

**ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»**

«ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΜΗΧΑΝΗΜΑΤΩΝ»

Π.ΜΟΥΤΣΑΤΣΟΥ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ
ΔΙΕΥΘ/ΡΙΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΓΝ ΑΤΤΙΚΟΝ

ΣΤΟΧΟΣ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Η Δημιουργία μιας **Οργανωμένης Ερευνητικής Δομής**
στο Π.Γ.Ν. «ΑΤΤΙΚΟΝ» για

- 1) Έρευνα
- 2) Εκπαίδευση
- 3) Παροχή εξειδικευμένων διαγνωστικών εξετάσεων με την χρήση τεχνολογιών αιχμής

- **Ο ΔΡΟΜΟΣ ΜΑΚΡΥΣ.....ΚΑΙ ΔΥΣΚΟΛΟΣ...**

1) Πρόταση για Σύσταση Κεντρικού Ερευνητικού Εργαστηρίου στο Π.Γ.Ν. «Αττικόν» **(12.7.2019)**

2) Επιλογή εξοπλισμού (Διαγωνισμός για την προμήθεια του εξοπλισμού (τεχνικές προδιαγραφές, φύλλα συμμόρφωσης, διακήρυξη ΕΣΗΔΗΣ, ορισμός τριμελούς επιτροπής διαγωνισμού, αποσφράγιση προσφορών, υπογραφή πρακτικού διαγωνισμού) **(ολοκλήρωση τέλος 2021)**

3) Διαμόρφωση του χώρου για την εγκατάσταση του Κεντρικού Ερευνητικού Εργαστηρίου στο ΑΚΙΣΑ (Οικοδομικές εργασίες, κατασκευή εργαστηριακών πάγκων) **(ολοκλήρωση Δεκέμβριος 2022)**

ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ - ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Επειδή στη σύγχρονη Βασική Εργαστηριακή Έρευνα, την Μεταφραστική /Κλινική Έρευνα και την εξειδικευμένη Εργαστηριακή Διαγνωστική χρησιμοποιούνται **τα – omics** Genomics, Transcriptomics, Epigenomics, Metabolomics, Proteomics, Microbiomics

ΕΠΙΛΕΧΘΗΚΕ Ο ΠΑΡΑΚΑΤΩ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

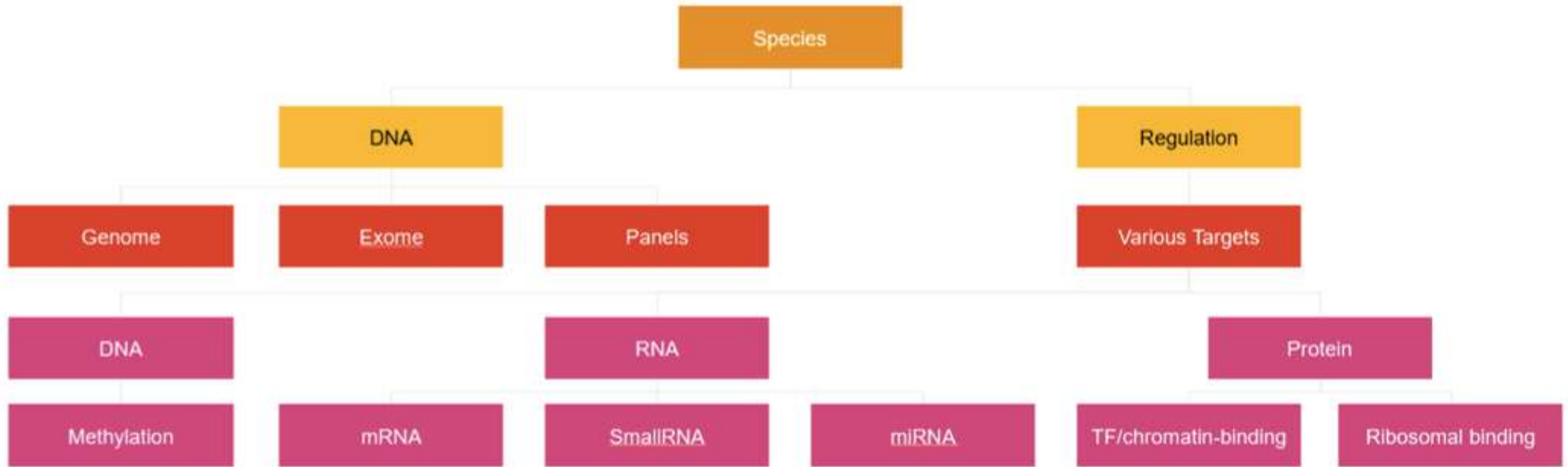
- 1) Πλατφόρμα Μαζικής Παράλληλης Αλληλούχησης Νέας Γενιάς υψηλής Απόδοσης , NGS (Next Generation Sequencing)
- 2) Υγρή Χρωματογραφία Φασματομετρία Μάζας , LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry)
- 3) Σύστημα Μελέτης Κυτταρικού Μεταβολισμού Seahorse XF

A/A	Εξοπλισμός	Τεμάχια	Τελική Τιμή συμπεριλαμβανομένου ΦΠΑ (€)
1	Πλατφόρμα μαζικής παράλληλης αλληλούχισης (Next Generation Sequencer)	1	399.400
2	Σύστημα διαδοχικής φασματομετρίας μάζας συνδυασμένο με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC-MS-MS)	1	480.000
3	Σύστημα μελέτης κυτταρικού μεταβολισμού	1	176.000
4	Διαχωριστής κυττάρων από ιστούς και απομόνωσης βιομορίων από κύτταρα των 2 θέσεων	1	11.000
5	Φωτόμετρο σάρωσης UV/VIS για πλάκες (ELISA) με υπολογιστή	1	13.600
6	Κάθετοι Καταψύκτες -30°C	4	14.000
7	Καταψύκτες -86°C 550L	4	35.000
8	Παγομηχανή	1	2.200
9	Ηλεκτρονικοί υπολογιστές	4	5.000
10	Συσκευή ανάδευσης (vortex)	3	900
11	Ανακινούμενο υδατόλουτρο 15lt	1	2.800
12	Συσκευή υπερήχων Sonicator	1	10.200
13	Orbital shakers	3	2.600
14	Δοχείο υγρού αζώτου για αποθήκευση βιολογικών δειγμάτων	1	4.300
15	Φυγόκεντρος μικροπλακών	1	1.200
16	Επιτραπέζιος Ομογενοποιητής Ιστών για προπαρασκευή δειγμάτων και λύση κυττάρων, με χρήση σφαιριδίων	1	3.700
17	Συσκευή θέρμανσης σωληναρίων (BLOCK HEATER) με 2 ένθετα (BLOCK)	3	2.000

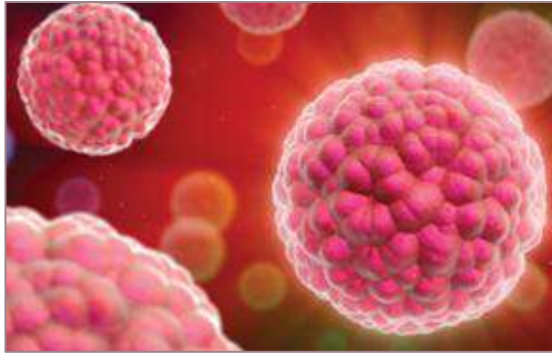
ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ –ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (LC/MS/MS)

- Είναι αναλυτική τεχνική υψηλής τεχνολογίας η οποία προσδιορίζει **ταυτόχρονα πολλαπλές ενώσεις** μικρού μοριακού βάρους, σε **ένα δείγμα**, με υψηλή **ευαισθησία, ειδικότητα, και ταχύτητα**.
- Μελετά το μεταβολικό αποτύπωμα ενός βιολογικού συστήματος: δηλ τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό μεγάλου αριθμού μεταβολιτών μικρού ΜΒ (οργανικά οξέα, αμινοξέα, λιπίδια, στεροειδείς ορμόνες, νουκλεοτίδια, φάρμακα, βιογενείς αμίνες κλπ).
- Στοχευμένη & μη στοχευμένη ανάλυση
- **Εφαρμογές στην Έρευνα και Διάγνωση**
 - Ενδοκρινολογία
 - Νευρολογικά νοσήματα
 - Μεταβολικά νοσήματα
 - Αυτοάνοσα νοσήματα
 - Ψυχιατρική
 - Ρευματολογία
 - Καρκίνος

**ΠΛΑΤΦΟΡΜΑ ΜΑΖΙΚΗΣ ΠΑΡΑΛΛΗΛΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ
ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (Next Generation Sequencer, NGS)
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗ**



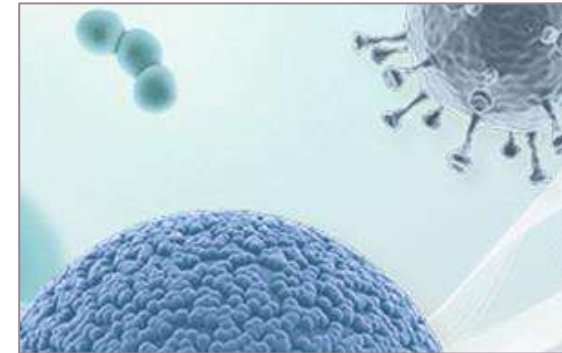
Εφαρμογές NGS στη Βασική και Μεταφραστική Έρευνα



Ανίχνευση σπάνιων γενετικών παραλλαγών, CNVs, παρακολούθηση των αλλαγών του μοριακού προφίλ του όγκου κατά τη διάρκεια της θεραπείας, διαταραχές γονιδιακής έκφρασης, ανίχνευση χιμαιρικών γονιδίων και κυκλοφορούν DNA



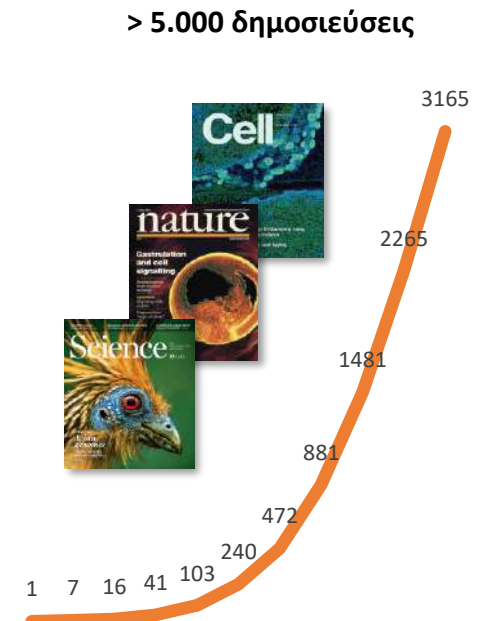
Κατανόηση των μοριακών βλαβών πολύπλοκων ασθενειών, ενδοκρινολογικών, ανοσολογικών, νευρολογικών κ.α., σπάνιων κληρονομικών, πολυγονιδιακών και πολυπαραγοντικών νοσημάτων, φαρμακογενομική



Μελέτη μεταγενομικής, λοιμώξεων, βακτηρίων και ιών.

