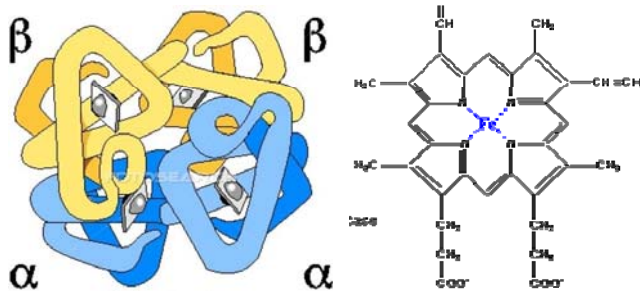


ELEKTROFOREZA HEMOGLOBINA KAPILARNOM ZONSKOM ELEKTROFOREZOM

D. Matišić

HEMOGLOBIN

je hemoprotein koji prenosi kisik - tetramerni metaloprotein koji se sastoji od dva para istih globinskih lanaca- 2 alfa i 2 beta
- sadrži četiri hema vezana su kovalentnom vezom za jedan globinski lanac
za transport kisika specijalizirali su se globini - α i β globini razvili su se prije 1/2 milijarde godina



HEMOGLOBIN

Kako se polipeptidni lanci razlikuju u svojoj građi postoje i različite vrste Hb. Tako krv zdrava odrasla čovjeka sadrži:

HbA koji se sastoji od 2 α i 2 β lanca
HbA₂ koji se sastoji od 2 α i 2 δ lanca (2,3 - 3,4%)
HbF koji se sastoji od 2 α i 2 γ lanca (0,5 - 2,0%)

Fetalna krv ima sav Hb u obliku HbF a tek u 20. tjednu fetalnog razvoja počinje se stvarati HbA čiji se udio popne do 90 % tek nakon 6 mj. života.

FETALNI HEMOGLOBIN

Fetalni hemoglobin čvršće veže kisik od hemoglobina odrasla čovjeka.

Zbog nižeg pH fetalne krvi (7,28-7,35) i potrebe za "otimanjem" kisika iz krvi majke tijekom fetalnog razvoja javlja se drugačiji Hb koji ima veći afinitet za kisik ($\zeta_2\epsilon_2$).

α_2 podjedinice progresivno zamjenjuju ζ_2

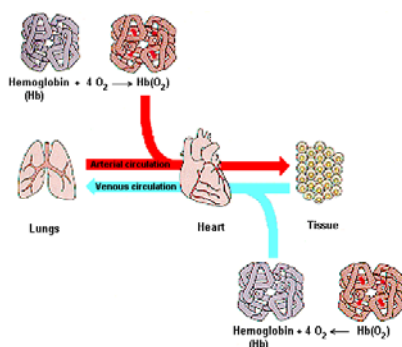
Podjedinice γ zamjenjuju ϵ_2 podjedinice.

Tako je fetalni hemoglobin predominantno $\alpha_2\gamma_2$

Približno mjesec dana prije poroda javlja se i β podjedinica koja postepeno zamjenjuje γ podjedinicu tijekom nekoliko slijedećih mjeseci.

FIZIOLOŠKA ULOGA HEMOGLOBINA

- je prvenstveno da prenosi O_2 iz pluća u tkiva, CO_2 iz tkiva u pluća kao i pufersko djelovanje u acidobaznoj ravnoteži
- topivost kisika u plazmi je svega 0,0001M dok je u punoj krvi 0,01M
- O_2 je nužan za život većine org. jer je krajnji akceptor H^+



vezanjem hemoglobina s kisikom -**oksigenacija**- nastaje **oksihemoglobin** u arterioznoj krvi Hb je 95-98% oksigeniran, a u tkivima dio disocira i otpušta kisik koji se otapa u limfi i odatle difundira u tkivo.

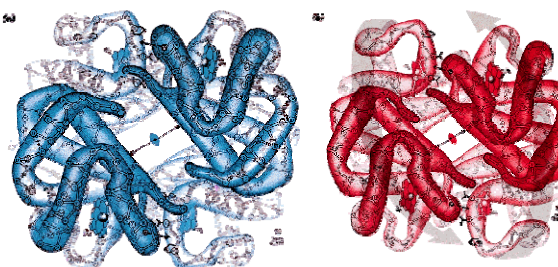
OKSIGENACIJA HEMOGLOBINA

VEZANJE KISIKA ZA Hb JE KOOPERATIVNO

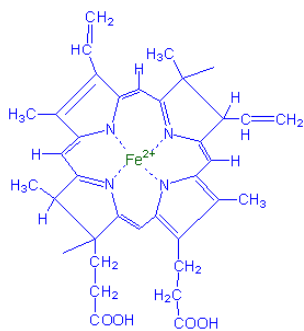
Vezanje 1 molekule O_2 potiče vezanje ostalih 3 molekula

tako je omogućen transport bitno većih količina kisika u tkiva

Pri oksigenaciji hemoglobina dolazi do konformacijske promjene



SINTEZA HEMA



Hem

Željezo koje se ugrađuje u protoporfirin potječe od transferina i feritina.

