

**UNIVERSITATEA DIN CRAIOVA
FACULTATEA DE CHIMIE**

**Rezumatul
tezei de doctorat**

**STUDIUL ELECTROFORETIC AL HEMOGLOBINEI
ȘI PROTEINELOR SERICE – APLICAȚII CLINICE**

**Conducător științific:
Prof. univ. dr. Mircea Preda**

**Doctorand
Daniela Laura Pălărie**

2008

Teza este structurată astfel:

Introducere

Considerații teoretice

Capitolul 1. *Medii de migrare și mecanisme de separare în electroforeză*

Capitolul 2. *Separarea proteinelor prin electroforeză*

Contribuții originale

Capitolul 3. *Studiul electroforezei proteinelor serice – aplicații clinice*

Capitolul 4. *Studiul electroforezei hemoglobinei - aplicații clinice*

Concluzii generale

Capitolul 5. *Anexe*

Bibliografie

În *introducere* am prezentat un scurt istoric al electroforezei și am precizat metodele electroforetice (electroforeza pe hârtie și electroforeza în gel de agaroză) pe care le-am utilizat în studiile noastre efectuate pe două clase de proteine sanguine: hemoglobina și proteinele serice.

În **capitolul 1** s-a realizat o descriere a mediilor de migrare și a mecanismelor de separare utilizate în electroforeză. S-au precizat mărimile caracteristice electroforezei (viteza electroforetică, mobilitatea electroforetică, mobilitatea relativă, rezoluția de separare) și s-au discutat factorii de care depind acestea: factori proprii particulei (mărimea, forma, sarcina electrică) și cei caracteristici mediului de migrare (vâscozitatea, pH-ul, tăria ionică a soluției tampon, intensitatea câmpului electric, timpul de migrare, temperatura, etc.).

S-a efectuat o prezentare sistematică a evoluției mediilor de migrare și a tehnicilor electroforetice. S-a început cu electroforeza în mediu liber, care este cea mai veche metodă utilizată pentru separarea proteinelor. S-au expus utilitatea acestei metode pentru separarea sistemelor biologice labile dar și dezavantajele acestei metode.

S-au prezentat caracteristicile celor mai importante medii de migrare stabilizante utilizate (hârtia, acetatul de celuloză, gelul de poliacrilamidă, gelul de amidon, gelul de agaroză, geluri compozite de poliacrilamidă – agaroză) și s-au discutat mecanismele de separare și particularitățile tehnicilor electroforetice ce le utilizează.

S-au expus și tehnicile electroforetice bazate pe mecanisme de separare specifice (electroforeza de afinitate, imunodifuzia și imunolectroforeza, focalizarea izoelectrică, izotacoforeza). De asemenea, au fost prezentate și cele mai performante tehnici, care au și cea mai extinsă arie de aplicație (electroforeza bidimensională și electroforeza capilară).

În **capitolul 2** au fost descrise proprietățile electrochimice ale proteinelor și modul de separare prin electroforeză a proteinelor serice și hemoglobinei.

Caracteristicile mai importante ale principalelor categorii de proteine serice (albumina, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 și γ - globulinele) au fost descrise subliniind și importanța lor clinică. S-au prezentat o serie de studii comparative, raportate în literatura de specialitate, referitoare la rezultatele obținute prin diverse tehnici electroforetice, efectuate pentru separarea și cuantificarea proteinelor serice.

S-au discutat particularitățile structurale ale celor 5 clase de imunoglobuline (IgA, IgM, IgG, IgD și IgE) și modul în care imunoglobulinele se separă în câmpul electroforetic.

A fost descrisă structura hemoglobinei precum și a principalilor derivați hemoglobinici (Hb, HbO₂, HbCO, MetHb și HbCO₂). S-a menționat utilitatea metodei spectrofotometrice pentru determinarea concentrațiilor acestor derivați hemoglobinici. Au fost evidențiate diferențele structurale ale hemoglobinelor normale și anormale, modul în care acestea influențează mobilitatea electroforetică a hemoglobinelor precum și mecanismele de separare pe care se bazează electroforeza hemoglobinei.