Σύστημα Μελέτης Κυτταρικού Μεταβολισμού Seahorse XF

- Το Σύστημα Μελέτης Κυτταρικού Μεταβολισμού Seahorse XF μελετάει τον κυτταρικό μεταβολισμό και ιδιαίτερα τη μετάπτωση του μεταβολισμού από την οξειδωτική φωσφορυλίωση προς τη γλυκόλυση
- Το Seahorse XF δίνει πληροφορίες για τις μεταβολικές οδούς, **οι οποίες ακολούθως μπορούν να διελευκανθούν με φασματομετρία μάζας**
- Το όργανο αυτό χρησιμοποιείται στην έρευνα νοσημάτων όπως:
 - ο σακχαρώδης διαβήτης
 - η παχυσαρκία
 - τα μεταβολικά νοσήματα που οφείλονται σε ενδοκρινοπάθειες
 - καρκίνος
 - Alzheimer
 - Parkinson
 - Χορεία του Huntington
 - Πολλαπλή Σκλήρυνση
 - Αυτοάνοσα νοσήματα

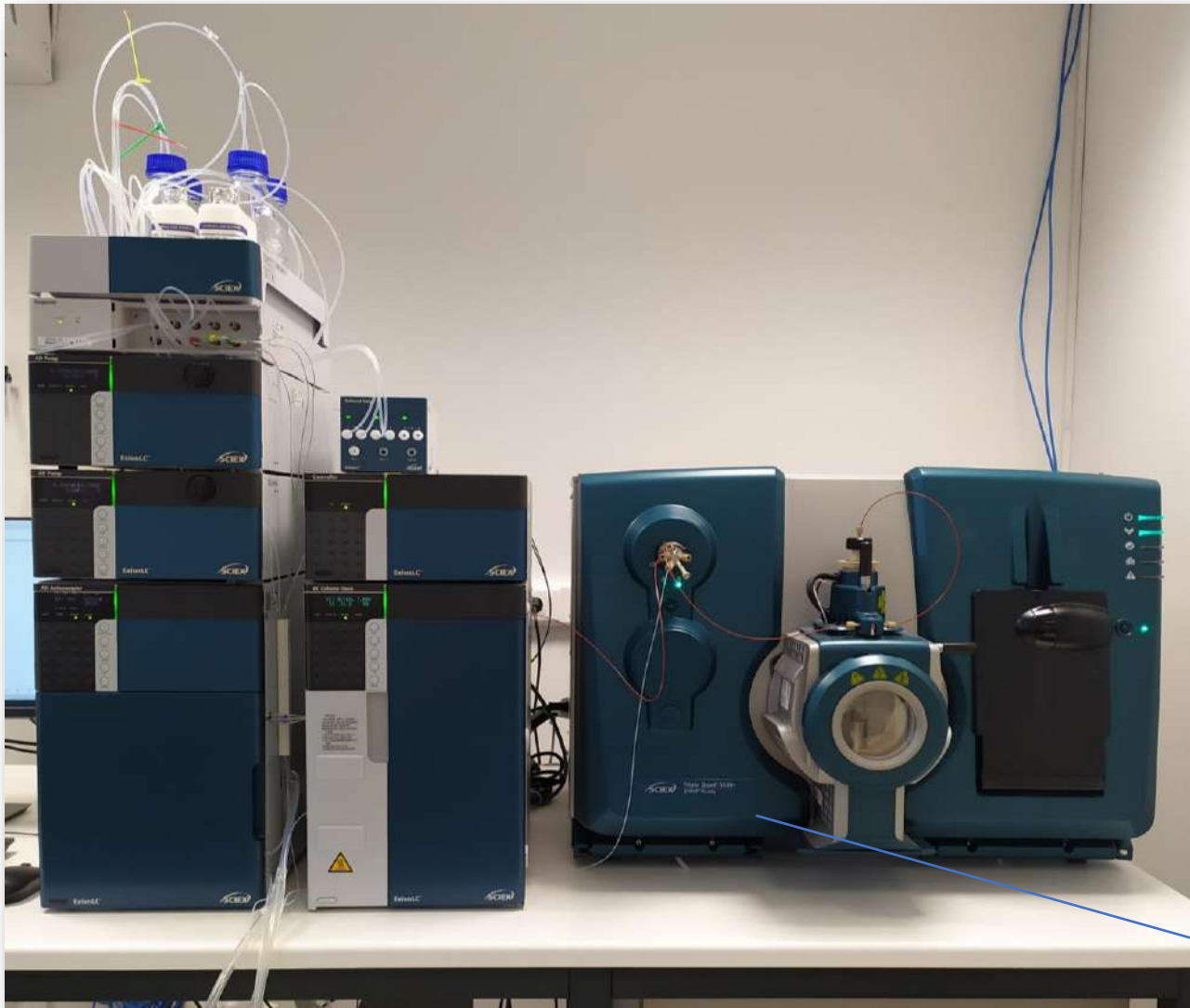


- **Σύστημα Μελέτης Κυτταρικού Μεταβολισμού Seahorse XF**

- Έχει, πλέον, εδραιωθεί ως η κορυφαία μέθοδος για τη μελέτη του μεταβολισμού
- Ειδικά για τη μελέτη της μιτοχονδριακής βιολογίας θεωρείται το όργανο και η μέθοδος επιλογής.
- Καθώς ο μεταβολισμός εμπλέκεται σε όλες τις κυτταρικές λειτουργίες το όργανο αυτό αναφέρεται σε δημοσιεύσεις σε πολλούς διαφορετικούς τομείς της Επιστήμης όπως η Ανοσολογία, η κυτταρική Φυσιολογία ο καρκίνος και μεταβολικά νοσήματα, όπως η παχυσαρκία και ο σακχαρώδης διαβήτης.
- Συγκεκριμένα, η μετάπτωση του μεταβολισμού από την οξειδωτική φωσφορυλίωση προς τη γλυκόλυση στα καρκινικά κύτταρα θεωρείται κομβικό γεγονός της εξαλλαγής του κυττάρου.
- Οι ερευνητές που ασχολούνται με τον καρκίνο χρησιμοποιούν το όργανο αυτό για να κάνουν μεταβολική φαινότυπιση σε καρκινικά κύτταρα και να μελετήσουν εκτός από το μεταβολισμό τους το μικροπεριβάλλον του όγκου και τη δράση φαρμάκων

**ΠΟΙΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΜΗΧΑΝΗΜΑΤΩΝ
ΕΠΙΛΕΧΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΝΑ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΘΟΥΝ
ΣΤΟ ΑΚΙΣΑ ΣΤΟ ΑΤΤΙΚΟΝ?**

ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΔΟΧΙΚΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ ΜΕ
ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC-MS-MS),
Μοντέλο SCIEX Triple Quad 5500+ System – QTRAP



Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (LC-MS/MS)

Μοντέλο SCIEX Triple Quad 5500+ System – QTRAP

- Η χρήση του συγκεκριμένου μοντέλου έχει πολλές εφαρμογές τόσο στην έρευνα όσο και στην διαγνωστική και στην θεραπευτική σε τομείς όπως η κλινική ενδοκρινολογία, νευροψυχιατρική, τοξικολογία, καρδιολογία, παρακολούθηση επιπέδων φαρμάκων κλπ. Διάφορες εταιρείες έχουν αναπτύξει IVD-CE-certified kits ,όπως η Chromsystems, Waters , Eureka κλπ, για τον προσδιορισμό διαφόρων παραμέτρων με σημαντική διαγνωστική αξία.

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ



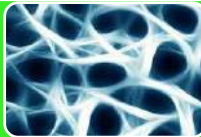
1. Έλεγχος Εξαρτησιογόνων Ουσιών
(Drugs of Abuse Testing)



2. Μεταβολικές Νόσοι και Νεογνικός Έλεγχος
(Metabolic Diseases and Newborn Screening)



3. Στεροειδή (Steroids)



4. Προσδιορισμός Βιταμίνης D / Έλεγχος Οστεοπόρωσης
(Osteoporosis Diagnosis / Vitamin D Analysis)



5. Προφίλ Βιταμινών: B1, B6, MMA
(Vitamin Profiling: B1, B6, MMA)



6. Βιογενείς αμίνες
(Biogenic Amines)



7. Παρακολούθηση Θεραπευτικών Επιπέδων Φαρμάκων
(Therapeutic Drug Monitoring)