Nastao hem predstavlja prostetičnu skupinu svih hemoproteina.

Oko 90% ugrađuje se u hemoglobin a oko 10% nalazi se u mioglobinu, dok se manje od 1% nalazi u citokromima, katalazi i peroksidazi.

POREMEĆAJI SINTEZE HEMA

najčešće nastaju zbog: nemogućnosti pretvorbe piridoksina u piridoksal fosfat, nedostatka ili suviška sintetaze δ -ALK ili nedostatka sintetaze hema

Kao posljedica javljaju se:

Porfirije: nasljedne bolesti;

uzrok: deficit uroporfirinogen-kosintetaze;

posljedica: fotosenzitivitet te odlaganje uroporfirina i koproporfirina i u zubima i kostima

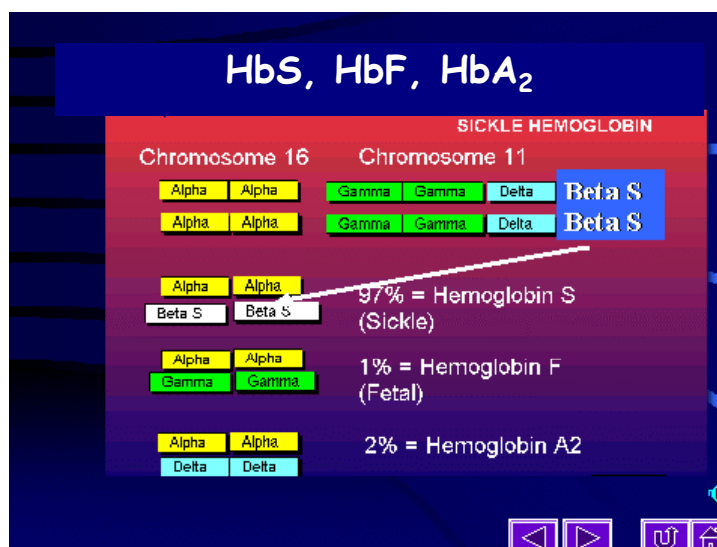
Porfirinurije: bolesti koje mogu pratiti jetrene bolesti, aplastične anemije te najčešće trovanje olovom

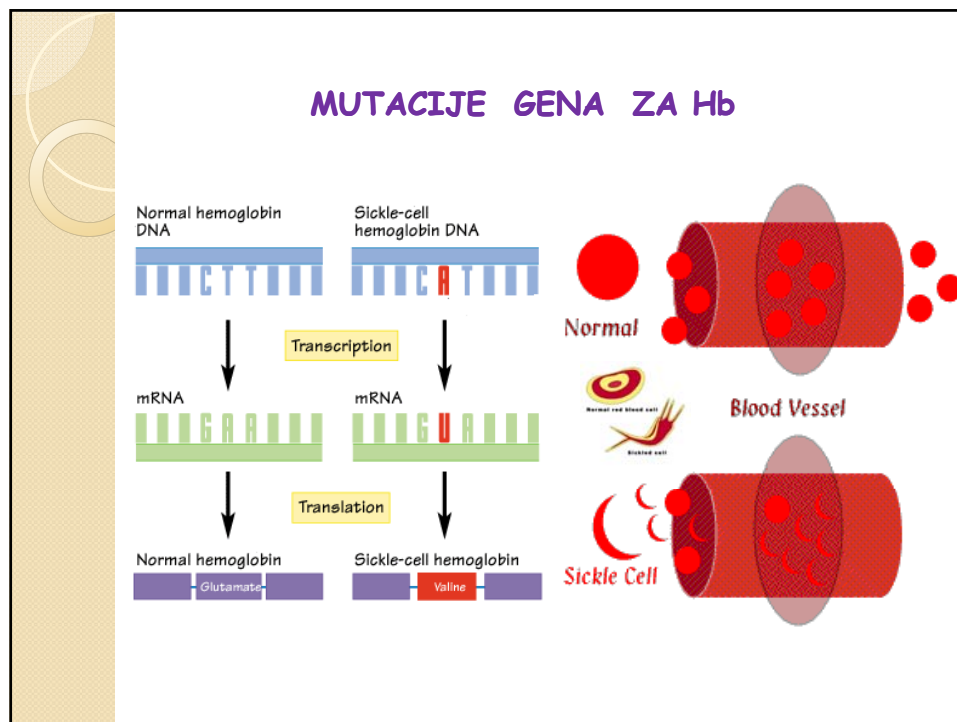
Porfirinemije: bolesti koje prati povećana koncentracija porfirina u krvi; npr. kod deficita željeza kad se iz protoporfirina ne stvara dovoljno hema