Contribuțiile originale sunt prezentate în capitolele 3, 4 și 5.

Capitolul 3 conține studiile referitoare la electroforeza proteinelor serice. S-a utilizat un sistem de electroforeză Sebia pe gel de agaroză și un aparat standard de electroforeză pe hârtie.

Influența mediului de migrare asupra separării electroforetice s-a analizat prin compararea valorilor albuminei serice umane determinată prin metoda colorimetrică bromcresol green (A_{col}) și electroforeza pe două medii de migrare: gelul de agaroză (A_{ag}) și hârtia (A_h). S-a constatat că valorile albuminei obținute prin electroforeză depind de mediul de migrare utilizat și sunt mai mici decât cele determinate colorimetric. S-a obținut următoarea relație: $A_{col} > A_{ag} > A_h$. Valoarea mai mică a

albuminei serice obținută prin electroforeza pe hârtie se datorează adsorbției proteinelor pe hârtie. În procesul de separare electroforetică și în etapele ulterioare (colorare, decolorare, cuantificare) apar ușoare pierderi, fapt ce explică valorile mai mici ale albuminei determinate electroforetic. Pentru a obține informații despre omogenitatea acestor medii de migrare s-au determinat coeficienții de corelație între albumina obținută prin metoda bromcresol green și cea determinată prin fiecare din cele două metode electroforetice. S-a obținut o corelație bună ($r=0,94179$) în cazul gelului de agaroză, rezultat similar cu cel obținut ulterior de Snozek și colab. Pentru hârtie, valoarea mai mică a coeficientului de corelație ($r=0,88737$) indică o împrăștiere mai mare a datelor experimentale, care se datorează omogenității dimensiunii porilor.

S-a realizat o evaluare comparativă a concentrațiilor fracțiunilor proteice serice separate prin electroforeza în gel de agaroză și electroforeza pe hârtie prin care s-a evidențiat modul în care proprietățile fizico-chimice ale mediilor de migrare influențează rezultatele obținute. S-a obținut o corelație bună pentru albumină ($r=0,974$), α_2 - globuline ($r=0,955$) și γ - globuline ($r=0,987$) și o corelație moderată pentru fracțiunile α_1 ($r=0,872$) și β ($r=0,761$). Valorile coeficienților de corelație s-au interpretat în strânsă concordanță cu mărimile electroforetice ale fracțiunilor proteice, corespunzătoare celor două tehnici electroforetice (viteza electroforetică, mobilitatea electroforetică și mobilitatea relativă).

S-a studiat dependența lățimii benzii corespunzătoare albuminei serice umane de timpul de migrare utilizând electroforeza în gel de agaroză. S-a observat o creștere relativă a vitezei de migrare a albuminei, datorată variației timpului de migrare de la 17 la 24 minute, mai mică de 1%. Această creștere a vitezei de migrare s-a datorat efectului termic Joule care devine mai important dacă timpul de migrare crește. Dependența liniară a lățimii benzii de timpul și distanța de migrare obținută de noi este în bună concordanță cu rezultatul stabilit de Yarmola și colaboratori pentru proteina R-phycoerythrin.

Utilizând electroforeza în gel de agaroză la pH alcalin s-au evidențiat componente monoclonale din clasele IgA, IgM și IgG și s-a demonstrat imposibilitatea cuantificării lor cu această tehnică electroforetică prin obținerea unor valori subunitare ale rezoluțiilor de separare pentru perechile de benzi: β_2 -IgA, IgA-IgM și IgM-IgG.

Capitolul 4 cuprinde studiile referitoare la electroforeza hemoglobinei pe gel de agaroză folosind un sistem de electroforeză Sebia.