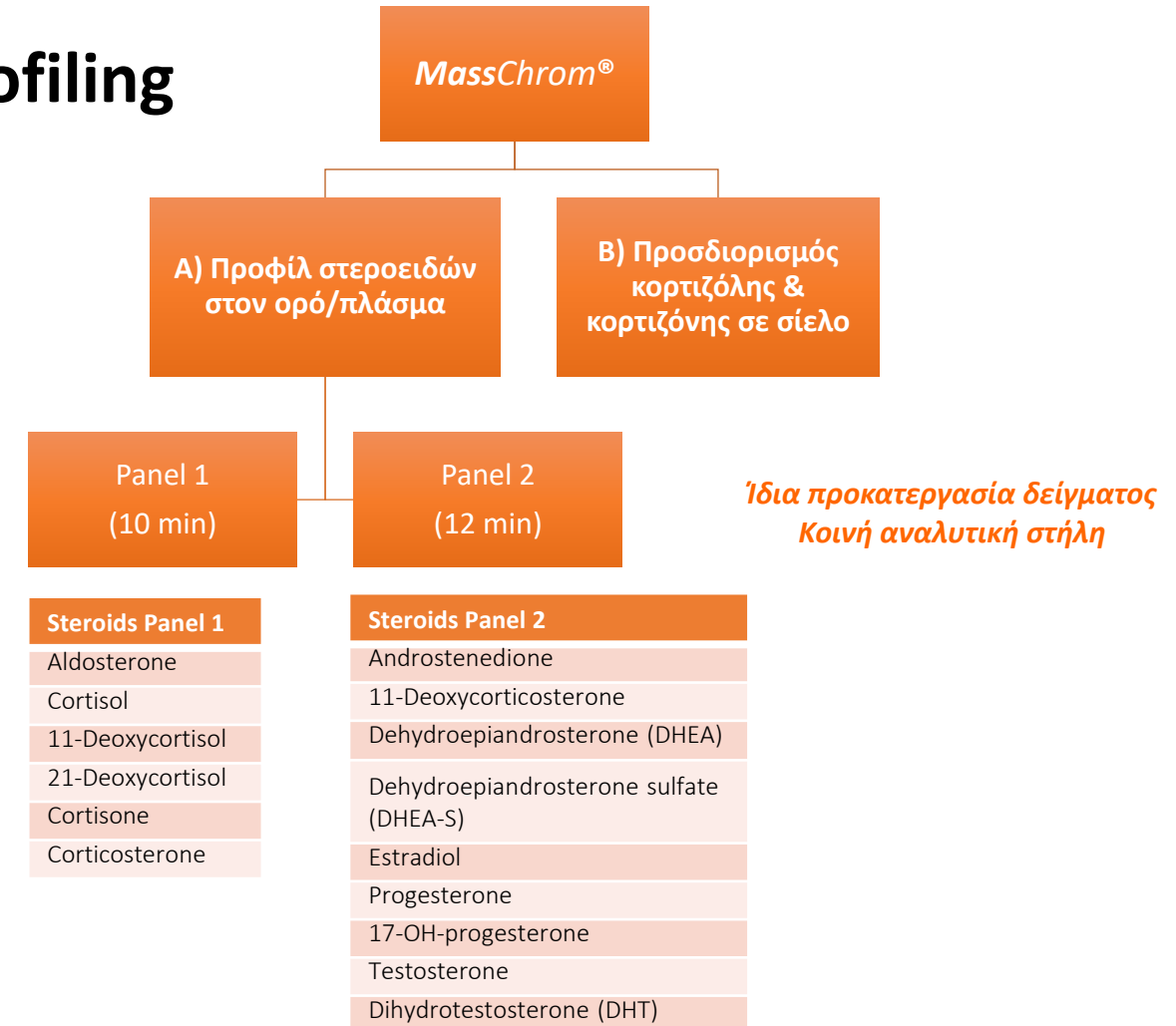
8. Βιοδείκτες Κατάχρησης Αλκοόλ
(Biomarker for Alcohol Abuse)

Ανάλυση Στεροειδών Ορμονών με LC-MS/MS (Steroids)

LC-MS/MS Gold Standard in Steroid Profiling

Υπερέχει έναντι ανοσοχημικών αναλύσεων σε:

- ✓ Ευαισθησία (χαμηλότερα όρια ανίχνευσης)
- ✓ Ειδικότητα (προηγούμενα προβλήματα επίδρασης μήτρας και διασταυρούμενων αντιδράσεων αντισωμάτων)
- ✓ Προτυποποίηση και συγκρισιμότητα αποτελεσμάτων (διαφορετικοί κατασκευαστές – διαφορετικά αντιδραστήρια)
- ✓ Δυνατότητα ταυτόχρονης μέτρησης πολλαπλών αναλυτών (panel/profile) σε ένα μόνο δείγμα – Χαμηλότερο κόστος



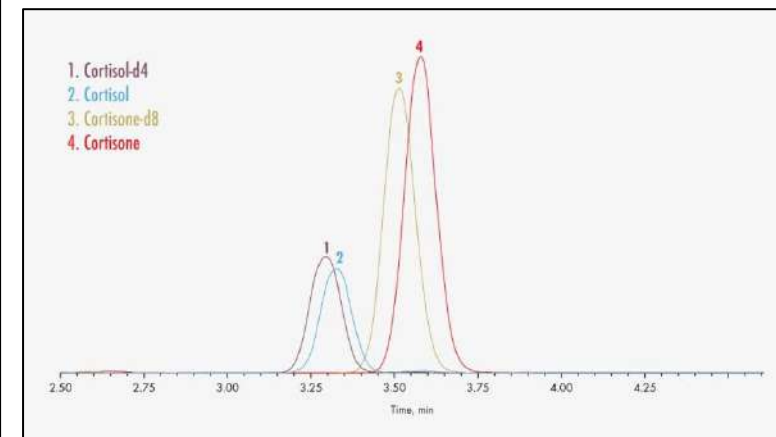
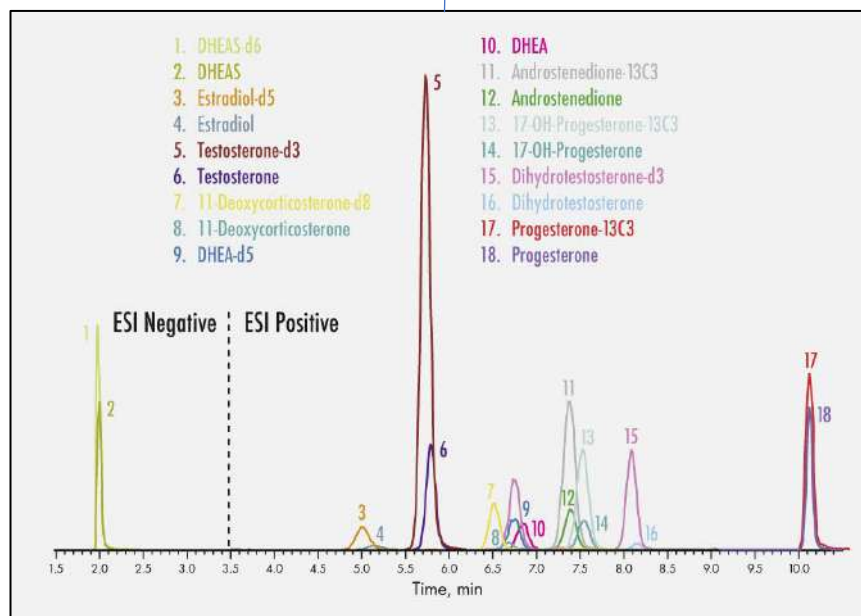
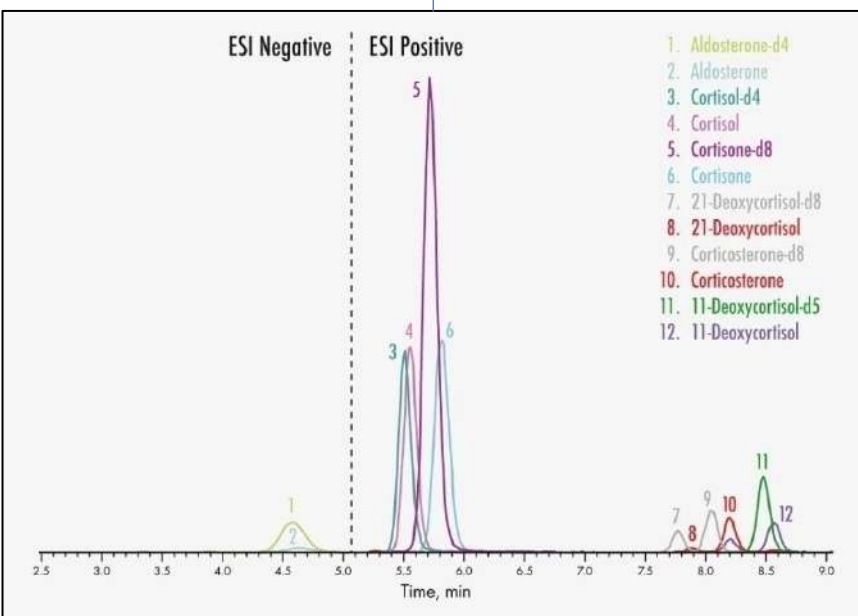
Ανάλυση Στεροειδών Ορμονών με LC-MS/MS (Steroids)