SINTEZA GLOBINA

PROTEINSKI DIO HEMOGLOBINA, GLOBIN, SINTETIZIRA SE
U STANIČNIM RIBOSOMIMA I OVISI O SEKVENCI
NUKLEOTIDA KROMOSOMSKE DNA.
AKO DOĐE DO GREŠKE U SEKVENCI, STVARA SE GLOBIN S
IZMJENJENIM SASTAVOM AMINOKISELINA ŠTO IMA ZA
POSLEDICU: HEMOGLOBINOPATIJE

MUTACIJE GENA ZA Hb





POREMEĆAJI SINTEZE GLOBINA

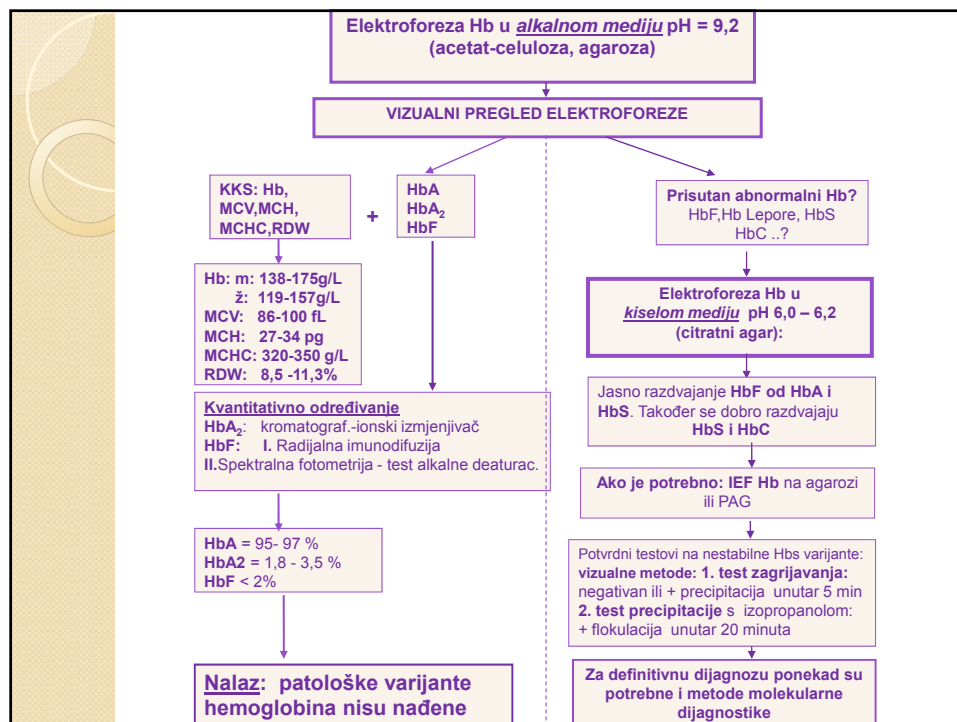
HEMOGLOBINOPATIJE se mogu podijeliti na:
KVANTITATIVNE -TALASEMIJE- s nedovoljnim stvaranjem pojedinih globinskih lanaca