Utilizând metoda electroforezei pe gel de agaroză în tampon acid, la pH=6, pentru determinarea hemoglobinei glicozilate (HbA_{1c}) și metoda enzimatică de analiză a glucozei sanguine, s-a stabilit o relație de dependență liniară între glucoza medie din sânge (GMS) și HbA_{1c}: $GMS = 32,51 \cdot HbA_{1c} - 79,17$. Relația obținută de noi este în bună concordanță cu cele deduse de Nathan și Rohlfing care au determinat HbA_{1c} prin HPLC.

Pe baza unui studiu, efectuat pe o perioadă de doi ani, privind incidența β -talasemiei în județul Dolj au fost identificate, utilizând electroforeza hemoglobinei pe gel de agaroză în tampon alcalin, 47 de cazuri cu β -talasemie minoră din 177 persoane suspectate.

S-a studiat influența fumatului asupra concentrației HbCO din sânge venos investigând patru grupuri de indivizi: sănătoși (separați în fumători și nefumători) și diagnosticați cu β -talasemie minoră (fumători și nefumători). Concentrația HbCO din sângele venos s-a determinat prin metoda analizei multicomponent a derivaților hemoglobinici pe baza spectrelor de absorbție ale probelor obținute cu un spectrofotometru Ocean Optics S2000. S-au obținut următoarele valori medii ale HbCO pentru grupurile investigate: 1,32% pentru nefumători sănătoși, 6,15% pentru fumători sănătoși, 4,97% pentru nefumători cu β -talasemie minoră și 10,12% pentru fumători cu β -talasemie minoră. Rezultatele obținute pentru persoanele sănătoase sunt în concordanță cu cele rezultate din studiile lui Sagone. Valoarea medie de 4,97% obținută pentru persoanele nefumătoare cu β -talasemie minoră este caracteristică pacienților cu anemie hemolitică. Determinarea concentrației HbCO pentru persoanele fumătoare cu β -talasemie minoră a fost raportată de noi pentru prima dată în literatura de specialitate. Remarcăm că pentru acest grup au rezultat cele mai mari concentrații de HbCO, fapt ce se explică prin cumulara CO endogen provenit prin catabolismul hemului cu CO inhalat odată cu fumul de țigară.

S-a studiat influența pH-ului asupra autooxidării HbO₂ in vitro efectuând o analiză cinetică a unor probe biologice umane constituite din soluții hemoglobinice, la diverse pH-uri cuprinse între 5,6 și 8,0. Spectrele de absorbție ale probelor au fost

înregistrate imediat după preparare și la diverse momente de timp ulterioare. Utilizând metoda analizei multicomponent pentru aceste spectre de absorbție s-au obținut evoluțiile temporale ale concentrațiilor derivaților hemoglobinici pentru fiecare probă. S-a remarcat menținerea practic constantă a concentrației procentuale a HbCO, scăderea concentrației HbO₂ și creșterea concentrației MetHb. Analiza evoluției temporale a concentrației MetHb a condus la determinarea constantelor de viteză aparente ale procesului de autooxidare a HbO₂. Constantele de viteză aparente au depins de pH-ul probelor, având valori între $0,771 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ pentru pH=8 și $3,502 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ pentru pH=5,6.

S-a analizat modul în care pH-ul sanguin influențează concentrația MetHb efectuând un studiu comparativ pe două categorii de persoane: diabetici netratați (cu HbA_{1c} > 9%) și nediabetici. Pentru persoanele nediabetice s-au obținut concentrații ale MetHb situate în intervalul 1,09-2,30%, media fiind 1,69%. În cazul persoanelor diabetice au rezultat valori ale MetHb cuprinse între 2,20% și 3,47%, media fiind de 2,76%. Valoarea medie a MetHb mai mare la persoanele diabetice s-a explicat prin pH-ul mai mic la aceștia cauzat de cetoacidoza metabolică.

Concluziile cercetărilor efectuate au fost prezentate în cadrul fiecărui studiu și reluate succint în secțiunea *concluzii generale*.

S-a evidențiat importanța electroforezei în determinarea concentrațiilor hemoglobinelor și a proteinelor serice și s-au stabilit corelații între valorile acestor proteine sanguine și concentrațiile altor parametrii biochimici.