ενζύμου επειδή επάγουν αλλαγές στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου. Αυτά τα ρυθμιστικά μόρια ονομάζονται τροποποιητές και μπορεί να ενεργοποιούν ή να καταστέλλουν το ένζυμο.

Η κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων, όπως διατυπώθηκε κυρίως από τους Michaelis – Menten, ασχολείται με την μέτρηση των δύο χαρακτηριστικών σταθερών του κάθε ενζύμου, V_{max} και K_M , και με την μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την ενζυμική αντίδραση. Οι κυριότεροι από τους παράγοντες αυτούς είναι: η συγκέντρωση του ενζύμου, η συγκέντρωση του υποστρώματος και άλλων ουσιών που μπορούν να συνδεθούν με το ένζυμο (προϊόντα αντιδράσεως, συνένζυμα, ενεργοποιητές, αναστολείς), το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς.

Η **ενεργότητα** ενός ενζύμου, E , εκφράζεται με την ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο. Για την απλούστερη περίπτωση, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται μη αντιστρεπτά σε ένα προϊόν, στην αντίδραση



(και όπου k_1 , k_2 και k_3 οι σταθερές της ταχύτητας των επιμέρους αντιδράσεων) η ταχύτητα, V , ορίζεται σαν το ποσό του υποστρώματος, S , που καταναλώνεται ή το ποσό των προϊόντων, P , που δημιουργούνται στην μονάδα του χρόνου ($V = -d[S]/dt = d[P]/dt$) και υπολογίζεται από την εξίσωση **Michaelis - Menten**:

$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

Όπου V_0 η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης, $[S]$ η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος, $V_{\max}$ η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης για την συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε και

$$(3) \quad K_M \text{ (σταθερά Michaelis)} = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

Για να ισχύει η κινητική Michaelis - Menten απαιτείται ο προσδιορισμός της αρχικής ταχύτητας, V_0 , γιατί μόνο τότε ισχύει η υπόθεση ότι η μετατροπή αντιδρώντων σε προϊόντα δεν είναι αντιστρεπτή και $[P]=0$. Η **αρχική ταχύτητα, V_0** , προσδιορίζεται από την **καμπύλη προόδου** της αντίδρασης, δηλαδή το διάγραμμα μεταβολής της συγκέντρωσης του υποστρώματος ή προϊόντος με το χρόνο και δίνεται από την εφαπτομένη των καμπυλών σε χρόνο $t=0$.

Δεδομένου ότι η $V_0 = k_3[ES]$ και $V_{\max} = k_3[E_T]$ (όπου E_T το ολικό ποσό του ενζύμου) είναι φανερό ότι η **αρχική ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του ενζύμου** που χρησιμοποιήθηκε. Για την εκτίμηση της επίδρασης της συγκέντρωσης του ενζύμου στην V_0 χρειάζεται η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος να είναι μεγάλη, ώστε να μην αποτελεί περιοριστικό παράγοντα (η αντίδραση να είναι μηδενικής τάξεως ως προς το υπόστρωμα). (Για περισσότερες εξηγήσεις για την θεωρία της κινητικής των ενζυμικών αντιδράσεων αναφερθείτε σε βιβλία, π.χ. Βιοχημεία Stryer, κεφάλαιο 8).

Από την εξίσωση Michaelis - Menten προκύπτει ότι η αρχική ταχύτητα μιας αντίδρασης εξαρτάται από την συγκέντρωση του υποστρώματος. Για πολλές ενζυμικές αντιδράσεις, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, το διάγραμμα μεταβολής της αρχικής ταχύτητας, V_0 , με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, $[S]$, είναι μια ορθογώνια υπερβολή. Παρατηρούμε ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα αυξάνει γραμμικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητική πρώτης τάξεως, $V_0=k[S]$), ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα γίνεται σταθερή και ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητική μηδενικής τάξεως ή κινητική κορεσμού, $V_0=k$) και πλησιάζει την οριακή τιμή της μέγιστης ταχύτητας, $V_{\max}$. Η σταθερά Michaelis είναι η συγκέντρωση υποστρώματος στην οποία έχουμε το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας. Από τις εξισώσεις 1 και 3 προκύπτει ότι, όταν η k_3 είναι πολύ μικρή, η K_M πλησιάζει τη σταθερά διαστάσεως του συμπλόκου ES , μας δίνει επομένως μια εκτίμηση της συγγένειας του ενζύμου προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Επειδή ο προσδιορισμός των K_M και $V_{\max}$ είναι δύσκολος από την ορθογώνια υπερβολή, προτιμώνται γραμμικοί μετασχηματισμοί της εξίσωσης Michaelis – Menten. Ο γνωστότερος από αυτούς είναι η **εξίσωση Lineweaver – Burk ή διάγραμμα του διπλού αντιστρόφου**:

$$(4) \quad 1/V_0 = K_M/V_{\max} * 1/[S] + 1/V_{\max}$$

Έτσι το διάγραμμα $1/V_0$ προς $1/[S]$ είναι ευθεία γραμμή, η οποία τέμνει τον κάθετο άξονα στο σημείο $1/V_{\max}$, τον οριζόντιο άξονα στο σημείο $-1/K_M$ και έχει κλίση $K_M/V_{\max}$

Η κινητική Michaelis-Menten, όπως έχει τροποποιηθεί και επεκταθεί για να περιλαμβάνει και αντιστρεπτές αντιδράσεις και αντιδράσεις δύο ή περισσότερων υποστρωμάτων, ισχύει για πάρα πολλές ενζυμικές αντιδράσεις. Δεν ισχύει όμως για τα αλλοστερικά ένζυμα.

Πολλά **αλλοστερικά ένζυμα** είναι ολιγομερή, αποτελούνται δηλαδή από αρκετές ίδιες ή διαφορετικές πρωτεϊνικές υπομονάδες και, αντί για ορθογώνια υπερβολή, δίνουν μια **σιγμοειδή σχέση** ανάμεσα στην αρχική ταχύτητα και στη συγκέντρωση του υποστρώματος. Σε ένα αλλοστερικό ένζυμο η σύνδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο μιας υπομονάδας αλλάζει τη μοριακή του διαμόρφωση. Η αλλαγή αυτή μεταδίδεται στις άλλες υπομονάδες συνεργατικά και μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη ή μειωμένη δραστηριότητα των άλλων υπομονάδων για τη σύνδεση άλλων μορίων υποστρώματος. Η σύνδεση μορίων, διαφορετικών από το υπόστρωμα (θετικοί ή αρνητικοί τροποποιητές), σε διαφορετικές από το ενεργό κέντρο αλλοστερικές περιοχές επίσης μπορεί να επηρεάσει την ενζυμική ενεργότητα. Συνήθως οι αλλοστερικοί τροποποιητές επηρεάζουν την τάση σύνδεσης της ενεργής περιοχής με το υπόστρωμα, υπάρχουν ωστόσο και αλλοστερικά συστήματα στα οποία αλλάζει η ταχύτητα μετατροπής του συμπλόκου ES σε προϊόντα. Η σταθερά Michaelis K_M δεν χρησιμοποιείται με αλλοστερικά ένζυμα. Αντ' αυτής χρησιμοποιείται ο όρος $[S]_{0.5}$, δηλαδή η συγκέντρωση του υποστρώματος που απαιτείται για να παρατηρηθεί 50% ενζυμικός κορεσμός. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ύπαρξη σιγμοειδούς κινητικής δεν αποδεικνύει την ύπαρξη αλλοστερικών φαινομένων και ότι κάποια αλλοστερικά ένζυμα δεν έχουν σιγμοειδή κινητική. Γενικά, οι αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις είναι πολύπλοκες και διάφορα μοντέλα έχουν προταθεί για την εξήγησή τους.

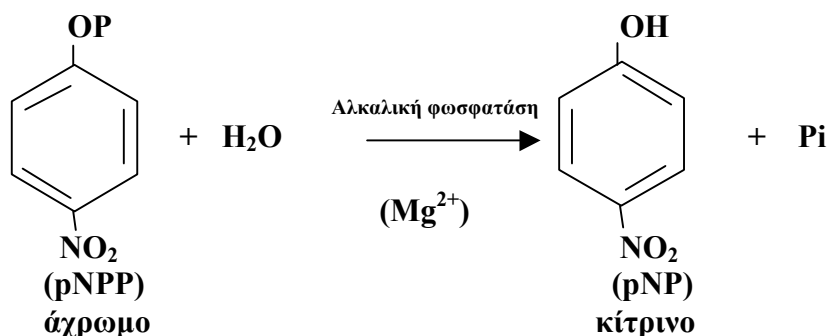
Στόχος των Ασκήσεων 1-3: Να παρατηρήσετε γιατί χρειάζεται να προσδιορίζουμε την αρχική ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης και τι επίδραση έχει η συγκέντρωση του ενζύμου και του υποστρώματος σ' αυτή την αρχική ταχύτητα. Επίσης την επίδραση αναστολέα στις κινητικές σταθερές του ενζύμου.

Η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης (V_0) θα υπολογιστεί από την κλίση της καμπύλης της μεταβολής της απορροφητικότητας (A) που εμφανίζει το προϊόν της αντίδρασης σε σχέση με τον χρόνο (όπου μετρήσεις απορροφητικότητας γίνονται συνεχώς σε μικρά χρονικά διαστήματα).

Αντιδραστήρια: Θα σας δοθούν τα κάτωθι διαλύματα:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα, pH 9,5: 0,1M Tris - HCl Buffer, pH 9,5 / 10mM $MgCl_2$.
2. π-νιτροφαινόλη (pNP): 0,05mM και 0,5mM
3. π-νιτροφαινυλ-φωσφορικό (pNPP) (δινατρικό άλας διαλυμένο σε Buffer): 10mM, 2,0mM, 1,0mM, 0,5mM.
4. Αλκαλική φωσφατάση: 0,25mg/ml H_2O (εμπορικό παρασκεύασμα ενζύμου από την εντερική βλεννογόνο βοός). Το διάλυμα αυτό, καθώς και δύο αραιώσεις του (0,10mg/ml και 0,025mg/ml), διατηρούνται στους 4°C. Το τέταρτο δείγμα περιέχει το αρχικό διάλυμα ενζύμου (0,25mg/ml) το οποίο έχει θερμανθεί στους 90°C για 5 λεπτά.

Αντίδραση



Σε αλκαλικό pH η αλκαλική φωσφατάση καταλύει την παραπάνω αντίδραση. Παρόλο που το pNPP δεν είναι το φυσικό υπόστρωμα γι' αυτό το ένζυμο, αυτή η αντίδραση είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας διότι το προϊόν π-νιτροφαινόλη (pNP) είναι κίτρινο και απορροφά έντονα φως μήκους κύματος 400nm. Έτσι η ταχύτητα του σχηματισμού του προϊόντος (δηλαδή η ταχύτητα της αντίδρασης) μπορεί να υπολογιστεί φασματοφωτομετρικά με την μέτρηση της απορροφητικότητας του διαλύματος στα 400nm σαν συνάρτηση του χρόνου.

Για την καλύτερη διεξαγωγή του εργαστηριακού μέρους της Κινητικής Ενζυμικών Αντιδράσεων, στην Άσκηση 1 θα εκτελέσετε το Πείραμα I, στην Άσκηση 2 θα εκτελέσετε τα Πειράματα II και III και στην Άσκηση 3 θα εκτελέσετε το Πείραμα IV. Στο τέλος κάθε άσκησης θα επεξεργαστείτε τα αποτελέσματά σας και θα υπολογίσετε τις κινητικές σταθερές του ενζύμου, απουσία και παρουσία αναστολέα.