I KVALITATIVNE sa stvaranjem lanaca nenormalne građe

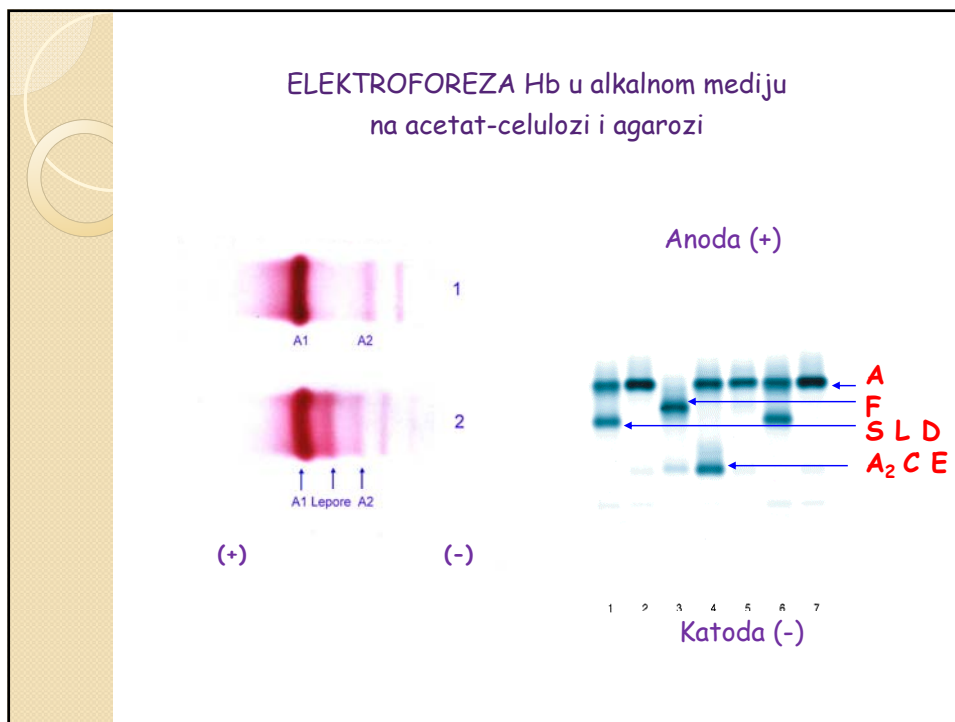
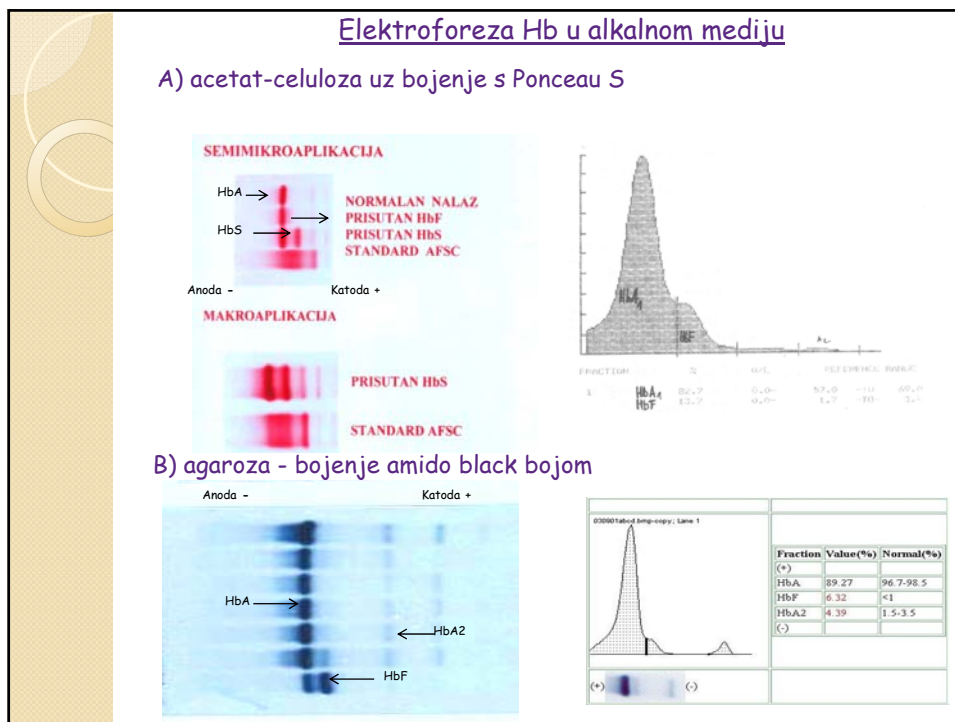
TALASEMIJE-nasljedne bolesti u kojima je zbog različitih genskih poremećaja poremećena sinteza pojedinih globinskih lanaca (nedovoljno stvaranje α -lanaca- α talasemije
nedovoljno stvaranje β -lanaca- β talasemije)