Προφίλ στεροειδών στον ορό/πλάσμα

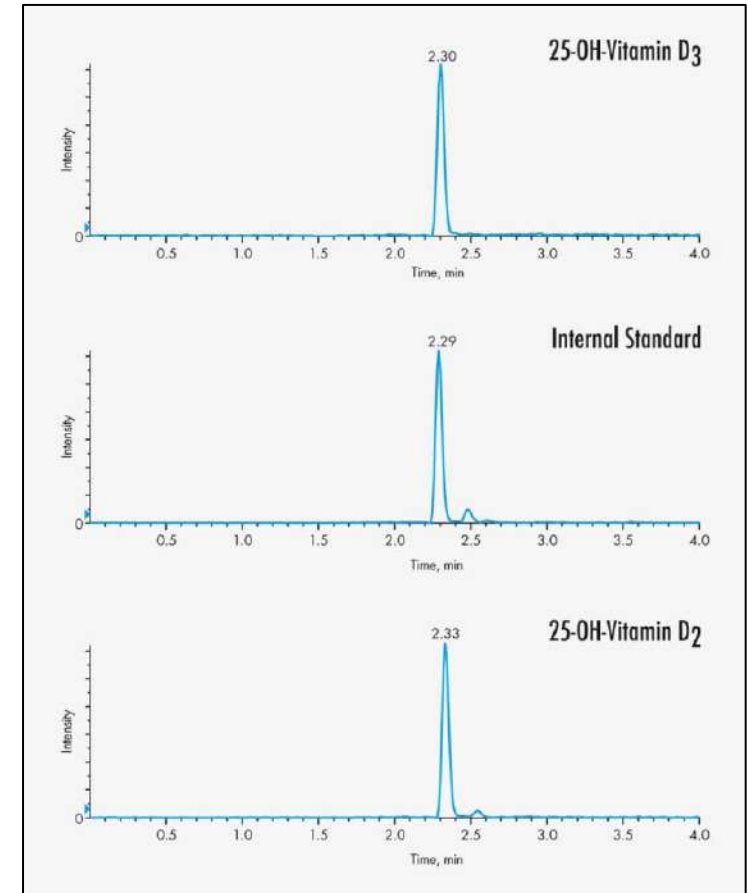
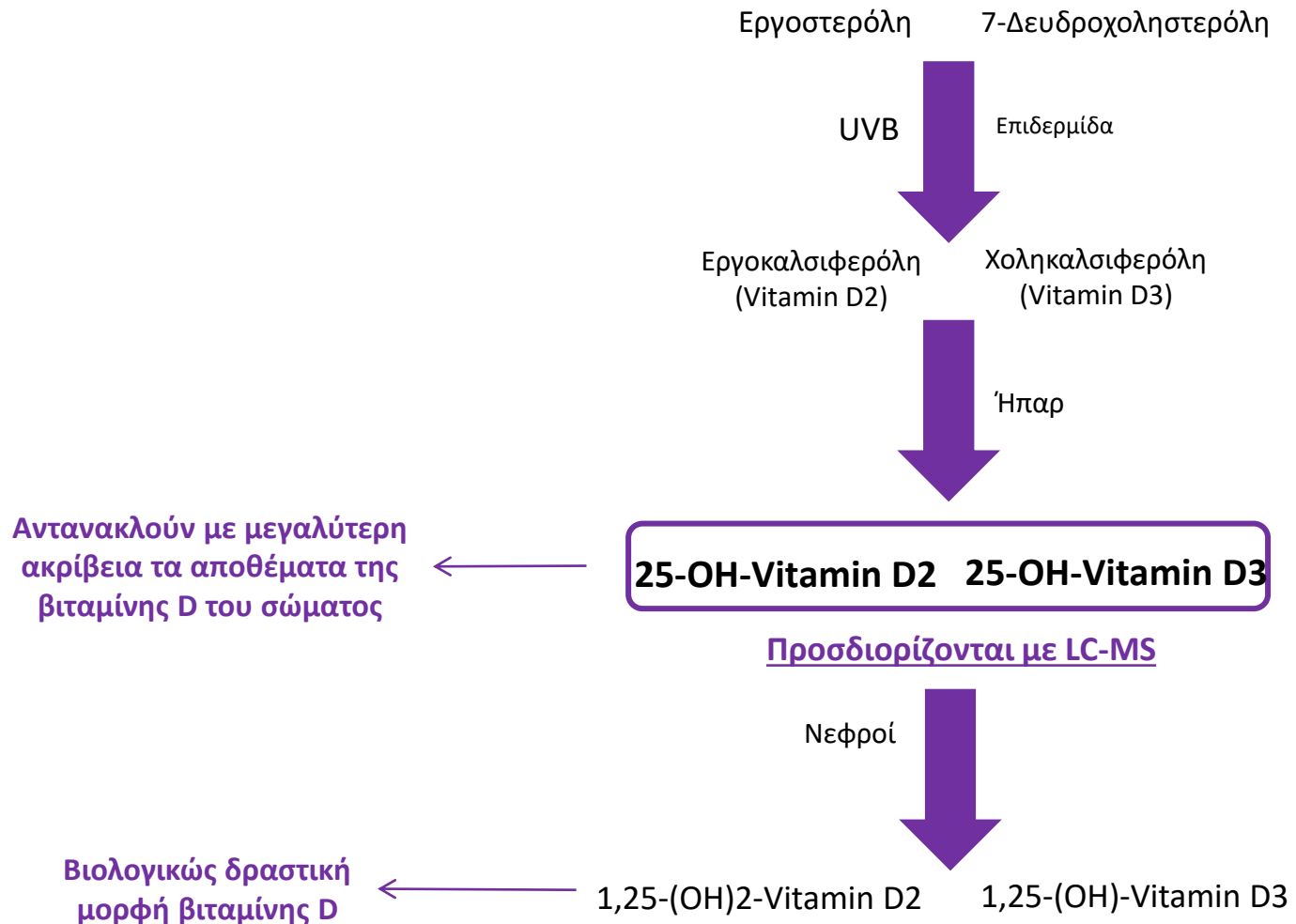
Προσδιορισμός κορτιζόλης & κορτιζόνης σε σίελο

Panel 1

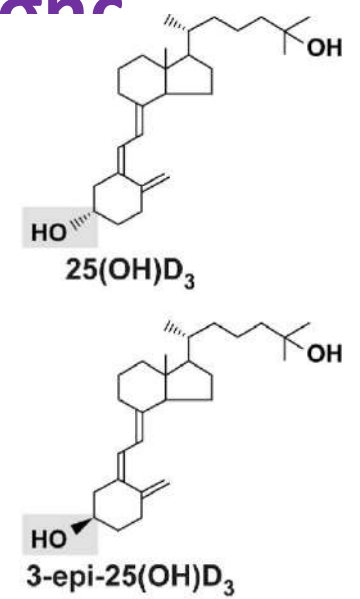
Panel 2



Προσδιορισμός Βιταμίνης D / Έλεγχος Οστεοπόρωσης (Osteoporosis Diagnosis / Vitamin D Analysis)



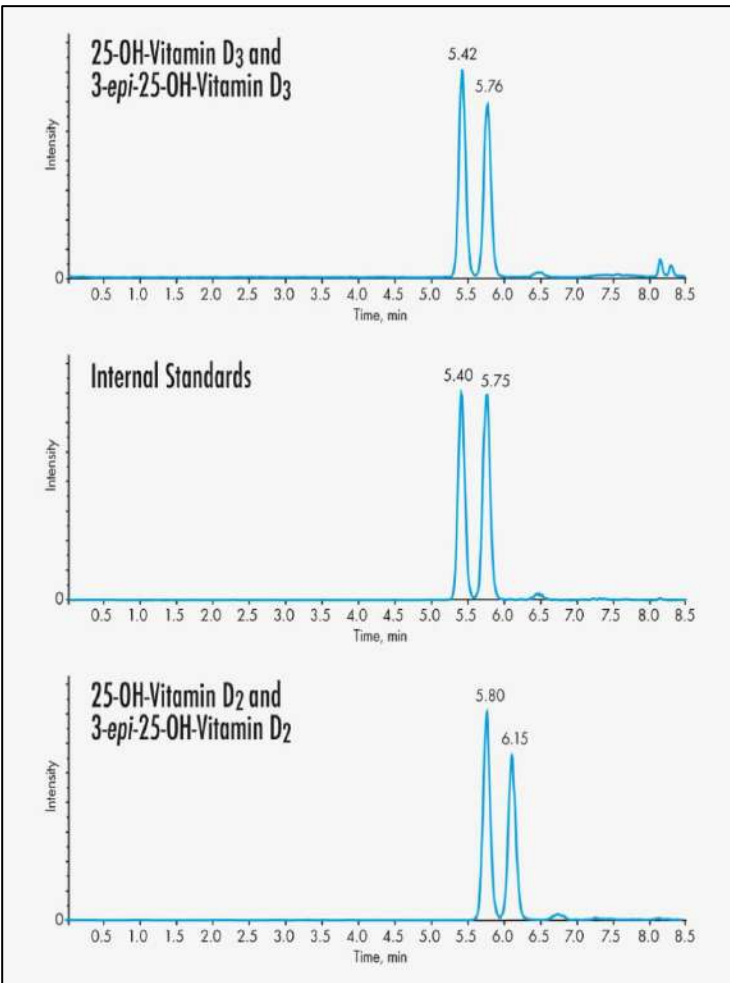
Προσδιορισμός Βιταμίνης D / Έλεγχος Οστεοπόρωσης (Osteoporosis Diagnosis / Vitamin D Analysis)



Επιπλέον προσδιορισμός C3-επιμερών 25-OH-Vitamin D

- Σημαντικό μέρος των 25-OH-Vitamin D₃/D₂ απαντάται στα βρέφη < 1 έτους στη μορφή των C3-επιμερών
- Διαφορετικός προσανατολισμός της –OH ομάδας του C3 στον χώρο
- Διαφορετική βιολογική δραστικότητα!
- Τα επιμερή της βιταμίνης D έχουν μειωμένη ικανότητα αβεστοποίησης των οστών (*reduced calcaemic effect in bone mineralisation*)

Επομένως είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός των C3-επιμερών στα βρέφη



Βιογενείς Αμίνες (Biogenic Amines)

Χρησιμοποιούνται στη διάγνωση νευροενδοκρινικών όγκων

Όγκοι που παράγουν ορμόνες:

- ✓ Φαιοχρωμοκύττωμα (επινεφρίδια)
- ✓ Καρκινοειδείς όγκοι (πνεύμονες και γαστρεντερικό)
- ✓ Παραγαγγλίωμα (όλο το σώμα)
- ✓ Νευροβλάστωμα (κυρίως σε παιδιά)

MassChrom®

A. Προσδιορισμός βιογενών αμινών & μεταβολιτών στα ούρα

A1. Κατεχολαμίνες, Ελεύθερες Μετανεφρίνες και Σεροτονίνη στα ούρα

A2. Ολικές Μετανεφρίνες (Ελεύθερες + Συζευγμένες) στα ούρα

A3. VMA, HVA, 5-HIAA στα ούρα

B. Προσδιορισμός βιογενών αμινών στο πλάσμα

Ελεύθερες Μετανεφρίνες στο πλάσμα

TARGET ANALYTES
Adrenaline (epinephrine)
Noradrenaline (norepinephrine)
Dopamine
Free metanephrine
Free normetanephrine
Free 3-methoxytyramine
Serotonin
Total metanephrine (free + conjugated)
Total normetanephrine (free + conjugated)
Total 3-methoxytyramine (free + conjugated)
Vanillylmandelic Acid (VMA)
Homovanillic Acid (HVA)
5-Hydroxyindoleacetic Acid (5-HIAA)
Free metanephrine
Free normetanephrine
Free 3-methoxytyramine

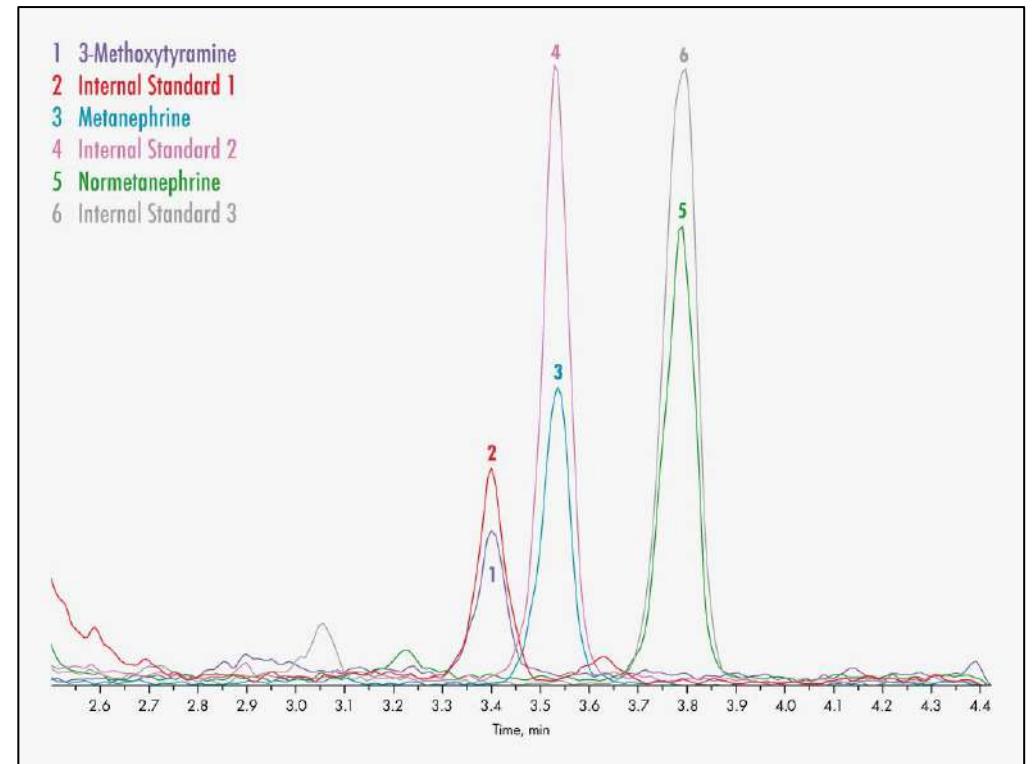
Βιογενείς Αμίνες (Biogenic Amines)