ΑΣΚΗΣΗ 1

ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ Α

ΠΕΙΡΑΜΑ Ι :

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης απορροφητικότητας της π-νιτρο-φαινόλης στα 400nm

Για να υπολογίσετε την συγκέντρωση της π-νιτροφαινόλης που παράγεται στην ενζυμική αντίδραση από τις τιμές απορροφητικότητας που θα λάβετε, είναι ανάγκη να κατασκευάσετε προηγουμένως μια πρότυπη καμπύλη από τις μετρήσεις της απορροφητικότητας στα 400nm (A_{400}) διαφόρων πρότυπων συγκεντρώσεων π-νιτροφαινόλης. Ετοιμάστε τα ακόλουθα διαλύματα σε 7 σωλήνες του φασματοφωτόμετρου:

	T	1	2	3	4	5	6
Απιονισμένο νερό (ml)	0,5	0,0	0,2	0,4	0,0	0,2	0,4
Buffer pH 9,5 (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
π-νιτροφαινόλη 0,5mM (ml)	—	0,5	0,3	0,1	—	—	—
π-νιτροφαινόλη 0,05mM (ml)	—	—	—	—	0,5	0,3	0,1

Χρησιμοποιώντας τον σωλήνα T σαν τυφλό φωτομετρήστε τους σωλήνες 1-6 στα 400nm.

Στη αναφορά των αποτελεσμάτων: Υπολογίστε την τελική συγκέντρωση (μM) της π-νιτροφαινόλης σε κάθε διάλυμα και καταγράψτε τα αποτελέσματά σας (A_{400}) στον Πίνακα Ι. Κατασκευάστε την πρότυπη καμπύλη απορροφητικότητας της pNP (Διάγραμμα 1) τοποθετώντας τις τιμές απορροφητικότητας που βρήκατε (ψ άξονα) έναντι των γνωστών συγκεντρώσεων π-νιτροφαινόλης που υπολογίσατε (χ άξονα).

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΣΚΗΣΗΣ 1

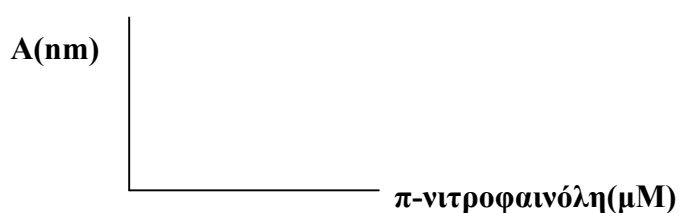
ΠΕΙΡΑΜΑ Ι : ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ Π-ΝΙΤΡΟΦΑΙΝΟΛΗΣ.

Πίνακας 1

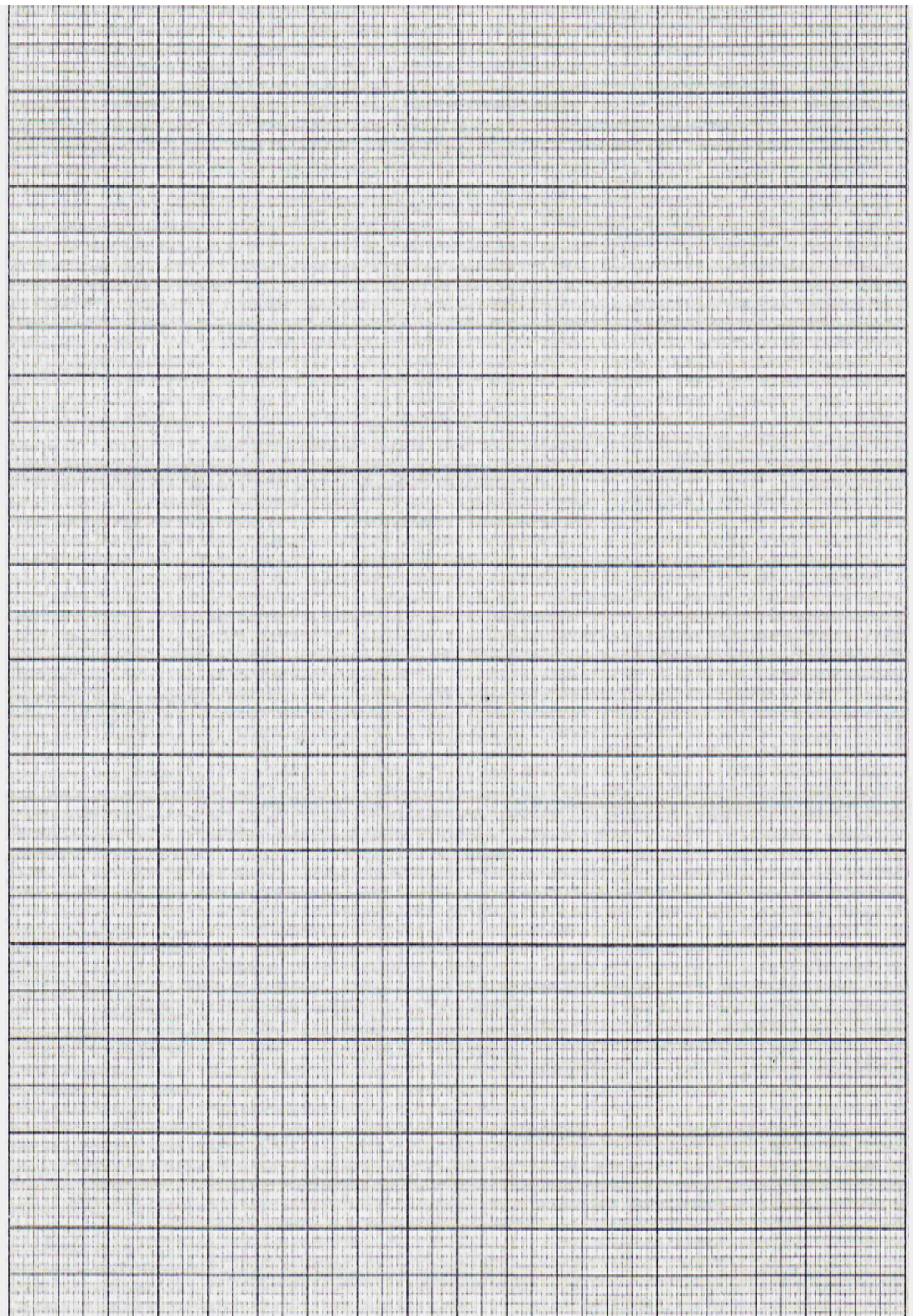
<u>Αριθμός σωλήνα</u>	<u>Απορροφητικότητα 400nm</u>	<u>π-Νιτροφαινόλη μM</u>
1		
2		
3		
4		
5		
6		

Κατασκευάστε την πρότυπη καμπύλη απορροφητικότητας της pNP (Διάγραμμα 1) τοποθετώντας τις τιμές απορροφητικότητας που βρήκατε (ψ άξονα) έναντι των γνωστών συγκεντρώσεων π-νιτροφαινόλης που υπολογίσατε (χ άξονα).

Διάγραμμα 1



Διάγραμμα 1



ΑΣΚΗΣΗ 2

KΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ Β

ΠΕΙΡΑΜΑ ΙΙ:

Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου στην ταχύτητα της αντίδρασης

Σε 5 σωλήνες του φασματοφωτόμετρου προσθέστε τα ακόλουθα διαλύματα:

- Buffer, pH 9,5: 2,4ml
- 10mM π-νιτροφαινυλ-φωσφορικό (pNPP): 0,5ml

Στον πρώτο σωλήνα προσθέστε 0,1ml απιονισμένο νερό και χρησιμοποιείτε τον σαν τυφλό για να μηδενίσετε το φασματοφωτόμετρο σε A_{400} .

Στη συνέχεια, στο δεύτερο σωλήνα προσθέστε 0,1ml αλκαλικής φωσφατάσης (0,25mg/ml), ανακινείτε και, **αρχίζοντας συγχρόνως την μέτρηση του χρόνου (to)** με λεπτοδείκτη, **φωτομετρήστε αμέσως στα 400nm (A_0)**. Παρακολουθείτε και σημειώστε την μεταβολή της απορροφητικότητας κάθε 30" (A_1 , A_2 κλπ) τουλάχιστον για 4-5 λεπτά.

Μηδενίστε ξανά το φασματοφωτόμετρο με το τυφλό και **επαναλάβετε το παραπάνω πείραμα χρησιμοποιώντας 0,1ml αλκαλικής φωσφατάσης δυο διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,10mg/ml, 0,025mg/ml)** και στη συνέχεια το θερμανθέν δείγμα (0,25mg/ml). Κάθε φορά προσθέστε το ένζυμο στον σωλήνα που ήδη περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα και υπόστρωμα και μετρήστε την μεταβολή της A_{400} για 5 λεπτά.

Στη αναφορά των αποτελεσμάτων του Πειράματος ΙΙ: Παρουσιάστε τα κινητικά δεδομένα της αντίδρασης (t σε sec έναντι A_{400}), που πήρατε με τους σωλήνες 2-5 που περιέχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου, στον Πίνακα ΙΑ.

Κατασκευάστε τις καμπύλες προόδου της αντίδρασης (Διάγραμμα 2) τοποθετώντας τις τιμές απορροφητικότητας που πήρατε (A_{400}) στον ψ άξονα έναντι του χρόνου της αντίδρασης (min) στον χ άξονα. Υπολογίστε την αρχική ταχύτητα της αντίδρασης (V_0) από την κλίση της εφαπτομένης της καμπύλης που σχεδιάσατε στο t_0 και εκφράστε την σαν μεταβολή A_{400}/min και $\mu\text{M}/\text{min}$. (Χρησιμοποιήστε την πρότυπη καμπύλη απορροφητικότητας της π-νιτροφαινόλης που κατασκευάσατε στο πείραμα 1 για να μετατρέψετε την ταχύτητα από A_{400}/min σε $\mu\text{M pNP}/\text{min}$).

Καταγράψτε τα αποτελέσματά σας στον Πίνακα ΙΙΒ, δείχνοντας την τελική συγκέντρωση του ενζύμου (mg/ml) σε κάθε αντίδραση για την οποία υπολογίσατε την αρχική ταχύτητα V_0 (A_{400}/min και $\mu\text{M}/\text{min}$). Τι παρατηρείτε;

ΠΕΙΡΑΜΑ ΙΙΙ:

Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα της αντίδρασης

Το υπόστρωμα (pNPP) σας έχει δοθεί σε 4 συγκεντρώσεις. Για κάθε αντίδραση θα χρησιμοποιήσετε σαν τυφλό ένα διάλυμα που περιέχει την ίδια συγκέντρωση υποστρώματος. Σε 8 σωλήνες του φασματοφωτόμετρου προσθέστε τα κάτωθι αντιδραστήρια:

	1	2	3	4	5	6	7	8
	(T)	(Δ)	(T)	(Δ)	(T)	(Δ)	(T)	(Δ)
Buffer pH 9,5 (ml)	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
pNPP 10mM (ml)	0,5	0,5	--	--	--	--	--	--
pNPP 2mM (ml)	--	--	0,5	0,5	--	--	--	--
pNPP 1mM (ml)	--	--	--	--	0,5	0,5	--	--
pNPP 0,5mM (ml)	--	--	--	--	--	--	0,5	0,5
Απιονισμένο νερό (ml)	0,1	--	0,1	--	0,1	--	0,1	--

Μηδενίστε το φασματοφωτόμετρο με το διάλυμα του σωλήνα 1 (τυφλό). Προσθέστε 0,1ml ενζύμου (**0,25mg/ml**) στο διάλυμα του σωλήνα 2 (δείγμα) και προσδιορίστε την πρόοδο της αντίδρασης, όπως κάνατε προηγουμένως, για 5 λεπτά. **Επαναλάβετε το πείραμα, προσθέτοντας κάθε φορά 0,1ml ενζύμου στους σωλήνες δειγμάτων 4, 6 και 8, χρησιμοποιώντας σαν τυφλό τους σωλήνες 3, 5 και 7 αντιστοίχως.**

Στην αναφορά των αποτελεσμάτων του Πειράματος ΙΙΙ: Παρουσιάστε τα κινητικά δεδομένα της αντίδρασης (t σε sec έναντι A_{400}) που πήρατε για τους σωλήνες 2, 4, 6 και 8, που περιέχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, στον Πίνακα ΙΙΑ.