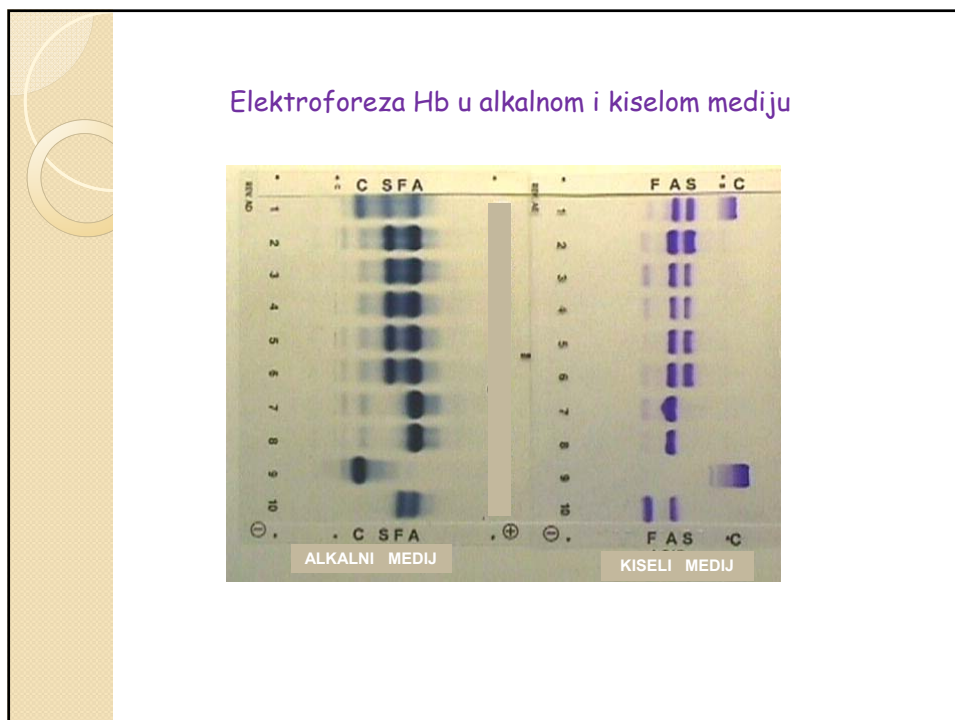
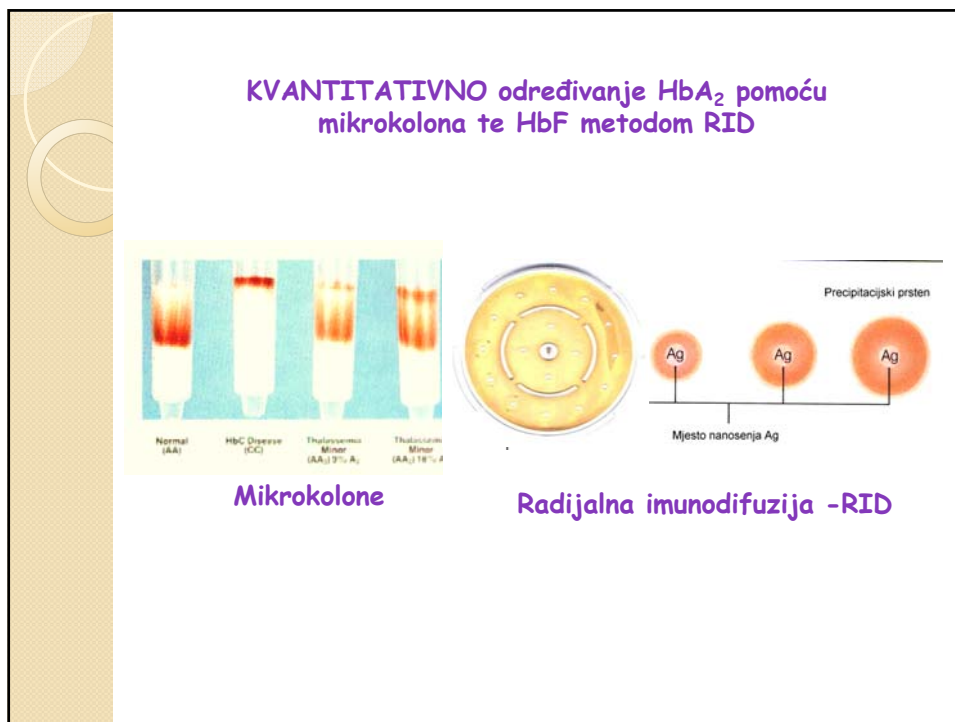
KVALITATIVNI poremećaji se javljaju kada se jedna aminokiselina zamijeni s drugom ili kada dođe do zamjene većeg dijela globinske molekule (molekularne bolesti)

POSTUPNIK LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE HEMOGLOBINOPATIJA



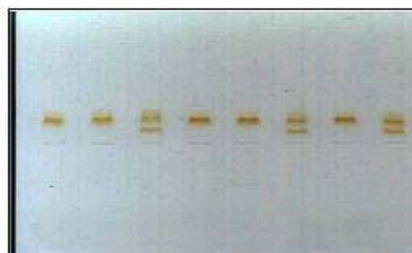
tečaj trajnog usavršavanja medicinskih biokemičara
Primjena automatiziranih elektroforetskih metoda visoke djelotvornosti u kliničkom
laboratoriju
Zagreb, 09.04.2011.