Προσδιορισμός ελεύθερων μετανεφρινών στο πλάσμα

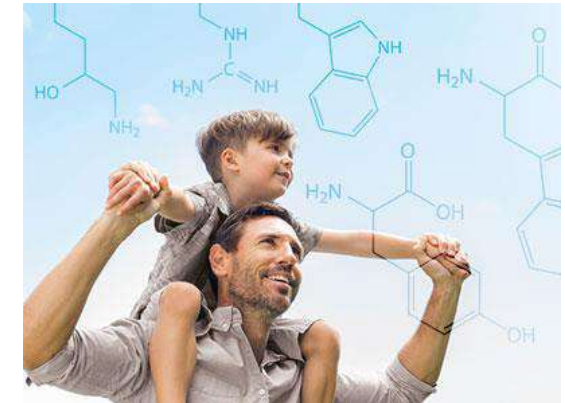
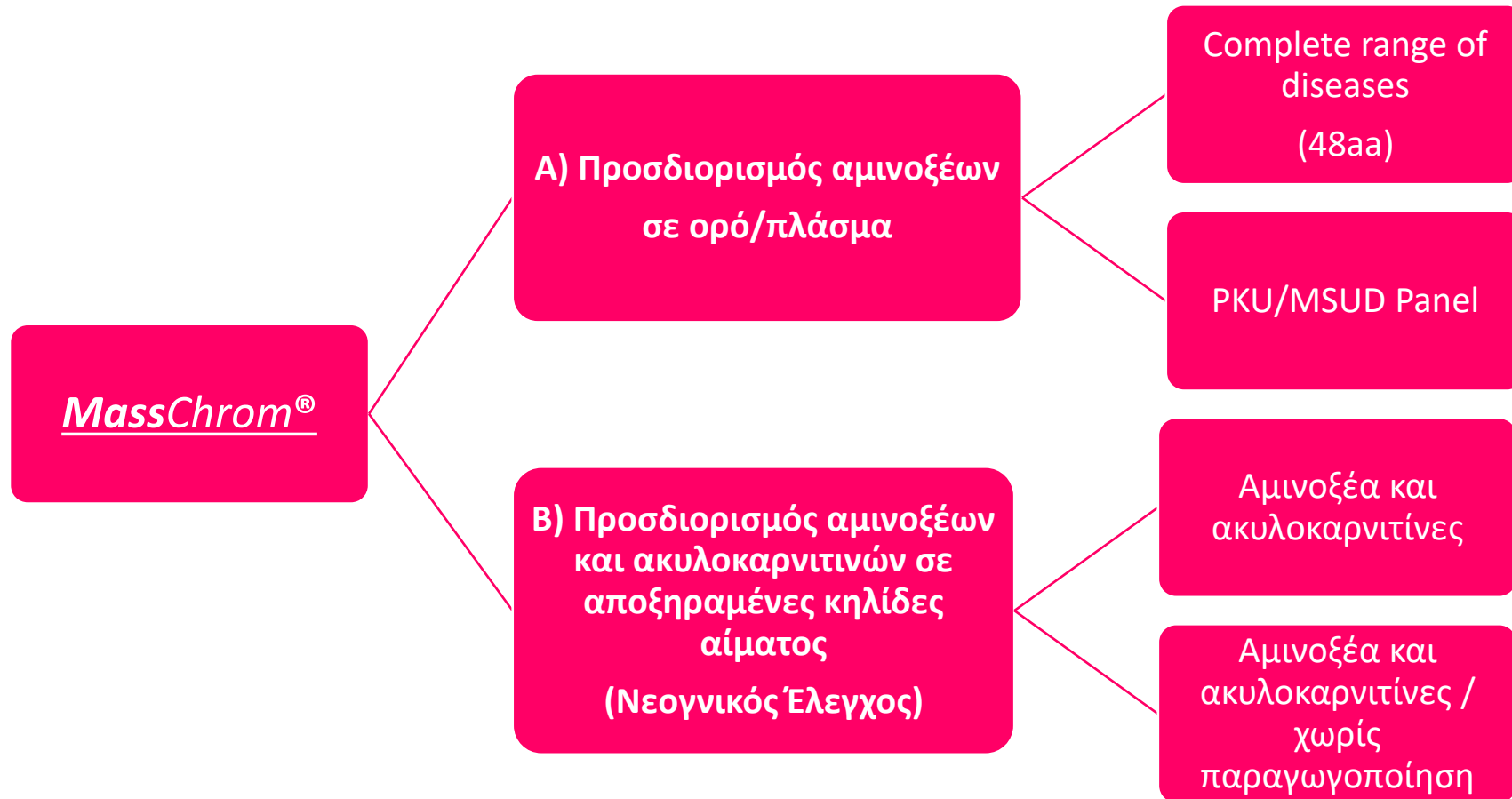


Καλύτερος βιοδείκτης σε σχέση με:

1. Μετανεφρίνες ούρων
 2. Κατεχολαμίνες πλάσματος
(επινεφρίνη, νορεπινεφρίνη, ντοπαμίνη)
- ✓ Πιο σταθερές ουσίες
 - ✓ Εκκρίνονται σε συνεχή βάση
 - ✓ Μέγιστη ευαισθησία και ειδικότητα στη διάγνωση φαιοχρωμοκυττώματος



Μεταβολικά Νοσήματα και Νεογνικός Έλεγχος (Metabolic Diseases and Newborn Screening)

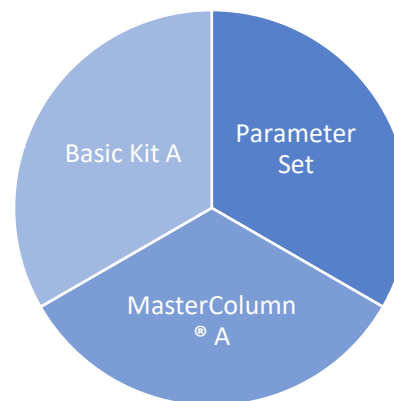


Παρακολούθηση Θεραπευτικών Επιπέδων Φαρμάκων (Therapeutic Drug Monitoring)



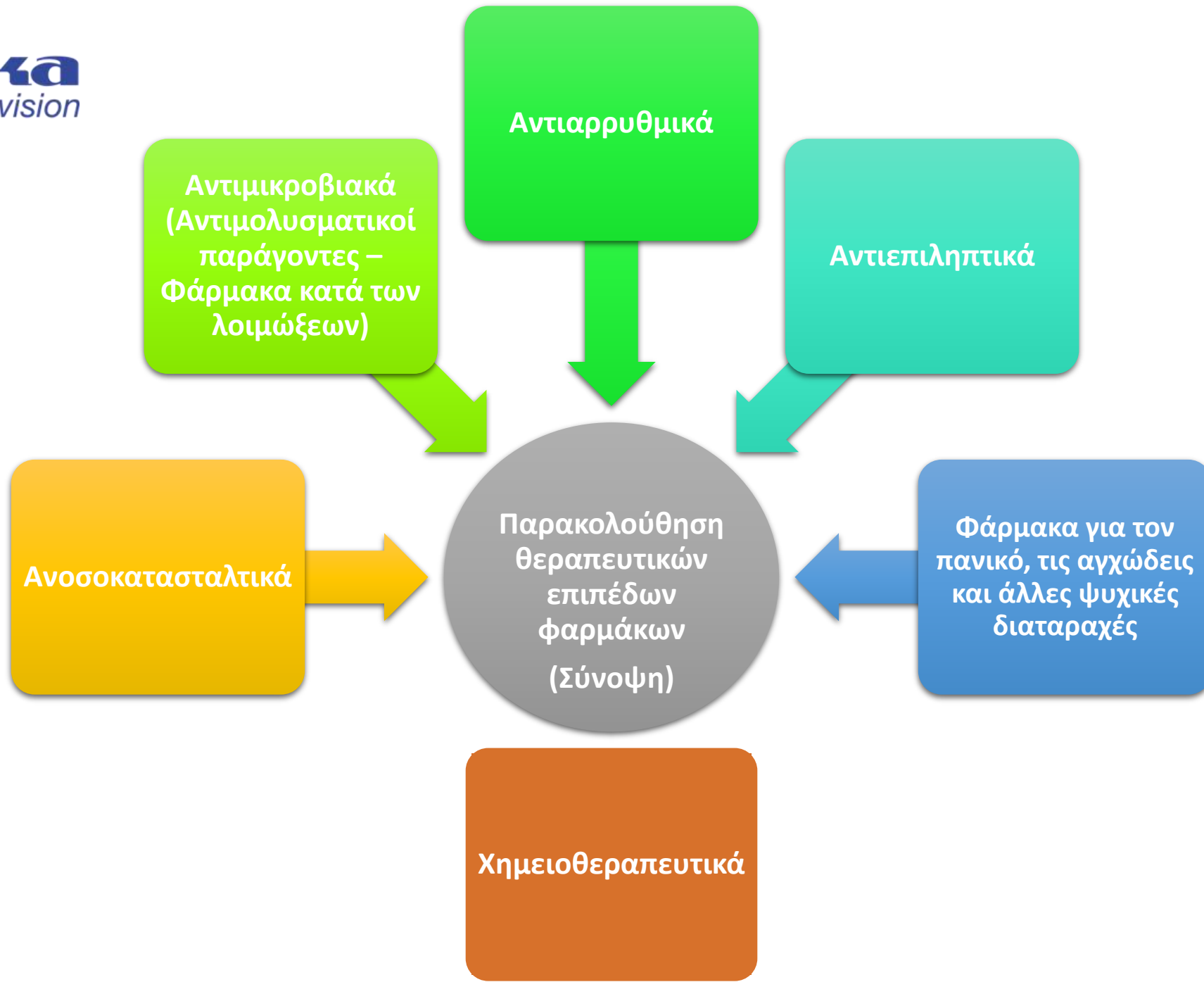
MassTox[®] TDM Series A

1 Βασικό Kit
Κοινά αντιδραστήρια
Μία προκατεργασία
δείγματος



Ξεχωριστό πακέτο
calibrators, QCs και
εσωτερικών προτύπων
για κάθε ομάδα ουσιών

1 αναλυτική στήλη
για 200 παραμέτρους





**ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ LC-MS/MS ΣΤΟ ΑΚΙΣΑ
(SCIEX TripleQuad 5500+ System – QTRAP)
(Προμηθευτρια Εταιρεία Σελίδης Α.Ε)**