Σχεδιάστε την πρόοδο της αντίδρασης (Διάγραμμα 3Α) για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος και μετρήστε την εκάστοτε αρχική ταχύτητα, όπως στο πείραμα 2. Καταγράψτε τα αποτελέσματά σας στον Πίνακα ΙΙΒ, δείχνοντας την τελική συγκέντρωση του υποστρώματος (μM) σε κάθε αντίδραση για την οποία υπολογίσατε την αρχική ταχύτητα V_0 (σε A_{400}/min και $\mu\text{M}/\text{min}$).

Κατασκευάστε ένα διάγραμμα (Διάγραμμα 3Β) που να δείχνει την μεταβολή της ταχύτητας V_0 σε $\mu\text{M}/\text{min}$ (ψ άξονας) σε σχέση με την μεταβολή της συγκέντρωσης του υποστρώματος S (χ άξονας). Σχεδιάστε ένα άλλο διάγραμμα (Διάγραμμα 3Γ) χρησιμοποιώντας τις τιμές $1/V_0$ και $1/S$ (Διάγραμμα LINEWEAVER-BURK ή του διπλού αντιστρόφου) και από αυτό υπολογίστε την V_{max} και K_M της αλκαλικής φωσφατάσης. (Εάν ο χρόνος δεν επαρκεί, μπορείτε να ολοκληρώσετε την κατασκευή των διαγραμμάτων κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων του Πειράματος ΙV, στην 3^η Άσκηση)

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΣΚΗΣΗΣ 2

ΠΕΙΡΑΜΑ II. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΣΤΗΝ ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

Πίνακας ΠΑ

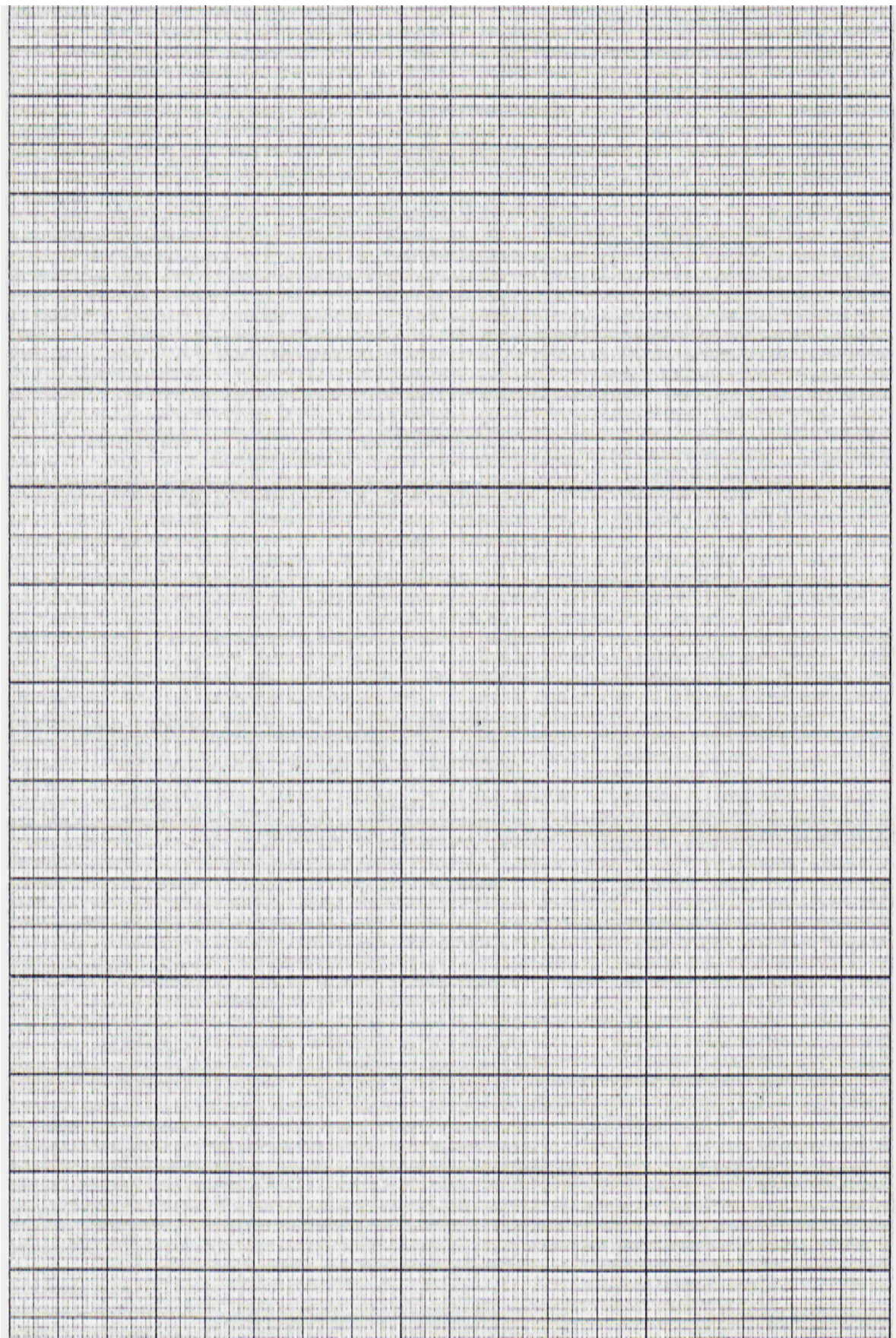
<u>Χρόνος</u> t (sec)	<u>Απορροφητικότητα στα 400nm</u>			
	σωλήνας 2	σωλήνας 3	σωλήνας 4	σωλήνας 5
30				
60				
90				
120				
150				
180				
210				
240				
270				
300				

Κατασκευάστε τις καμπύλες προόδου της αντίδρασης τοποθετώντας τις τιμές απορροφητικότητας που πήρατε (A_{400}) στον ψ άξονα έναντι του χρόνου της αντίδρασης (min) στον χ άξονα.

Διάγραμμα 2



Διάγραμμα 2



Υπολογίστε την αρχική ταχύτητα V_0 σαν μεταβολή A_{400}/min και $\mu\text{M}/\text{min}$ (χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη – Διάγραμμα 1) για κάθε συγκέντρωση ενζύμου που χρησιμοποιήσατε και καταγράψτε τα αποτελέσματά σας στον Πίνακα ΠΒ

Πίνακας ΠΒ

<u>Αρχική ταχύτητα V_0</u> A_{400}/min $\mu\text{M}/\text{min}$		<u>Τελική συγκέντρωση ενζύμου</u> (mg / ml)

Τι παρατηρείτε;

**ΠΕΙΡΑΜΑ ΙΙΙ: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ
ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ**

Πίνακας ΙΙΑ (χωρίς αναστολέα)

<u>Χρόνος</u> t (sec)	<u>Απορροφητικότητα στα 400nm</u>			
	σωλήνας 2	σωλήνας 4	σωλήνας 6	σωλήνας 8
30				
60				
90				
120				
150				
180				
210				
240				
270				
300				

Σχεδιάστε την πρόοδο της αντίδρασης για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος (διάγραμμα Α) και μετρήστε την αρχική ταχύτητα V_0 ως A_{400}/min και $\mu\text{M}/\text{min}$. Καταγράψτε τα αποτελέσματά σας στον Πίνακα ΙΙΒ.

Διάγραμμα 3Α



Διάγραμμα 3Α

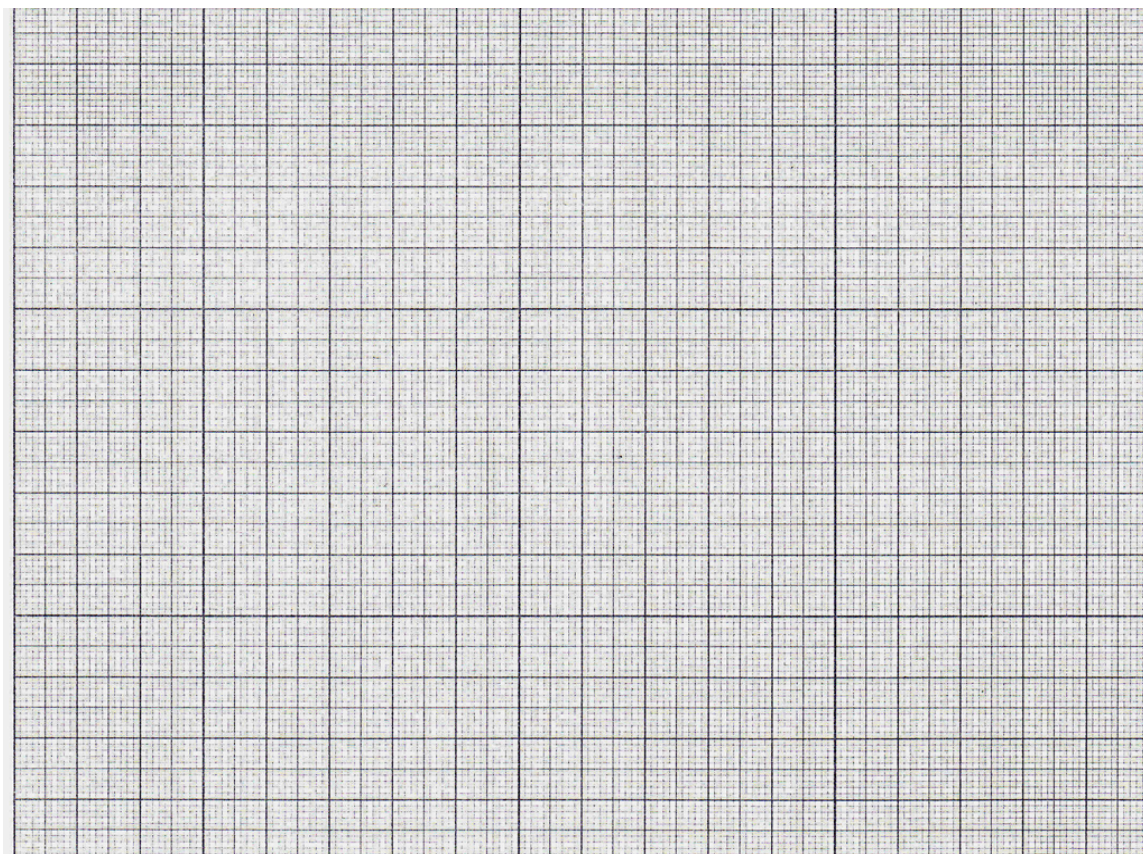
																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

Πίνακας ΙΙΒ

<u>Αριθμός σωλήνα</u>	<u>Τελική συγκέντ. υποστρώμ. (mM)</u>	<u>Αρχική ταχύτητα V_o</u>		$\frac{1}{V_o}$	$\frac{1}{[S]}$
		A400/min	$\mu\text{M}/\text{min}$		
2					
4					
6					
8					