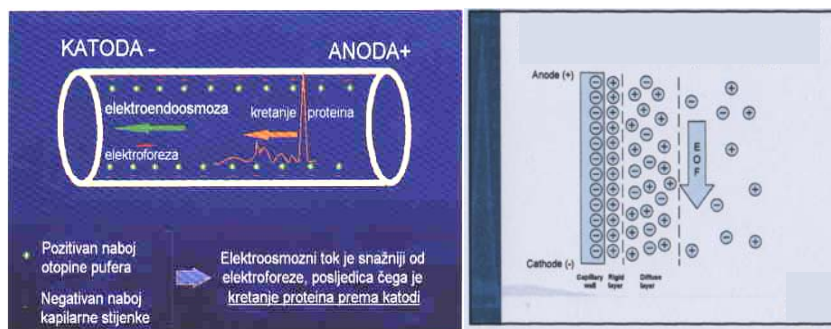
IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE Hb

U slučaju da prethodnim koracima nije moguće definirati patološki hemoglobin, potrebno je izvesti još i IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE Hb na poliakrilamidnom gelu



Izoelektrično fokusiranje Hb kod pH=6,2

KAPILARNA ZONSKA ELEKTROFOREZA



Uvedena oko 1980 god.

- elektroforeza visoke rezolucijske moći; brza izvedba laka za izvođenje; potpuno automatizirana; jeftina
- primjenjuje se za analizu velikog broja analita i to od iona do makromolekula
- brojne metode CZE su razvijene za potrebe farmacije, biologije

CZE je shematski sastavljena od **kapilare** koja se sastoji od posebno silaniziranog stakla i završava s oba kraja u kadicama s pufrom

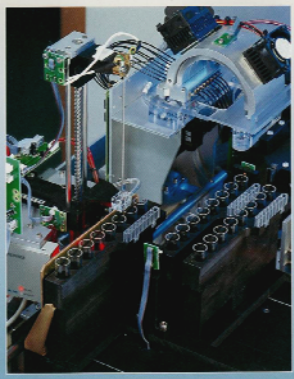
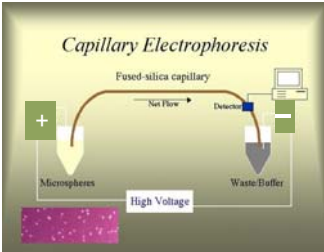
Dužina kapilara kreće se od 20 do 100 cm promjera od 15 do 75 μm

Naboj koji se dovodi na krajeve kapilara uronjenih u otopine elektrolita može se kretati do 30 kV

Vodne otopine pufra imaju precizno određeni pH i ionsku jakost te razne aditive: ciklodekstrine, surfaktante... koji pojačavaju razdvajanje uzoraka

Posebno je važna kontrola temperature

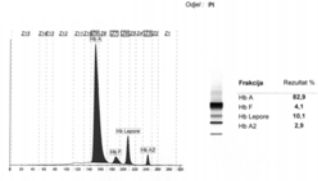
Elektroforetski razdvojene komponente detektiraju se **UV detektorima** ili fluorimetrima pozicioniranim na katodonom kraju kapilare

Kapilarna zonska elektroforeza -CZE- Hb

KLINIKI BOLNIČKI CENTAR ZAGREB
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
Laboratorij za biokemiju proteina i enzima tel: 2388 207; Predsjednik: prof. dr. sc. Jadranka Serić

Ogled: **PH**



Frakcija	Rezultat %	Ref. int. %
Hb A	82.8	
Hb F	4.1	
Hb-Lepore	10.1	
Hb A2	2.8	

Komentar: _____

Voditelj laboratorija: _____

KLINIKI BOLNIČKI CENTAR ZAGREB
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
Laboratorij za biokemiju proteina i enzima tel: 2388 207; Predsjednik: prof. dr. sc. Jadranka Serić

Ogled: **PH**



Frakcija	Rezultat %	Ref. int. %
Hb A	85.5	
Hb F	0.9	
Hb-Lepore	10.8	
Hb A2	5.1	

Komentar: _____

Voditelj laboratorija: _____

KLINIKI BOLNIČKI CENTAR ZAGREB
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
Laboratorij za biokemiju proteina i enzima tel: 2388 207; Predsjednik: prof. dr. sc. Jadranka Serić

Ogled: **PH**



Frakcija	Rezultat %	Ref. int. %
Hb A	79.4	
Hb F	0.0	
Hb-Lepore	9.9	
Hb A2	2.7	

Komentar: _____

Voditelj laboratorija: _____

KLINIKI BOLNIČKI CENTAR ZAGREB
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
Laboratorij za biokemiju proteina i enzima tel: 2388 207; Predsjednik: prof. dr. sc. Jadranka Serić