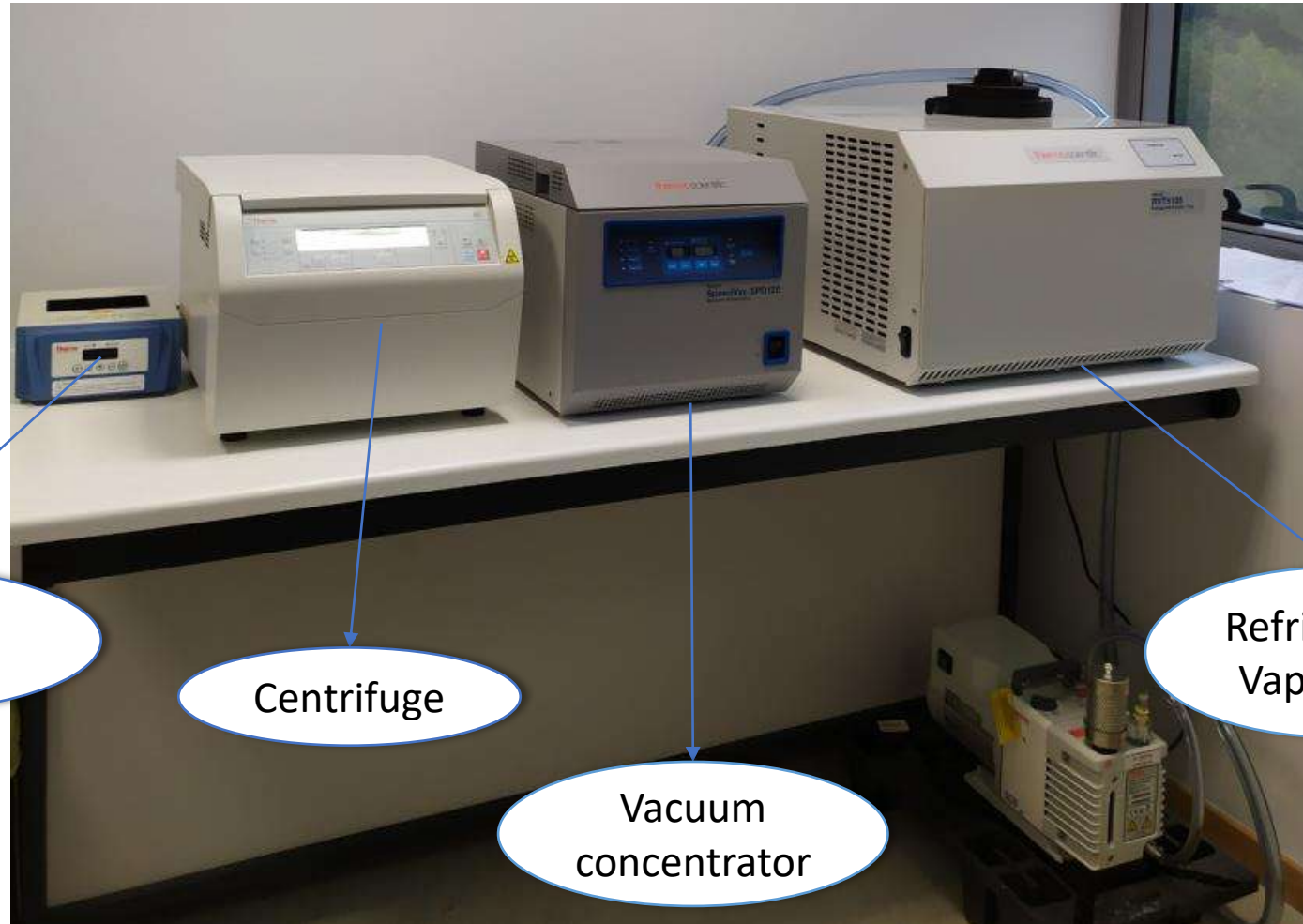
**Εκπαίδευση: Χ.Βελεσιώτης, Υποψήφιος
διδάκτωρ, Υπότροφος ΕΛΙΔΕΚ**

**Θέμα ««Μελέτη του υποδοχέα των
οιστρογόνων παράλληλα με το προφίλ των λιπιδίων
στο Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο»**

**Επιβλέπουσα: Καθ. Π. Μουτσάτσου
Συν-επιβλέποντες: Καθ. Δ. Μπούμπας
Καθ. Ν. Θωμαΐδης**

ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

(Συμπληρωματικές Συσκευές που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία των δειγμάτων)



Digital Dry Bath
(Block Heater)

Centrifuge

Vacuum
concentrator

Refrigerated
Vapor Trap

Έχει ολοκληρωθεί η εγκατάσταση πρωτοκόλλων για

1. Προσδιορισμό ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων
2. Προσδιορισμό βιταμίνης D
3. Προσδιορισμό του προφίλ 19 στεροειδών στον ορό/πλάσμα
4. Σε ένα περιορισμένο αριθμό δειγμάτων ασθενών του ΠΓΝ Αττικόν έχουν προσδιορισθεί οι παραπάνω παράμετροι

ΚΙΤ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΩΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ