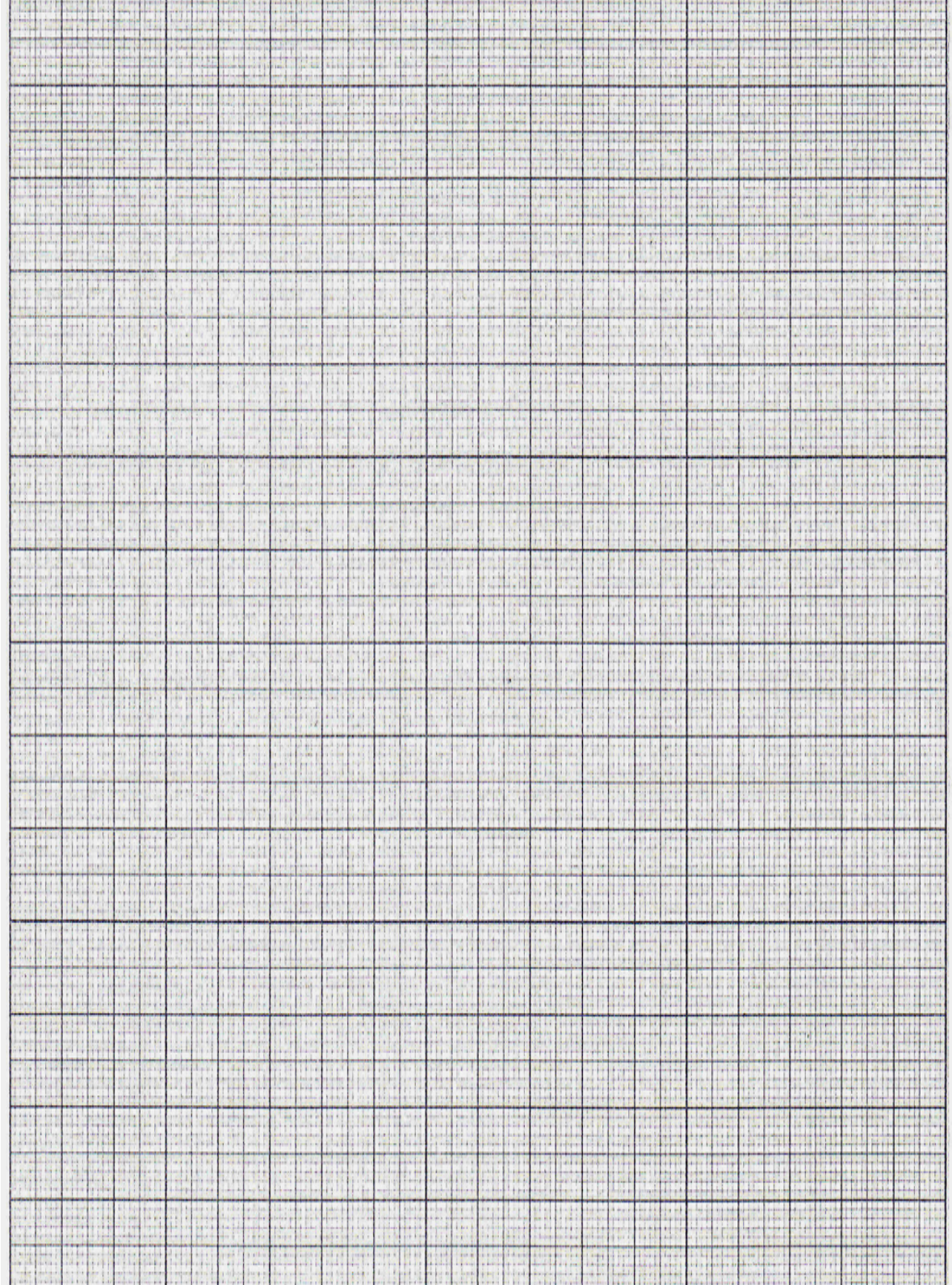
Σε ένα διάγραμμα (3B) βάλτε στον ψ άξονα την αρχική ταχύτητα V_o (σε $\mu\text{M}/\text{min}$) και στον χ άξονα τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις του υποστρώματος (σε mM).

Διάγραμμα 3B



Σε άλλο διάγραμμα (3Γ) βάλτε στην τεταγμένη τις τιμές του αντιστρόφου κάθε ταχύτητας ($1/V$) και στην τετμημένη τις τιμές του αντιστρόφου της κάθε συγκέντρωσης ($1/[S]$) που υπολογίσατε στον Πίνακα ΠΙΒ.

Διάγραμμα 3Γ



ΑΣΚΗΣΗ 3

ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ Γ

ΠΕΙΡΑΜΑ IV:

Επίδραση συναγωνιστικού αναστολέα στην ταχύτητα της αντίδρασης

Στο πείραμα αυτό θα μελετήσετε την επίδραση των φωσφορικών ιόντων (προϊόντων της αντίδρασης που δρουν σαν συναγωνιστικός αναστολέας του ενζύμου). Η συγκέντρωση του P_i θα διατηρηθεί σταθερά ($0,001M$), ενώ θα μεταβάλλεται η συγκέντρωση του υποστρώματος.

Αριθμείστε 8 δοκιμαστικούς σωλήνες όπως στο πείραμα III στην 4^η Άσκηση και προσθέστε τις ίδιες ποσότητες αντιδραστηρίων, με τη διαφορά ότι **αντί για το ρυθμιστικό διάλυμα pH 9,5 θα χρησιμοποιήσετε Buffer που περιέχει 1,3 mM KH_2PO_4** . Εκτελείτε το πείραμα όπως προηγουμένως. Τα κινητικά δεδομένα της αντίδρασης παρουσία αναστολέα τα παρουσιάζετε στον πίνακα IV (αντίστοιχο του πίνακα III απουσία αναστολέα).

Στη αναφορά των αποτελεσμάτων: Σχεδιάστε την πρόοδο της αντίδρασης παρουσία αναστολέα (Διάγραμμα 4) και υπολογίστε την V_o (σε $\mu M/min$) που αντιστοιχεί σε κάθε συγκέντρωση υποστρώματος (μM).

Τις τιμές V_o που βρήκατε παρουσία του αναστολέα τις βάζετε σαν μια δεύτερη καμπύλη στα Διαγράμματα 3B (V_o έναντι $[S]$) και 3Γ ($1/V_o$ έναντι $1/[S]$) που ετοιμάσατε στο πείραμα III (θα έχετε δηλαδή δύο καμπύλες μία χωρίς και μία με αναστολέα). Υπολογίστε την V_{max} και K_M του ενζύμου παρουσία των φωσφορικών ιόντων. Σχολιάστε τα αποτελέσματά σας.

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΣΚΗΣΗΣ 3

ΠΕΙΡΑΜΑ IV: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΣΥΝΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΣΤΗΝ ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

Παρουσιάστε τα κινητικά αποτελέσματα της αντίδρασης που πήρατε παρουσία αναστολέα στον Πίνακα IVΑ.

Πίνακας IVΑ (παρουσία αναστολέα)

<u>Χρόνος</u> t (sec)	<u>Απορροφητικότητα στα 400nm</u>			
	σωλήνας 2	σωλήνας 4	σωλήνας 6	σωλήνας 8
30				
60				
90				
120				
150				
180				
210				
240				
270				
300				

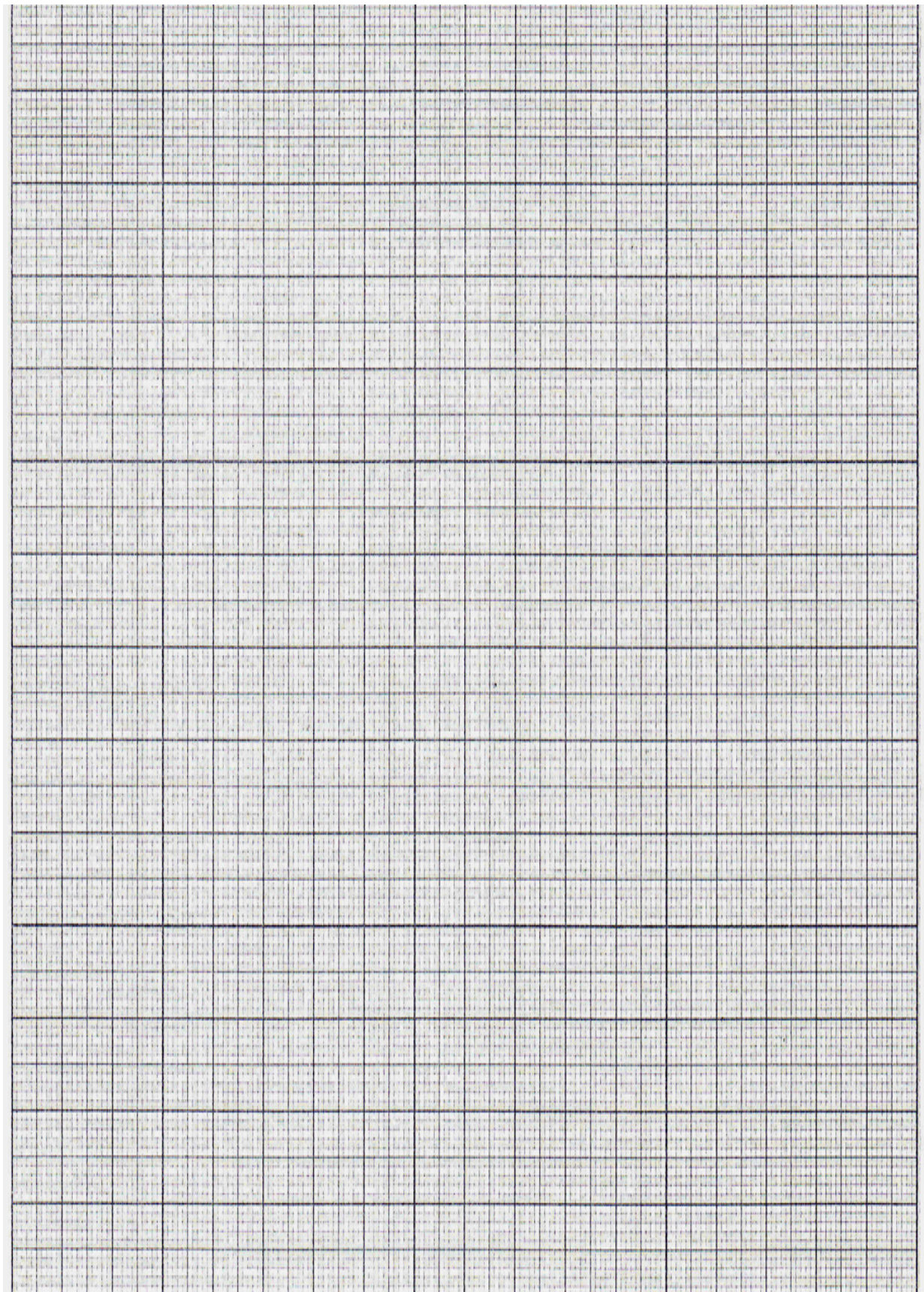
Σχεδιάστε την πρόοδο της αντίδρασης παρουσία αναστολέα (διάγραμμα 4Α) και δείξτε τη V_0 που βρήκατε παρουσία αναστολέα σε συνάρτηση του υποστρώματος στον Πίνακα IVΒ.

Διάγραμμα 4Α

A_{400}



Διάγραμμα 4Α



Πίνακας IVB (παρουσία αναστολέα)

<u>Αριθμός</u> σωλήνα	<u>Τελική</u> <u>συκέντ.</u> Υποστρώμ. (mM)	Αρχική ταχύτητα V_o		$\frac{1}{V_o}$	$\frac{1}{[S]}$
		A400/min	$\mu\text{M}/\text{min}$		
2					
4					
6					
8					

Στο διάγραμμα 3B που φτιάξατε χωρίς αναστολέα στην 4^η Άσκηση προσθέστε τα αποτελέσματά σας με αναστολέα (βάλτε στον ψ άξονα την αρχική ταχύτητα V_o που βρήκατε από το πείραμα IV και στον χ άξονα τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις του υποστρώματος).

Στο άλλο διάγραμμα (3Γ) βάλτε στην τεταγμένη τις τιμές του αντιστρόφου κάθε ταχύτητας ($1/V$) και στην τετμημένη τις τιμές του αντιστρόφου της κάθε συγκέντρωσης ($1/[S]$) που υπολογίσατε παρουσία αναστολέα στον Πίνακα IVB.

Υπολογίστε και για τις δύο περιπτώσεις:

Αλκαλική Φωσφατάση

Χωρίς αναστολέα

Με αναστολέα

$V_{\max}$:

$V_{\max}$:

K_m :

K_m :

Σχολιάστε τα αποτελέσματά σας.