Ogled: **ZYM**

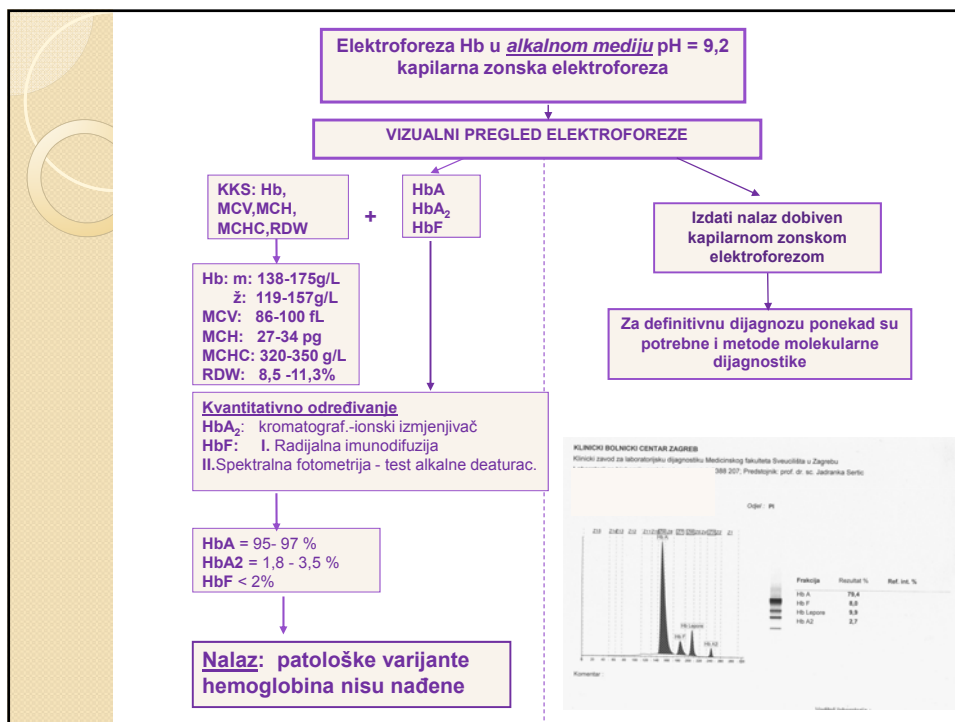
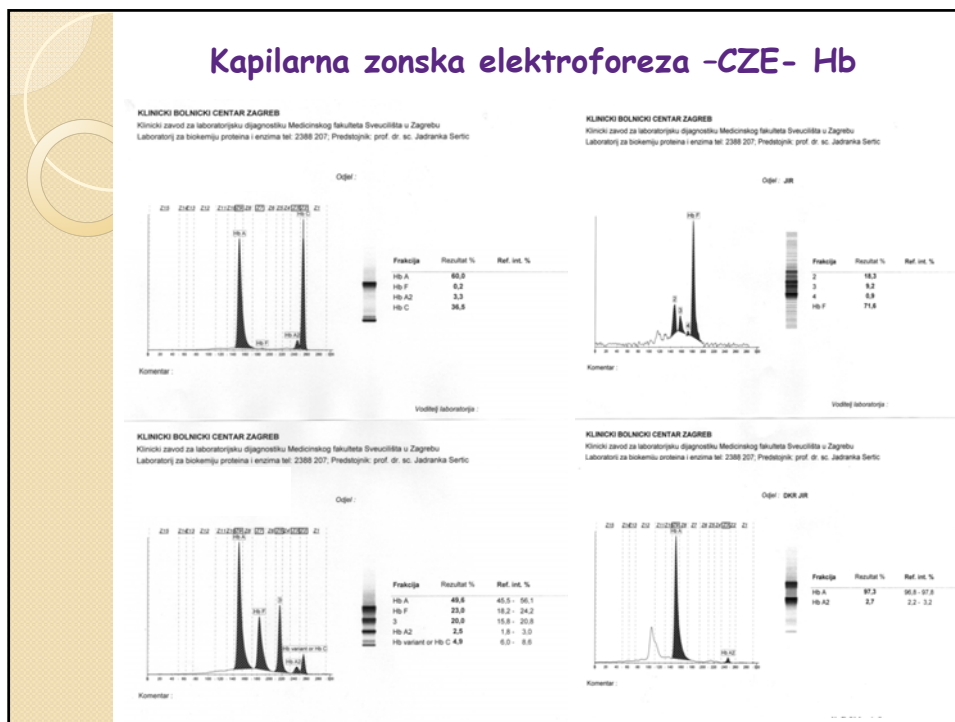