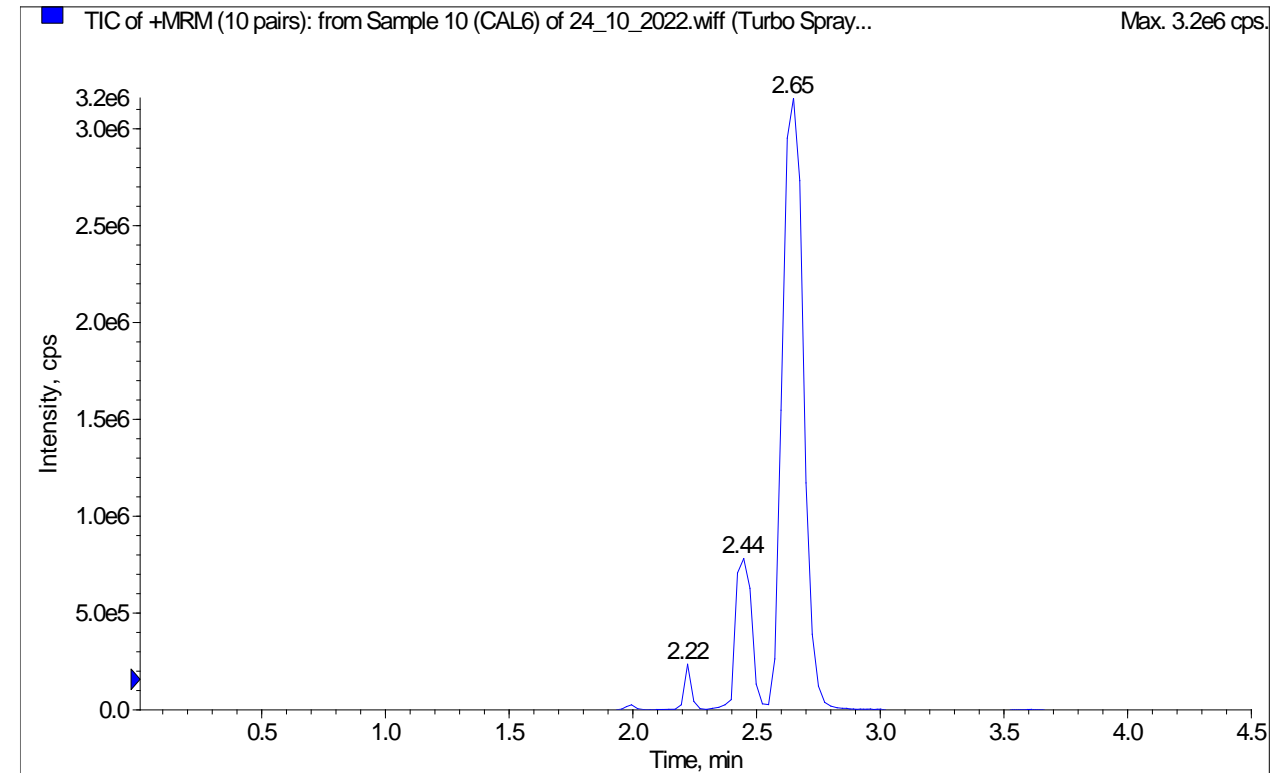
Ανοσοκατασταλτικά
σε ολικό αίμα

Cyclosporin A
Sirolimus
Everolimus
Tacrolimus

Ανοσοκατασταλτικά
(DUAL KIT)
σε ολικό αίμα/πλάσμα

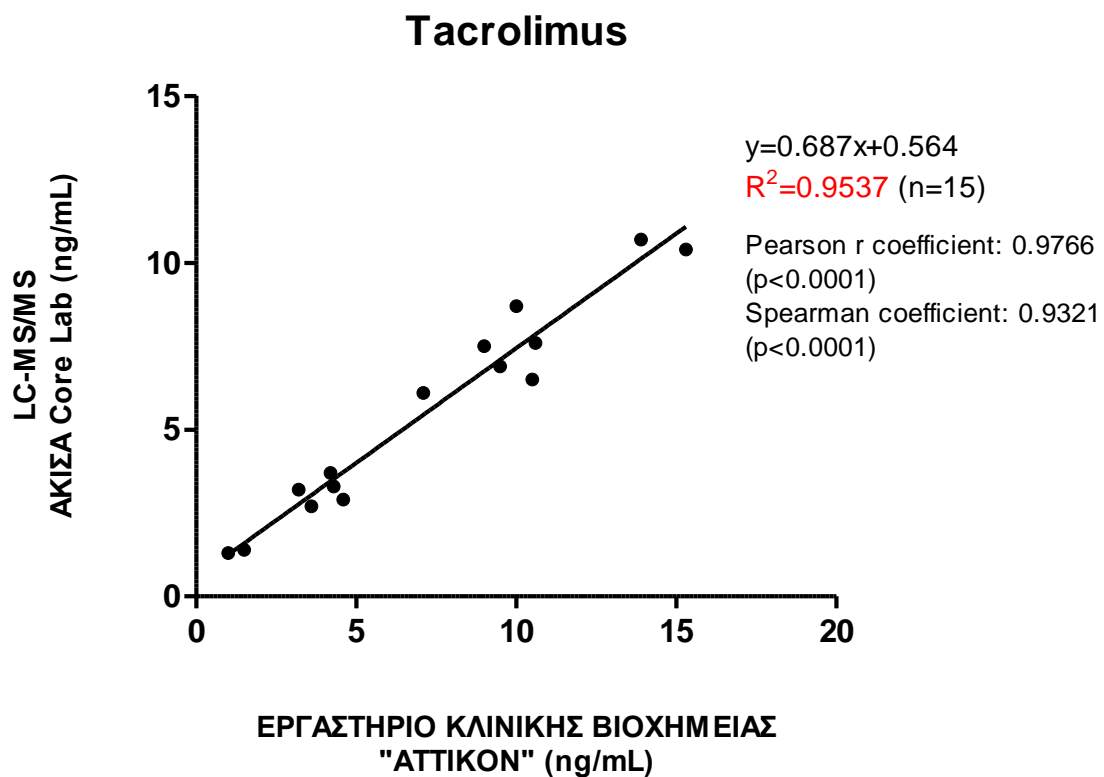
Ανοσοκατασταλτικά
σε ολικό αίμα
Cyclosporin A
Sirolimus
Everolimus
Tacrolimus

Μυκοφαινολικό οξύ
στο πλάσμα



Tacrolimus

Correlation between CMIA – LC-MS/MS

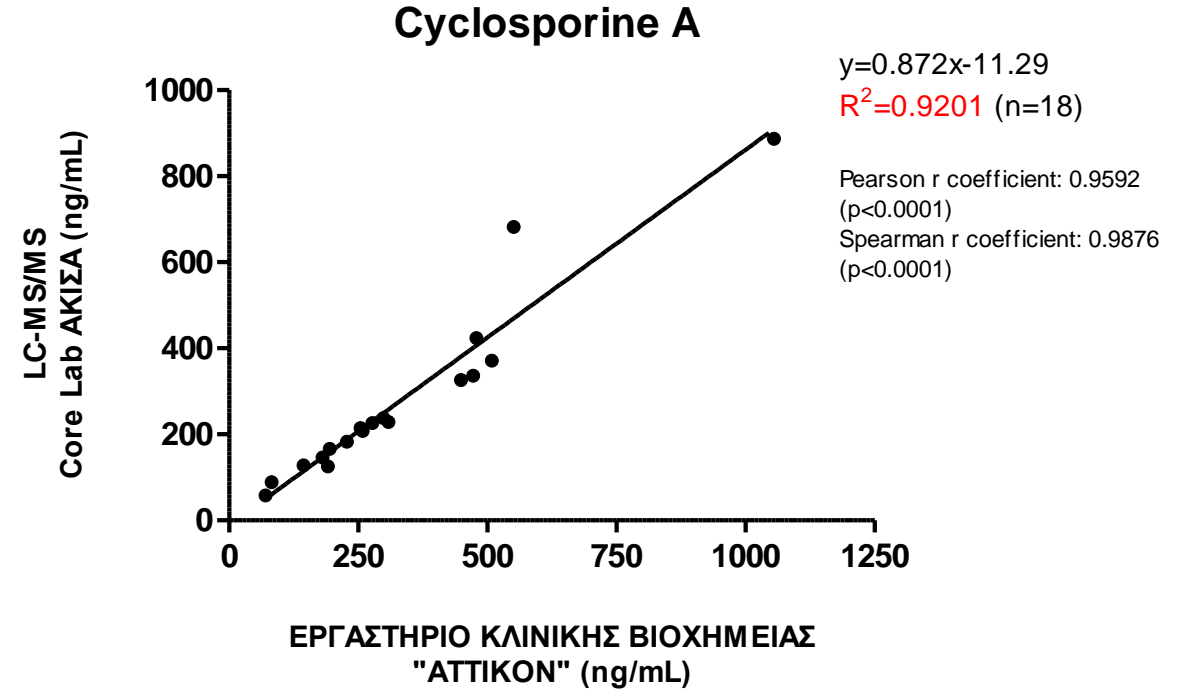


Α/Α Δείγματος (n=15)	Συγκέντρωση (ng/mL)	
	LC-MS/MS Core Lab AKISA	Chemiluminescent Immunoassay (CMIA) ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
1	3.2	3.2
2	1.3	1.0
3	6.9	9.5
4	3.3	4.3
5	2.7	3.6
6	6.1	7.1
7	10.4	15.3
8	6.5	10.5
9	7.6	10.6
10	10.7	13.9
11	1.4	1.5
12	3.7	4.2
13	2.9	4.6
Quality Control Sample 62	8.5	9.0
Quality Control Sample 64	10.0	10.0

Cyclosporine A

Correlation between ECLIA – LC-MS/MS

Α/Α Δείγματος (n=18)	Συγκέντρωση (ng/mL)	
	LC-MS/MS Core Lab ΑΚΙΣΑ	Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA) ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
1	371.0	509.0
2	336.2	472.7
3	57.6	70.81
4	326.2	448.8
5	214.3	254.3
6	229.1	308.7
7	886.7	1055.0
8	146.6	180.6
9	237.9	298.7
10	127.7	144.0
11	183.2	228.4
12	207.6	259.0
13	423.5	479.0
14	166.0	194.5
15	125.4	191.3
16	226.2	277.3
Quality Control Sample 61	682.4	550.9
Quality Control Sample 62	89.0	82.02



**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΥ (ΔΙΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΥ) ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ
ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ
ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ LC-MS/MS**

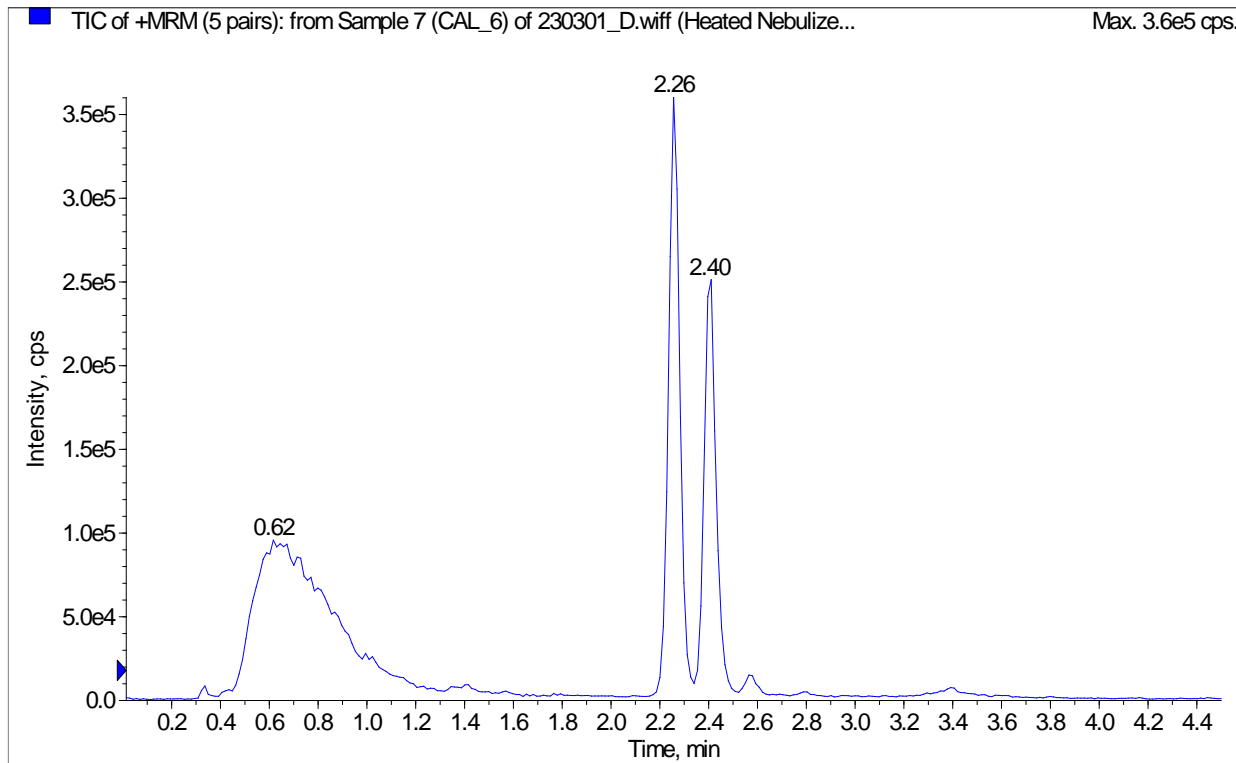
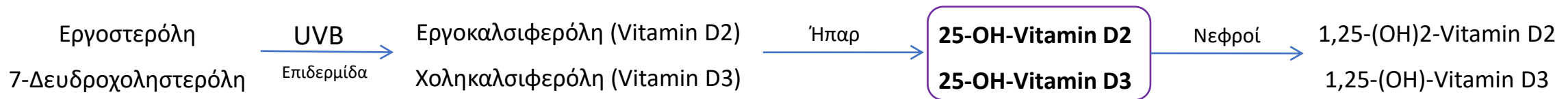


External Quality Assessment (EQA) schemes

Analyte	Sample	LC-MS/MS Target value (ng/mL)	LC-MS/MS Our value (ng/mL)	LC-MS/MS Target range (\pm 30%)	LC-MS/MS Number of participants	Z-score
Cyclosporine A	61	594	682.4	416 - 772	66	1.14
	62	81.2	89.0	56.8 - 106	66	0.86
Everolimus*	61	5.00	5.8	3.50 - 6.50	70	1.46
	62	4.20	5.2	2.94 - 5.46	70	2.18
Sirolimus*	63	3.52	3.8	2.46 - 4.58	71	0.79
	64	2.69	2.6	1.88 - 3.50	71	-0.24
Tacrolimus	62	7.28	8.5	5.10 - 9.46	68	2.57
	64	8.12	10.0	5.68 - 10.6	68	2.32

*ΔΕΝ προσδιορίζονται από το Βιοχημικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου «ΑΤΤΙΚΟΝ»