ΑΣΚΗΣΗ 4

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

I. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΑΙΜΑΤΟΣ (Αντίδραση Drabkin)

Εισαγωγή

Η αιμοσφαιρίνη περιέχεται στα ερυθροκύτταρα και είναι ο κύριος μεταφορέας οξυγόνου στο αίμα. Αποτελείται από 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες, κάθε μία από τις οποίες φέρει από ένα μόριο αίμης. Ο σίδηρος της αίμης βρίσκεται στην Fe^{2+} μορφή και συνδέει αντιστρεπτά ένα μόριο οξυγόνου. Στις δύο ακραίες μορφές της η αιμοσφαιρίνη απαντάται σαν δεοξυαιμοσφαιρίνη (Hb), όταν δεν περιέχει κανένα μόριο O_2 , ή σαν οξυαιμοσφαιρίνη (HbO_2), όταν περιέχει τέσσερα μόρια O_2 . Το άτομο του Fe^{2+} στην δεοξυαιμοσφαιρίνη βρίσκεται σε πεντασυναρμοσμένο σύμπλοκο (κατάσταση υψηλού spin), ενώ στην οξυαιμοσφαιρίνη βρίσκεται σε εξασυναρμοσμένο σύμπλοκο (κατάσταση χαμηλού spin). Η αιμοσφαιρίνη είναι μία αλλοστερική πρωτεΐνη (παρουσιάζει την χαρακτηριστική σιγμοειδή καμπύλη αποσύνδεσης O_2 που οφείλεται στο ότι η σύνδεση κάθε μορίου οξυγόνου είναι συνεργατική) και η συγγενεία της για οξυγόνο επηρεάζεται από τις μεταβολικές συνθήκες (την συγκέντρωση H^+ , CO_2 και 2,3 BPG).

Εκτός από το οξυγόνο, σύμπλοκα συναρμογής με το Fe^{2+} της αίμης σχηματίζουν και το μονοξείδιο του άνθρακα, κυανιούχα κ.α., και επειδή τα σύμπλοκα αυτά είναι σταθερότερα, η αιμοσφαιρίνη γρήγορα χάνει την ικανότητά της να μεταφέρει οξυγόνο. Οξείδωση του σιδήρου της αίμης σε Fe^{3+} (μεθαιμοσφαιριναιμία), είτε λόγω κατάχρησης οξειδωτικών ουσιών, είτε λόγω κληρονομικών παθήσεων, οδηγεί σε απώλεια της ικανότητας της αιμοσφαιρίνης να συνδέει οξυγόνο και συνήθως χαρακτηρίζεται από κυάνωση.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης στο αίμα είναι μία από τις πιο συνήθεις κλινικές εξετάσεις. Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης μπορεί να μειωθεί σαν αποτέλεσμα αιμορραγίας, αιμόλυσης ή ελαττωματικής ερυθροποίησης ή να αυξηθεί λόγω ελαττωματικής πνευμονικής λειτουργίας ή ύπαρξης άλλων παθήσεων.

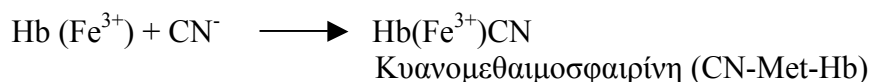
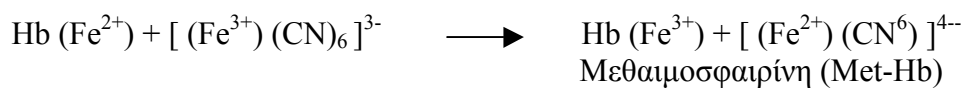
Όλες οι αιμοπρωτεΐνες, λόγω της αίμης που περιέχουν, έχουν ένα μέγιστο απορροφητικότητας στα 400-440nm (ζώνη Soret). Επιπλέον οι διάφορες μορφές αιμοσφαιρίνης παρουσιάζουν και άλλα μέγιστα στα 480-630nm (πίνακας I).

Πίνακας I

Παράγωγα αιμοσφαιρίνης	Μέγιστα απορροφήσεως (nm)
Δεοξυαιμοσφαιρίνη	428-430 — 555 — —
Οξυαιμοσφαιρίνη	412-415 — 541 576-578 —
Καρβοξυαιμοσφαιρίνη	417-418 — 537 568-572 —
Μεθαιμοσφαιρίνη (pH 7,0)	404-407 500 540 578 630
Κυανομεθαιμοσφαιρίνη	413-418 480 541 580-590 —

Έχει επικρατήσει να υπολογίζεται η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης στο αίμα φασματοφωτομετρικά μετά την μετατροπή όλων των μορφών της (οξυ-, δεοξυ-, καρβοξυ-, μεθαιμοσφαιρίνη) σε κυανομεθαιμοσφαιρίνη.

Η αρχή της μεθόδου είναι: το Fe^{2+} της αιμοσφαιρίνης οξειδώνεται από σιδηροκυανιούχο κάλιο προς Fe^{3+} της μεθαιμοσφαιρίνης, η οποία μετατρέπεται στην σταθερή ένωση της κυανομεθαιμοσφαιρίνης με την προσθήκη κυανιούχου καλίου.



Η απορροφητικότητα της κυανομεθαιμοσφαιρίνης μετριέται στα 540 nm (λ_{max}). Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης σε g/100ml υπολογίζεται από την απορροφητικότητα ενός πρότυπου δείγματος αιμοσφαιρίνης ή από την πρότυπη καμπύλη. Οι φυσιολογικές τιμές για ενήλικες είναι 14-18 g/100 ml για άνδρες και 12-16 g/100 ml για γυναίκες.

Στη σημερινή άσκηση θα υπολογίσετε τη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης σε ένα άγνωστο δείγμα και στο δικό σας αίμα.

Υλικά

Δείγμα αίματος

10ml αντιδραστήριο Drabkin

3 σωλήνες (No 2, 3, 4) που περιέχουν πρότυπα διαλύματα CN-Met-Hb σε αντιδραστήριο Drabkin: A=6g%, B=12g%, Γ=18g%

3 άδειους σωλήνες

6 άδειες πλαστικές κυψελίδες φωτόμετρου 1 ml

1 μικροπιπέτα με πλαστικές μύτες.

(Βεβαιωθείτε ότι είναι ρυθμισμένη στο σωστό όγκο και ότι γνωρίζετε τον χειρισμό της)

ΠΡΟΣΟΧΗ: Το αντιδραστήριο DRABKIN και επομένως το περιεχόμενο όλων των σωλήνων περιέχει CN^- . Χύσετε τα αντιδραστήρια στο τέλος του προσδιορισμού σε ένα ειδικό νεροχύτη όπου δεν χύνετε οξέα και όπου τρέχει συνεχώς νερό για να αποφευχθεί η δημιουργία θανατηφόρου HCN.

Τεχνική

Το δικό σας αίμα το παίρνετε ως εξής: απολυμάνετε με οινόπνευμα ένα δάκτυλό σας, πιέστε το δάκτυλο ώστε να μαζευτεί το αίμα στο άκρο, τρυπήστε με ένα ξυραφάκι, περιμένετε να σχηματισθεί μια μεγάλη σταγόνα και πάρτε προσεκτικά με την μικροπιπέτα 5 μl αίματος. Ξεπλύνετε επανειλημμένα την πιπέτα, με την οποία πάρθηκε κάθε δείγμα αίματος, με το αντιδραστήριο Drabkin.

Στους τρεις άδειους σωλήνες (No 1, 5 και 6) προσθέστε Drabkin και δείγμα αίματος σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (1=τυφλό, 2,3,4=πρότυπο, 5,6=δείγμα).

Σωλήνες

<u>Αντιδραστήρια</u>	1	2	3	4	5	6
Drabkin(περιέχει $K_3[Fe(CN)_6]$, KCN(ml)	1	-	-	-	1	1
Πρότυπο διάλυμα CN-Met-Hb A(ml)	-	1	-	-	-	-
Πρότυπο διάλυμα CN-Met-Hb B(ml)	-	-	1	-	-	-
Πρότυπο διάλυμα CN-Met-Hb Γ(ml)	-	-	-	1	-	-
Αίμα (ολικό) άγνωστο (ml)	-	-	-	-	0,005	-
Αίμα (ολικό) δικό σας (ml)	-	-	-	-	-	0,005

Αναδεύσατε τους σωλήνες και αφήστε τους σε ηρεμία για 10 min. Μεταφέρετε το περιεχόμενο στις κυψελίδες και φωτομετρήστε στα 540 nm έναντι του τυφλού.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Μη σημειώνετε τις πλαστικές κυψελίδες

II. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Εισαγωγή

Περίπου 350 μεταλλαγμένες αιμοσφαιρίνες είναι γνωστές και μερικές απ' αυτές, όπως π.χ. η HbS, είναι υπεύθυνες για σοβαρές αιμοσφαιρινοπάθειες (διαταραχές στις οποίες η παραγωγή της φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης του ενήλικα, HbA, αναστέλλεται μερικά ή ολικά, ή αντικαθίσταται από μία ή περισσότερες μη φυσιολογικές αιμοσφαιρίνες). Η ανίχνευση και η ταυτοποίηση των διαφόρων αιμοσφαιρινών έχει μεγάλη σημασία στην κλινική βιοχημεία. Η κύρια μέθοδος που χρησιμοποιείται αρχικά είναι η ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό pH, με την οποία διαχωρίζονται οι αιμοσφαιρίνες A,F,S,C, καθώς και άλλες αιμοσφαιρίνες. Υπενθυμίζεται ότι η σύσταση των φυσιολογικών αιμοσφαιρινών είναι: HbA= $\alpha_2\beta_2$, HbA₂= $\alpha_2\delta_2$, HbF= $\alpha_2\gamma_2$. Οι αλλαγές που παρατηρούνται στις συνηθέστερες μεταλλαγμένες αιμοσφαιρίνες είναι: HbS= β_6 Glu→Val, HbC= β_6 Glu→Lys, HbD(Punjab)= β_{121} Glu→Gln, HbO(Arab)= β_{121} Glu→Lys, HbE= β_{26} Glu→Lys, HbG= β_{42} Glu→Ala, HbH= β_4 , HbLepore= δ_β σύντηξη.

Στη σημερινή άσκηση θα χρησιμοποιήσετε τις γνωστές συσκευές ηλεκτροφόρησης Beckman-Paragon και τις έτοιμες πηκτές αгарόζης, με δείγματα αίματος που θα σας δοθούν. Αιωρείστε τα ερυθρά αιμοσφαίρια σε 2ml φυσιολογικού ορού και ξαναφυγοκεντρήστε. Με μια πλαστική μικροπιπέτα τοποθετείστε 15 σταγόνες του αντιδραστηρίου αιμόλυσης σ' ένα καθαρό σωληνάριο και προσθέσετε 1 σταγόνα από τα πλυμένα, φυγοκεντρημένα ερυθροκύτταρα και αναδεύσετε στο Vortex για 15 sec. Το δείγμα σας (αιμόλυμα) είναι έτοιμο!