Frakcija	Rezultat %	Ref. int. %
Hb A	8.8	
Hb F	13.5	
Hb-Lepore	71.7	
Hb A2	5.2	

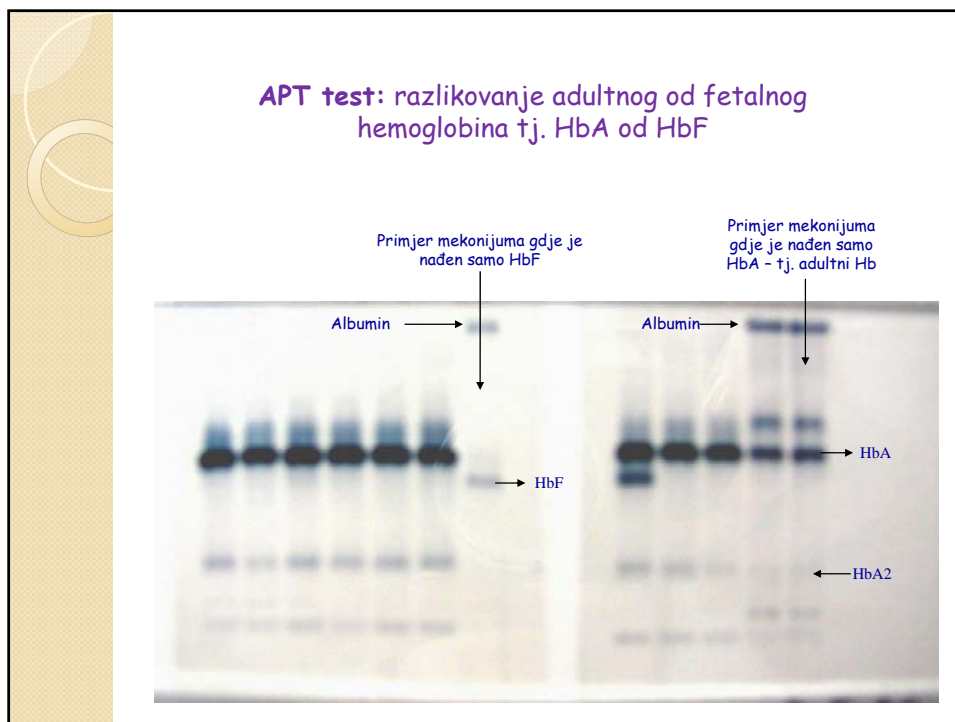
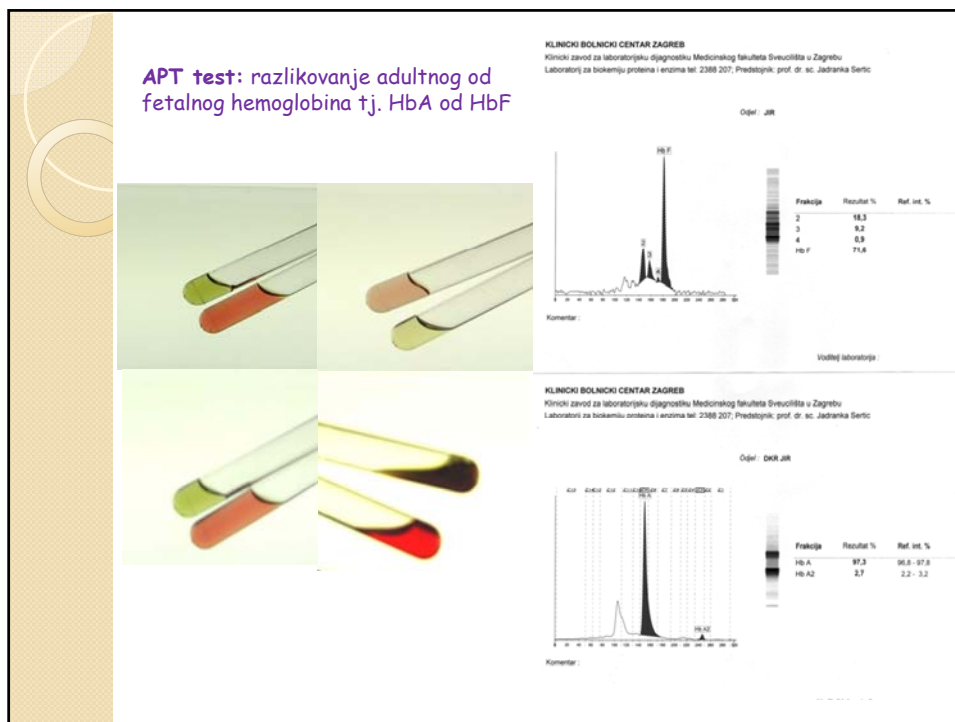
Komentar: _____

Voditelj laboratorija: _____

tečaj trajnog usavršavanja medicinskih biokemičara
Primjena automatiziranih elektroforetskih metoda visoke djelotvornosti u kliničkom laboratoriju
Zagreb, 09.04.2011.



tečaj trajnog usavršavanja medicinskih biokemičara
 Primjena automatiziranih elektroforetskih metoda visoke djelotvornosti u kliničkom laboratoriju
 Zagreb, 09.04.2011.



tečaj trajnog usavršavanja medicinskih biokemičara
 Primjena automatiziranih elektroforetskih metoda visoke djelotvornosti u kliničkom laboratoriju
 Zagreb, 09.04.2011.