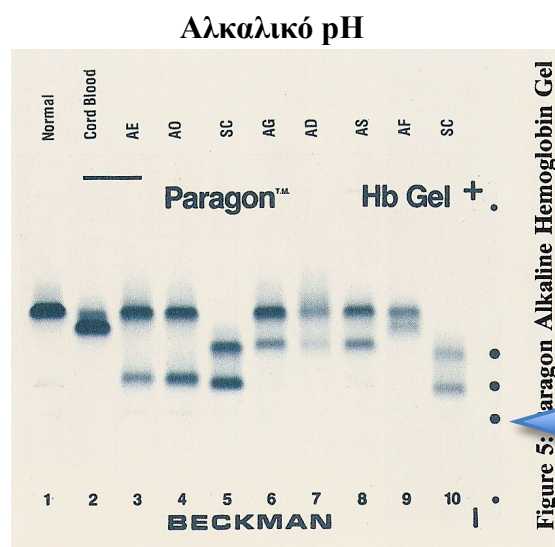
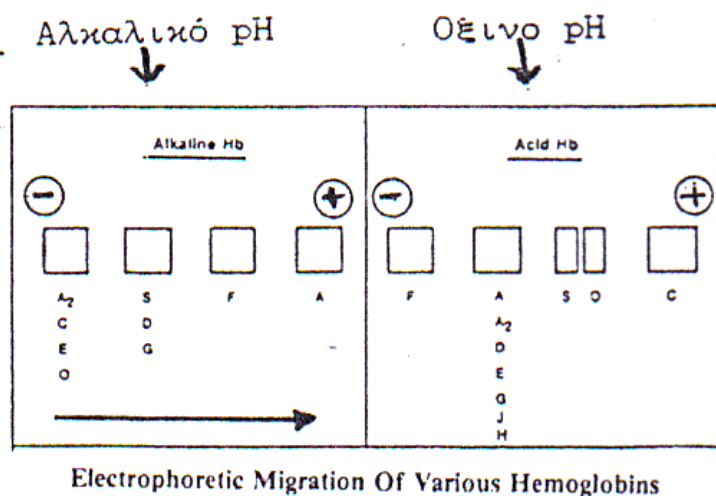
Τεχνική ηλεκτροφόρησης

- 1) Βγάλτε την πηκτή από το περιβάλλωμα της και πατήστε την ελαφρά με διηθητικό χαρτί (gel blotter).

- 2) Ευθυγραμμίστε προσεκτικά την μήτρα (sample template) με τα σημεία C της πηκτής και πατήστε ελαφρά.
- 3) Χρησιμοποιώντας κάθε φορά μια διαφορετική μύτη για την μικροπιπέτα τοποθετείστε ~ 5μl από τα διάφορα δείγματα αίματος στις εγκοπές και **αφήστε ~ 5 min για να απορροφηθούν.**
- 4) Πατήστε ελαφρά με διηθητικό χαρτί και μετά αφαιρέστε και το χαρτί και την μήτρα.
- 5) Βάλτε 45ml ρυθμιστικού διαλύματος pH=8,6 σε κάθε διαμέρισμα του μπάνιου ηλεκτροφόρησης και τοποθετείστε την πηκτή πάνω στην γέφυρα (**προσέχοντας ώστε το + άκρο της πηκτής να βρίσκεται στο + άκρο του μπάνιου**).
- 6) Ηλεκτροφορήστε στα 150 Volt για 25 min.
- 7) Αφαιρέστε την πηκτή από το μπάνιο και βάλτε την στο πλαίσιο πηκτής (gel frame).
- 8) Τοποθετείστε την πηκτή στο μονιμοποιητικό διάλυμα 1 (30% μεθανόλη - 20% οξικό) για 3-5 min.
- 9) Στεγνώστε την πηκτή στο στεγνωτήρα (gel drier) για ~ 15 min.
- 10) Τοποθετείστε την πηκτή στην μπλέ χρωστική (διάλυμα 2) για 3-5 min.
- 11) Τοποθετείστε την πηκτή με την σειρά στα εξής διαλύματα: διάλυμα 3 (5% οξικό) για 1-2 min, διάλυμα 4 (μεθανόλη - οξικό) για 2 min, διάλυμα 5 (5% οξικό) για 2 min.
- 12) Στεγνώστε την πηκτή (που τώρα θα πρέπει να εμφανίζει μπλέ ζώνες σε ένα διαυγές υπόστρωμα) στο στεγνωτήρα για ~5-10 min.

Ερμηνεύστε τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό αιμοσφαιρινών που πήρατε σύμφωνα με τα κάτωθι πρότυπα:

Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός αιμοσφαιρινών σε:



Θέση εναπόθεσης δειγμάτων

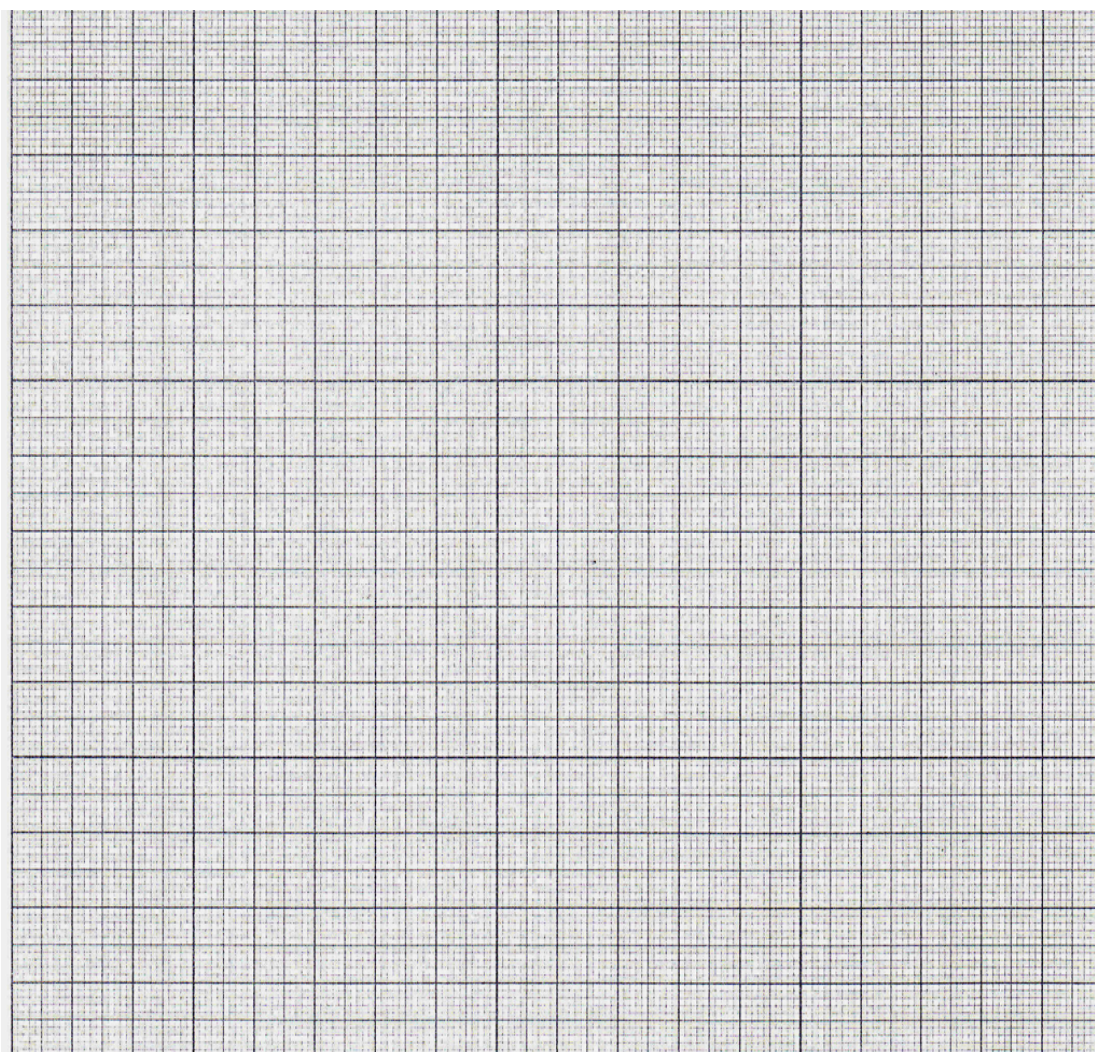
ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΣΚΗΣΗΣ 4

I. Προσδιορισμός Hb Αίματος

α) Πίνακας αποτελεσμάτων

Σωλήνες		
Αριθμός	Περιεχόμενο	A ₅₄₀
1		
2		
3		
4		
5		
6		

β) Πρότυπη καμπύλη CN-Met-Hb



γ) Χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη που κατασκευάσατε υπολογίστε τη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης στα άγνωστα δείγματα αίματος:

Σωλήνας 5

Σωλήνας 6

δ) Σχολιάστε τα αποτελέσματά σας.

II. Ηλεκτροφορητικός Διαχωρισμός Αιμοσφαιρινών

α) Επισυνάψτε το ηλεκτροφόρημα που πήρατε ή μια φωτοτυπία σημειώνοντας την αιμοσφαιρίνη που αντιστοιχεί σε κάθε ζώνη.

β) Αναφέρατε το είδος και την ένταση των ζωνών που παρατηρείτε σε κάθε δείγμα και ερμηνεύστε τα ευρήματά σας.

Δείγμα	Ζώνες	Ερμηνεία
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

γ) Σχολιάστε τα αποτελέσματά σας.

ΑΣΚΗΣΗ 5

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ

Εισαγωγή

Τα λιπίδια είναι μία χημικά ανομοιογενής τάξη μορίων που παραλαμβάνονται από βιολογικές πηγές με οργανικούς διαλύτες όπως ο αιθέρας ή το χλωροφόρμιο. Ο καλύτερος διαλύτης για την παραλαβή όλων των λιπιδίων (ουδέτερων και πολικών) είναι μείγμα χλωροφορμίου - μεθανόλης.

Οι κυριότερες κατηγορίες των βιολογικά σημαντικών λιπιδίων είναι:

- Λιπαρά οξέα.
- Λιπίδια που περιέχουν γλυκερόλη (π.χ. τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια, πλασμαλογόνα).
- Λιπίδια που περιέχουν σφιγγοσίνη (π.χ. κεραμίδια, σφιγγομυελίνες, κερεβροσίτες, γαγγλιοσίτες).
- Τερπένια - στεροειδή (π.χ. χοληστερόλη, χολικά οξέα, στεροειδείς ορμόνες).
- Παράγωγα λιπαρών οξέων (προσταγλανδίνες - λευκοτριένια - θρομβοξάνες).
- Σύνθετα λιπίδια (π.χ. λιποπρωτεΐνες, πρωτεολιπίδια, λιποπολυσακχαρίτες).

Τα λιπίδια χρησιμεύουν κυρίως για την αποθήκευση και μεταφορά μεταβολικής ενέργειας ή αποτελούν συστατικά μεμβρανών, αλλά μερικά έχουν δράση ορμονών ή βιταμινών.

Ανάλογα με τα **χαρακτηριστικά διαλυτότητας** που εμφανίζουν τα διάφορα λιπίδια διαχωρίζονται σε ουδέτερα (τριγλυκερίδια, χοληστερόλη και εστέρες χοληστερόλης, λιπαρά οξέα) ή πολικά (φωσφολιπίδια, σφιγγολιπίδια, σύνθετα λιπίδια). Επειδή τα λιπίδια είναι σχεδόν αδιάλυτα σε υδατικό διάλυμα για να κυκλοφορήσουν στο αίμα συνδέονται με ειδικές πρωτεΐνες - φορείς σχηματίζοντας λιποπρωτεΐνες. Οι **λιποπρωτεΐνες** επομένως συνιστούν τις **υδατοδιαλυτές μορφές των λιπιδίων στο πλάσμα** και αποτελούν μοριακά συμπλέγματα μεταξύ των κύριων λιπιδίων (τριγλυκερίδια, χοληστερόλη, εστέρες χοληστερόλης, φωσφολιπίδια) και διαφόρων αποπρωτεϊνών (Apo A, B, C, D, E).

Οι λιποπρωτεΐνες διαφέρουν στο μοριακό βάρος, σύσταση σε λιπίδια και πρωτεΐνες, τόπο παραγωγής, ρόλο στον μεταβολισμό κ.α. Οι δύο κύριοι τρόποι ταξινομήσεώς τους βασίζονται στις φυσικοχημικές ιδιότητες που εμφανίζουν με την χρήση των τεχνικών της υπερφυγοκέντρωσης και ηλεκτροφόρησης.

Με την **υπερφυγοκέντρωση** ο διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών γίνεται με βάση την υδατική τους πυκνότητα (d σε g/ml), που εξαρτάται από το ποσοστό και το είδος των λιπιδίων που περιέχουν και έτσι, κάτω από την επίδραση της βαρύτητας, λαμβάνονται τα εξής επιμέρους κλάσματα:

- 1) Χυλομικρά: d μέχρι 0,94 g/ml
- 2) VLDL (Very low density lipoproteins = λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας): d μέχρι 1,006 g/ml
- 3) LDL (Low density lipoproteins = λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας): d μέχρι 1,063 g/ml
- 4) HDL (High density lipoproteins = λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας): d μέχρι 1,21 g/ml

Με την **ηλεκτροφόρηση** (σε οξική κυτταρίνη, πηκτή ακρυλαμίδιου ή αγαρόζης) ο διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών γίνεται με βάση την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα προς την άνοδο που εξαρτάται από το καθαρό αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο που φέρουν οι αποπρωτεΐνες που περιέχουν, οι οποίες ανήκουν στις τάξεις των α -και β -σφαιρινών του

ορού. Έτσι λαμβάνονται τα εξής κλάσματα (με την σειρά αυξανόμενης κινητικότητας προς την άνοδο):

- 1) Χυλομικρά (ηλεκτρικά ουδέτερα) - μένουν στο σημείο εναπόθεσης
- 2) β-λιποπρωτεΐνες (κυρίως LDL)
- 3) προ-β-λιποπρωτεΐνες (κυρίως VLDL)
- 4) α-λιποπρωτεΐνες (κυρίως HDL)

Η λευκοματίνη (αλβουμίνη), που εμφανίζει την μεγαλύτερη κινητικότητα προς την άνοδο, μεταφέρει τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στο πλάσμα.

Η σύσταση των διαφόρων λιποπρωτεϊνών που βρίσκονται στο πλάσμα του ανθρώπου δίνεται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Ιδιότητες και σύσταση των διαφόρων τάξεων λιποπρωτεϊνών

Κλάσμα	Χυλομικρά	Λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας	Λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας	Λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας
Σύντμηση	—	VLDL	LDL	HDL
Πυκνότητα	0,94	0,94 – 1,006	1,006 – 1,063	1,063 – 1,21
Ηλεκτροφορητική πορεία	αρχή	Προ-β	β	α ₁
Μοριακό βάρος (10 ⁶)	10 ³ - 10 ⁴	5 - 27	4	0,2
Μέγεθος (Α)	500.000	550	200	100
Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη	1 – 2%	8 – 10%	20 – 25%	40 – 55%
Κύριες αποπρωτεΐνες	C, B-48	C, B-100	B-100	AI , AII
Δευτερεύουσες αποπρωτεΐνες	AI , AII	AI , E	C , E	B , C , E
Τριγλυκερίδια	86 – 95%	45 – 65%	4 – 8%	2 – 7%
Φωσfolιπίδια	2 – 7%	15 – 20%	18 – 24%	26 – 32%
Εστέρες χοληστερόλης	2 – 4%	16 – 22%	45 – 50%	15 – 20%
Ελεύθερη χοληστερόλη	1 – 3%	4 – 8%	6 – 8%	3 – 5%

Από Βιοχημεία P.Karlson (1984), Εκδόσεις Λίτσα

Πολλές παθολογικές καταστάσεις οδηγούν σε ποσοτική και ποιοτική μεταβολή των λιπιδίων του αίματος (συνήθως σε δυσλιπιδαιμία που οφείλεται σε αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων ή και χοληστερόλης) και κατά συνέπεια, σε μεταβολές των λιποπρωτεϊνών (συνήθως σε διάφορες υπερλιποπρωτεϊναιμίες). Με βάση το ποσό των τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης, τα ηλεκτροφορητικά διαγράμματα των λιποπρωτεϊνών και άλλες παραμέτρους, ο Fredrickson πρότεινε την κατάταξη των διαφόρων υπερλιποπρωτεϊναιμιών σε πέντε τύπους (I-V) και η ταξινόμηση αυτή υιοθετήθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (πίνακας 2).

Πίνακας 2. Ταξινόμηση των δισλιποπρωτεϊναιμιών κατά Fredrickson (Π.Ο.Υ.)

Τύπος	Χοληστερόλη	Τριγλυκερίδια	Ορός μετά 12ωρο	Ηλεκτροφόρηση
Φυσιολογικό	<200 mg%	<150 mg%	Διαυγής	
I	<250 mg%	>1000 mg%	Γαλακτώδης, επιπλέουσα κρεμώδης στιβάδα	Χυλομικρά ↑↑↑, β, προ-β, α Φ ή ↑
IIa	>300 mg%	<150 mg%	Διαυγής	β ↑↑↑, προ-β Φ
IIb	>300 mg%	150-300 mg%	Διαυγής ή θολερός	β ↑↑, προ-β ↑
III	350-500 mg%	350-500mg%	Θολερός, λεπτή κρεμώδης στιβάδα	Ευρεία β ζώνη, (β-VLDL), προ-β Φ ή ↑, α ↑
IV	<250 mg%	200-1000 mg%	Θολερός έως γαλακτώδης	Προ-β ↑↑↑, α ↑
V	>300 mg%	>1000 mg%	Γαλακτώδης, επιπλέουσα κρεμώδης στιβάδα	Χυλομικρά ↑↑, προ-β ↑↑, α ↑

Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ ορισμένων υπερλιποπρωτεϊναιμιών (ιδιαίτερα των λιποπρωτεϊνικών φαινότυπων IIa, IIb και IV) και καρδιαγγειακών παθήσεων. Ειδικότερα έχει βρεθεί ότι αυξημένα επίπεδα LDL και, σε μικρότερο βαθμό, VLDL επιταχύνουν την αθηροσκλήρωση, ενώ αυξημένα επίπεδα HDL έχουν αντιαθηρογόνο δράση.

Ο προσδιορισμός των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος αποτελεί σήμερα μια σπουδαία εργαστηριακή εξέταση, που χρησιμοποιείται για διαγνωστικούς και προληπτικούς σκοπούς. Κάθε είδους υπερλιποπρωτεϊναιμία επιβάλλεται να διερευνάται για να διαπιστωθεί αν είναι πρωτοπαθής (έχει γενετικά αίτια) ή δευτεροπαθής (είναι το αποτέλεσμα άλλων νοσημάτων, όπως νεφρικές ή ηπατικές παθήσεις, υποθυρεοειδισμός, ερυθματώδης λύκος κ.α.) Επιπλέον η αξιολόγηση του υπερλιποπρωτεϊνικού φαινότυπου είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην αναγνώριση ατόμων που είναι πιθανόν να αναπτύξουν αθηροσκλήρωση ή στεφανιαία νόσο.

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν σήμερα τα συχνότερα μεταβολικά νοσήματα των βιομηχανοποιημένων κοινωνιών. Η αθηρωμάτωση είναι πολυπαραγοντική νόσος και οι παράγοντες κινδύνου που ενέχονται στην εξάπλωσή της διακρίνονται σε αυτούς που δεν μπορούμε να αλλάξουμε (κληρονομικοί παράγοντες, το άρρεν φύλο, η μεγάλη ηλικία) και σε αυτούς που μπορούμε να ελέγχουμε (η υπερχοληστερολαιμία, η υπέρταση, το κάπνισμα, ο σακχαρώδης διαβήτης, η παχυσαρκία, η διατροφή, το στρες και η έλλειψη σωματικής άσκησης).

Εργαστηριακό μέρος

Στη σημερινή άσκηση θα προσδιορίσουμε τα τριγλυκερίδια και την ολική, LDL και HDL, χοληστερόλη δειγμάτων ορού αίματος. Χρησιμοποιούμε ορό ή πλάσμα νηστικού ατόμου που έχει ληφθεί με αντιπηκτικό EDTA και που έχει φυλαχτεί στους 4°C μέχρι 3 μέρες ή στους -20°C μέχρι 4 μήνες. Για κάθε δείγμα ορού που θα εξετάσετε υπολογίστε την συγκέντρωση τριγλυκεριδίων, ολικής χοληστερόλης και χοληστερόλης που βρίσκεται σε HDL και LDL λιποπρωτεΐνες.

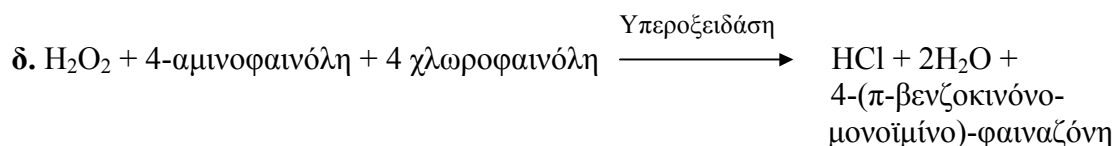
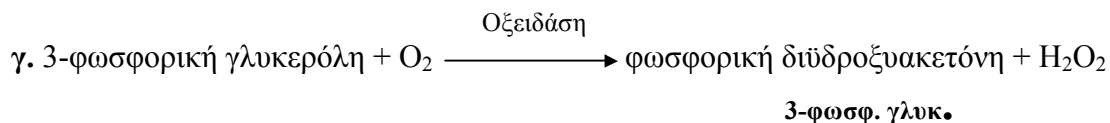
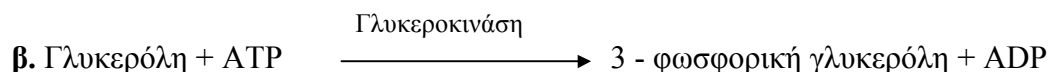
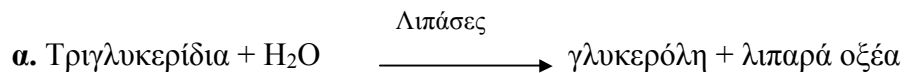
1. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ

Οι χημικές μέθοδοι προσδιορισμού των τριγλυκεριδίων στον ορό βασίζονται στην εκλεκτική εκχύλισή τους από ισοπροπανόλη, παρουσία κατάλληλου προσροφητικού, στην αλκαλική υδρόλυσή τους, στην οξείδωση της γλυκερόλης που παράγεται σε φορμαλδεΰδη και τέλος στην δημιουργία ενός παραγώγου συμπυκνώσεως που μετριέται χρωματομετρικά.

Εμείς θα χρησιμοποιήσουμε μια απλούστερη και πιο ειδική ενζυμική μέθοδο, που έχει επικρατήσει στους κλινικούς προσδιορισμούς.

Αρχή της ενζυμικής μεθόδου

Τα τριγλυκερίδια προσδιορίζονται μετά από ενζυμική υδρόλυση με λιπάσες. Η γλυκερόλη που ελευθερώνεται μετατρέπεται, με δύο συζευγμένες ενζυμικές αντιδράσεις, σε φωσφορική διϋδροξυακετόνη παράγοντας υπεροξειδίο του υδρογόνου. Από το υπεροξείδιο του υδρογόνου και 4-αμινοφαιναζόνη, παρουσία 4-χλωροφαινόλης και υπεροξειδάσης, σχηματίζεται ένα κόκκινο παράγωγο που απορροφά φως στα 510nm. Οι αντιδράσεις είναι οι ακόλουθες:



Τεχνική

Σε 4 σωλήνες φωτομέτρου βάζουμε τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

Αντιδραστήριο	σωλήνας	σωλήνας	σωλήνας
	1	2	3 , 4
	(Τυφλό)	(Πρότυπο)	(Δείγμα)
A. Απεσταγμένο H ₂ O	30μl	--	--
B. Πρότυπο διάλυμα τριγλυκεριδίων (200mg/dl)	--	30μl	--
Γ. Ορός αίματος (διαφορετικό δείγμα σε κάθε σωλήνα 3,4)	--	--	30μl
Δ. Ένζυμα Τριγλυκεριδίων (λιπάση, γλυκεροκινάση, κλπ, σε ρυθμιστικό διάλυμα)	1,5ml	1,5ml	1,5ml

Αναδεύουμε και επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

	1	2	3 , 4
E. Σταθεροποιητικό διάλυμα	1,5ml	1,5ml	1,5ml

Ανακινούμε τους σωλήνες και φωτομετρούμε. Μετράμε την απορροφητικότητα στα 510nm των δειγμάτων ορού (A δείγμα) και του πρότυπου (A πρότυπο) χρησιμοποιώντας τον σωλήνα 1 σαν τυφλό.

Υπολογισμός

Συγκέντρωση τριγλυκεριδίων στο δείγμα ορού.

$$\frac{\text{A δείγμα}}{\text{A πρότυπο}} \times 200 = \text{mg/dl}$$

Φυσιολογικές τιμές: 40-150 mg/dl

Οριακές τιμές: έως 200mg/dl

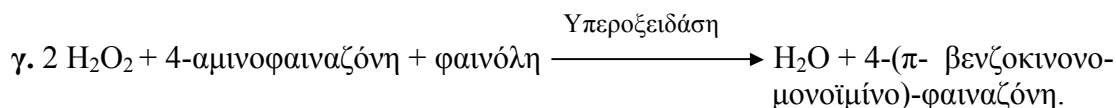
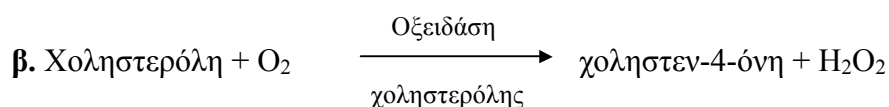
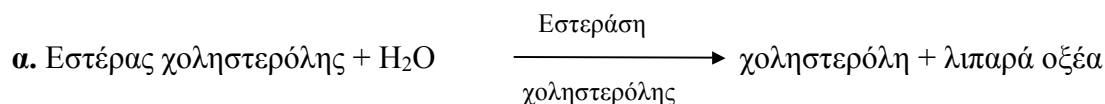
2. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

Η χοληστερόλη του αίματος απαντάται σε δύο μορφές: Σαν ελεύθερη χοληστερόλη και σαν εστεροποιημένη με διάφορα λιπαρά οξέα (65-75% ολικής χοληστερόλης). Οι μέθοδοι προσδιορισμού της χοληστερόλης διακρίνονται σε χημικές και ενζυμικές. Η πιο γνωστή χημική αντίδραση είναι η Lieberman-Burchard, στην οποία η χοληστερόλη αφυδατώνεται με οξικό οξύ και οξικό ανυδρίτη και μετά οξειδώνεται με πυκνόθειϊκό οξύ σε πράσινο προϊόν.

Οι ενζυμικές μέθοδοι, που τείνουν να αντικαταστήσουν τις χημικές, έχουν ένα κοινό στάδιο όπου οι εστέρες της χοληστερόλης υδρολύονται ενζυμικά, η χοληστερόλη οξειδώνεται, και το H_2O_2 που παράγεται οξειδώνει ουσίες προς έγχρωμα προϊόντα που μετριοούνται χρωματομετρικά.

Αρχή της ενζυμικής μεθόδου

Η χοληστερόλη (ελεύθερη ή αφού απελευθερωθεί με ενζυμική υδρόλυση από τους εστέρες της) οξειδώνεται ενζυμικά παράγοντας υπεροξειδίο του υδρογόνου, από το οποίο σχηματίζεται τελικά ένα προϊόν που απορροφά φως στα 510nm. Οι αντιδράσεις είναι οι ακόλουθες:



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ HDL-C

Για να προσδιορίσουμε την χοληστερόλη που βρίσκεται στη λιποπρωτεΐνη HDL χρησιμοποιούμε ένα αντιδραστήριο σύστημα κατακρήμνισης, που περιέχει οξύ ή πολυανιόντα και μεταλλικά ιόντα και που σχηματίζει αδιάλυτο σύμπλεγμα με όλες τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος εκτός από την HDL.

Μετά την φυγοκέντρωση η HDL παραμένει στο υπερκείμενο και η χοληστερόλη που περιέχει προσδιορίζεται με την μέθοδο που χρησιμοποιήσαμε για την ολική χοληστερόλη.

Τεχνική απομόνωσης HDL

Σε δύο (2) σωληνάρια φυγοκέντρου τοποθετείστε 0,5ml από το κάθε δείγμα ορού και 1,0ml αντιδραστήριο κατακρήμνισης (0,55mM φωσφοβολφραμικό οξύ και 25mM χλωριούχο μαγνήσιο) και αφήστε σε θερμοκρασία δωματίου 10 min. Φυγοκεντρήστε για 10 min σε 4000 rpm. Παραλάβετε από το καθαρό υπερκείμενο 30μl και προσδιορίστε την περιεκτικότητά του σε χοληστερόλη.

Τεχνική προσδιορισμού ολικής και HDL χοληστερόλης (TC και HDL-C)

Σε 6 σωλήνες φωτομέτρου βάζουμε τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

Αντιδραστήριο	σωλήνας	σωλήνας	σωλήνας	σωλήνας
	1	2	3 , 4	5 , 6
	(Τυφλό)	(Πρότυπο)	(ορός 1 & 2)	(Υπερκείμ. 1 & 2)
A. Απεσταγμένο H ₂ O	30μl	--	--	--
B.Πρότυπο διάλυμα χοληστερόλης (200mg/dl)	--	30μl	--	--
Γ. Ορός αίματος (διαφορετικό σε κάθε σωλήνα 3,4)	--	--	30μl	--
Δ. Υπερκείμενο φυγοκέντρωσης ορού (σωλήνες 5 , 6 αντίστοιχα)	--	--	--	30μl
E. Ενζυμα προσδιορισμού χοληστερόλης (εστεράση, οξειδάση, κλπ σε ρυθμιστικό διάλυμα)	3ml	3ml	3ml	3ml

Ανακινούμε τους σωλήνες και επωάζουμε για 15 λεπτά στους 25°C ή 10 λεπτά στους 37°C. Μετράμε την απορροφητικότητα στα 510nm των δειγμάτων ορού (Α δείγμα) και του πρότυπου (Α πρότυπο) χρησιμοποιώντας τον σωλήνα 1 σαν τυφλό.

Υπολογισμός

Συγκέντρωση χοληστερόλης στο δείγμα.

$$\frac{\text{Α δείγμα}}{\text{Α πρότυπο}} \times 200 = \text{mg/dl}$$

Φυσιολογικές τιμές ολικής χοληστερόλης (TC): 125-200mg/dl

Οριακές τιμές: έως 240 mg/dl

(Οι τιμές διαφέρουν ανάλογα με την ηλικία, το φύλο και την κατάσταση καρδιαγγειακής υγείας του ατόμου).

Φυσιολογικές τιμές HDL-C: 30-75mg/dl

(Οι τιμές διαφέρουν ανάλογα με την ηλικία, το φύλο και την κατάσταση καρδιαγγειακής υγείας του ατόμου).

(Προσοχή, για τον υπολογισμό της HDL-C λάβετε υπ' όψη σας την αραίωση του ορού κατά την κατακρήμνιση).

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ LDL-C

Ο υπολογισμός της χοληστερόλης που περιέχεται στην LDL γίνεται έμμεσα με τον τύπο του Friedwald.

$$\text{LDL-C} = \text{Ολική χοληστερόλη (TC)} - \left(\frac{\text{Τριγλυκερίδια}}{5} + \text{HDL-C} \right)$$

Ο τύπος αυτός βασίζεται στην υπόθεση ότι η συγκέντρωση της χοληστερόλης στην VLDL σε νηστικό άτομο ισούται με το 1/5 της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων. (Ότι δηλαδή, όταν δεν υπάρχουν χυλομικρά τα μόνα τριγλυκερίδια που βρίσκονται στον ορό οφείλονται στην VLDL και ότι η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων στην VLDL είναι πενταπλάσια αυτής της χοληστερόλης).

Φυσιολογικές τιμές LDL-C: < 130 mg/dl

Οριακές τιμές: <160mg/dl

(Οι τιμές διαφέρουν ανάλογα με την ηλικία, το φύλο και την κατάσταση καρδιαγγειακής υγείας του ατόμου).

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Αθηροσκλήρωσης:

Διαταραχή Λιπιδίων

- | | |
|---|-------------------------------|
| 1. Χοληστερόλη <200 mg/dl
Τριγλυκερίδια <200 mg/dl | Όχι |
| 2. Χοληστερόλη 200-300 mg/dl | Ναι,
αν HDL-C
<35 mg/dl |
| 3. Χοληστερόλη >300 mg/dl
Τριγλυκερίδια >200 mg/dl | Ναι |

Σημείωση

Γενικά οι συνιστώμενες φυσιολογικές τιμές TC και LDL-C όλο και μειώνονται τα τελευταία χρόνια. Επιπλέον, ο κλινικός ιατρός λαμβάνει και διάφορες άλλες παραμέτρους υπ' όψιν πριν αποφανθεί για τις επιθυμητές τιμές λιπιδίων του συγκεκριμένου ατόμου.

Παρουσίαση αποτελεσμάτων

Καταγράψτε σε έναν πίνακα τη συγκέντρωση τριγλυκεριδίων, TC, HDL-C,

LDL-C, καθώς και τον λόγο $\frac{\text{TC}}{\text{HDL-C}}$ και $\frac{\text{LDL-C}}{\text{HDL-C}}$ κάθε δείγματος ορού που χρησιμοποιήσατε.

(Τα κλάσματα αυτά λέγονται αθηρωματικοί δείκτες και οι επιθυμητές τιμές τους είναι <5 και <4 αντίστοιχα). Σχολιάστε τα αποτελέσματά σας.

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΣΚΗΣΗΣ 5

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ

1. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ

	A ₅₁₀	Συγκέντρωση Τριγλυκεριδίων mg/dl
Πρότυπο		
Δείγμα ορού 1		
Δείγμα ορού 2		

ΣΧΟΛΙΑ: α) για το πείραμά σας

β) για τις τιμές που πήρατε για κάθε ορό

2. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

	A ₅₁₀	Συγκέντρωση Χοληστερόλης mg/dl
Πρότυπο		
<u>TC</u>		
Δείγμα ορού 1		
Δείγμα ορού 2		
<u>HDL-C</u>		
Υπερκείμ. Φυγοκ. 1		
Υπερκείμ. Φυγοκ. 2		

ΣΧΟΛΙΑ: α) για το πείραμά σας
β) για τις τιμές που πήρατε για κάθε ορό

3. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ LDL-C

Τύπος:

Ορός 1:

Ορός 2:

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

	Ολικά Τριγλυκε- ρίδια	TC	HDL-C	LDL-C	TC / HDL-C	LDL-C / HDL-C
Ορός 1						
Ορός 2						

ΣΧΟΛΙΑ συνολικά για τις τιμές που πήρατε για κάθε ορό:

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στην συγγραφή των εργαστηριακών ασκήσεων μας βοήθησε η πρόσβαση σε παρόμοιες ασκήσεις των κάτωθι εργαστηρίων, τους διευθυντές των οποίων και ευχαριστούμε.

Εργ. Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής,
Αριστ. Παν. Θεσσαλονίκης (Καθ. Α. Τρακατέλλης)

Εργ. Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής,
Παν. Ιωαννίνων (Καθ. Ο. Τσόλας)

Εργ. Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής,
Κ. Παν. Αθηνών (Δρ Θ. Κεφαλάς και Δρ Γ. Παλαιοιόγος)

Εργ. Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας,
Παν. Πατρών (Καθ. Κ. Τσίγγανος)

Dept. of Biochemistry, King's College,
University of London (Profs. H. Arnstein
M. Scrutton & B. Halliwell)