Προσδιορισμός 25-OH Βιταμίνης D3 & 25-OH-Βιταμίνης D2 στο πλάσμα



Αντανακλούν με μεγαλύτερη ακρίβεια τα αποθέματα βιταμίνης D του σώματος

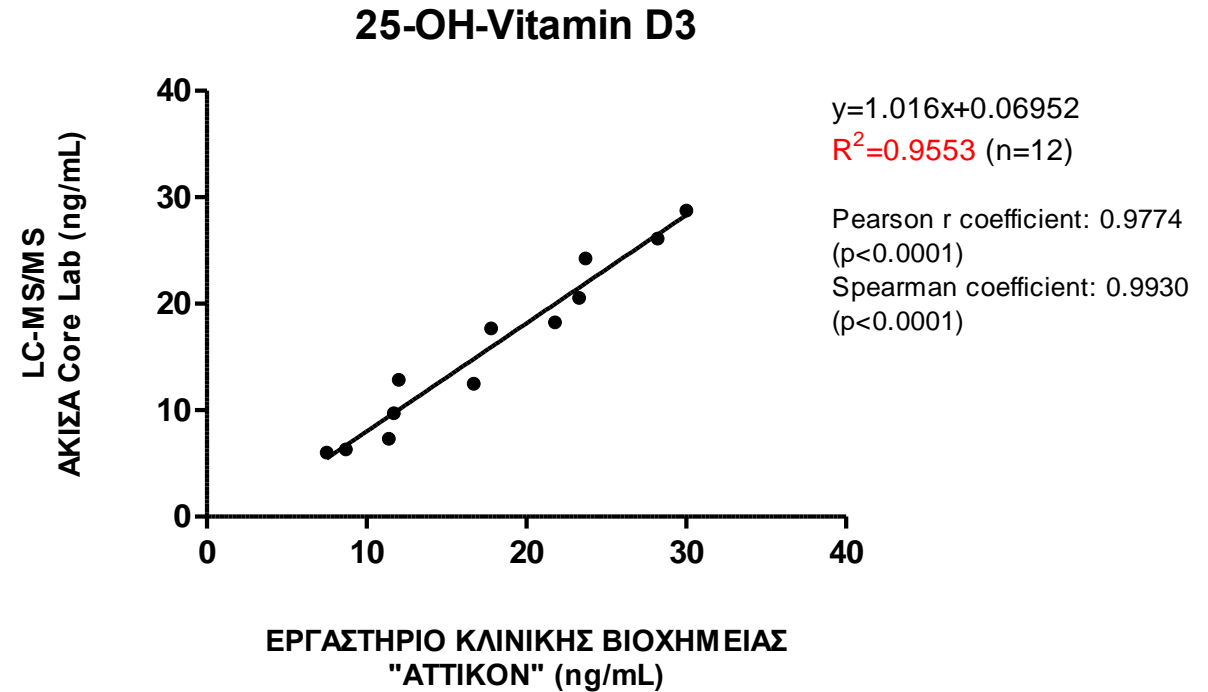
Βιολογικώς δραστική μορφή βιταμίνης D

Προσδιορίζονται με LC-MS

25-OH-Vitamin D3

Correlation between ECLIA – LC-MS/MS

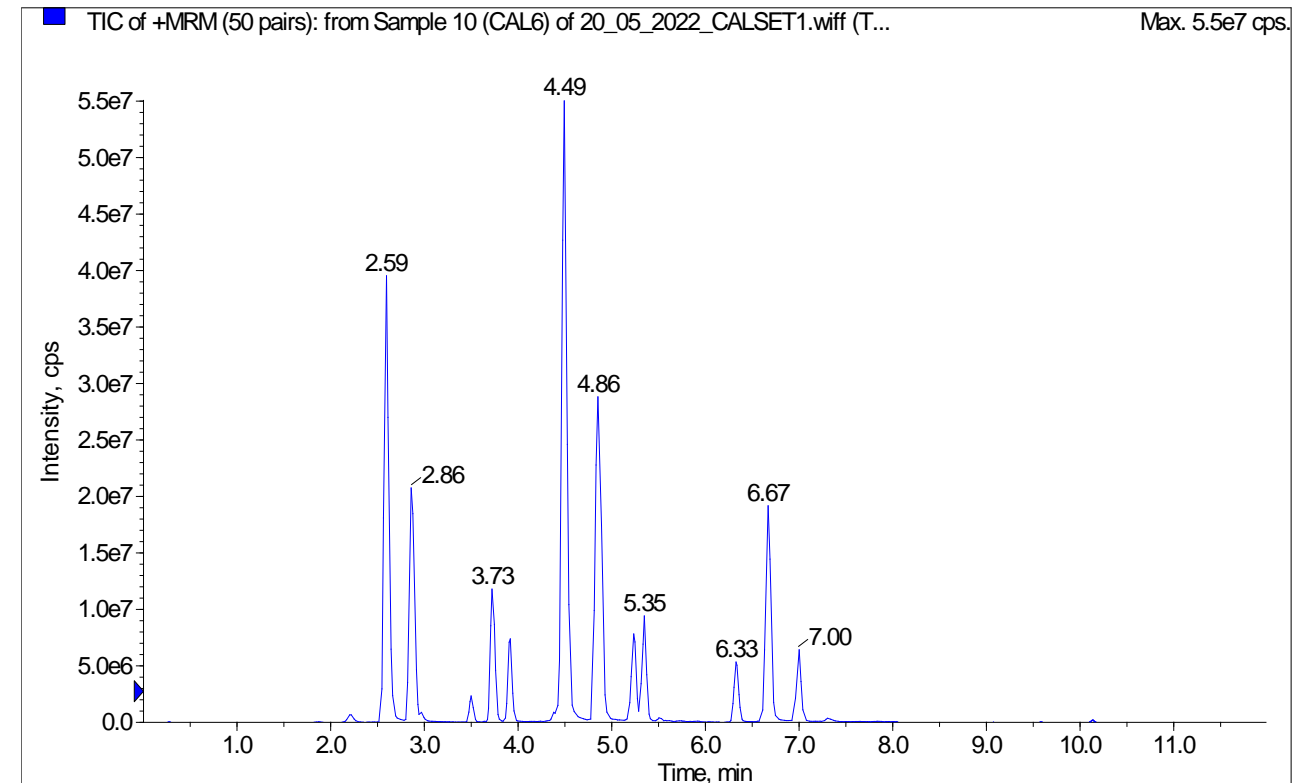
Α/Α Δείγματος (n=12)	Συγκέντρωση (ng/mL)	
	LC-MS/MS Core Lab ΑΚΙΣΑ	Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA) ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
1	24,24	23,70
2	28,75	30,00
3	9,71	11,70
4	12,48	16,70
5	12,84	12,00
6	20,54	23,30
7	26,13	28,20
8	18,24	21,80
9	17,69	17,80
10	7,33	11,40
11	6,01	7,49
12	6,33	8,70



ΚΙΤ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΑΝΕΛ 19 ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΟΝ ΟΡΟ/ΠΛΑΣΜΑ

Ανδρογόνα	Οιστρογόνα	Προγεσταγόνα	Κορτικοστεροειδή
Ανδροστερόνη	Οιστραδιόλη	Προγεστερόνη	Αλδοστερόνη
Ανδροστενεδιόνη	Οιστρόνη	17-OH-Προγεστερόνη	Κορτιζόλη
Τεστοστερόνη		Πρεγνενολόνη	Κορτιζόνη
Διυδροτεστοστερόνη (DHT)		17-OH-Πρεγνενολόνη	Κορτικοστερόνη
Δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA)			11-Δεοξυκορτιζόλη
Θεική Δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEAS)			21-Δεοξυκορτιζόλη
			11-Δεοξυκορτικοστερόνη



ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ - ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΣΤΟ ΑΚΙΣΑ

ΕΠΙΛΕΓΟΜΕΝΟ ΜΑΘΗΜΑ «ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ (23/05/2023, ΑΤΤΙΚΟΝ)

Συγκρότηση δύο ομάδων για εργαστηριακή άσκηση στο Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας στο Αττικό Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο (1^{ος} όροφος) στις 23 Μαΐου 2023 (15:00)

Προβλήματα στον προσδιορισμό ορμονών – Ο ρόλος της φασματομετρίας μάζας –επίδειξη φασματογράφου μάζας και προσδιορισμός της βιταμίνης D (**Χ.Βελεσιώτης , Μ.Καρβούνη, Π. Μουτσάτσου**, 4 ώρες)

ΜΟΝΤΕΛΟ NGS ΣΤΟ ΑΚΙΣΑ ?

*Αλληλουχητής νέας
γενιάς NGS*

Illumina
NextSeq™ 2000 System



NextSeq 2000 - Πλεονεκτήματα

Τελευταίας τεχνολογίας πλατφόρμα αλληλούχησης Νέας Γενιάς του οίκου Illumina, με καινοτόμα σχεδιαστικά χαρακτηριστικά, προηγμένη χημεία, απλοποιημένη βιοπληροφορική ανάλυση και απλή ροή εργασίας, συμβατά με μεγάλος εύρος εφαρμογών.



Υψηλή Κάλυψη και Multiplexing

Εφαρμογές υψηλής πολυπλοκότητας για μεγάλο αριθμό δειγμάτων σε μία εκτέλεση



Ευελιξία

Ιδανική πλατφόρμα για μεγάλο εύρος εφαρμογών, από μικρά panels και μικρά γονιδιώματα έως Whole Exome Sequencing και Ανθρώπινο Whole Genome Sequencing



Κλιμακωτή Απόδοση

Περιλαμβάνει ποικιλία αντιδραστηρίων sequencing και παρέχει δυνατότητα επιλογής της κατάλληλης διαμόρφωσης, για κάθε εφαρμογή, για λίγα ή πολλά δείγματα, για βέλτιστη απόδοση ανάλογα με το βάθος αλληλούχησης ή το μήκος αλληλούχησης που απαιτείται ανά περίπτωση



Εξαιρετικά Απλή Εμπειρία Sequencing

- Ενσωματώνει την πλατφόρμα αυτοματοποιημένης βιοπληροφορικής ανάλυσης **DRAGEN**
- Αυτοματοποίηση **αποδιάταξης και αραιώσης εντός του συστήματος**
- **Πλήρως αυτοματοποιημένο** – δεν απαιτεί καμία διαδικασία maintenance



Nextseq 2000 – Πλεονεκτήματα

Ευελιξία στη χρήση αναλωσίμων/αντιδραστηρίων



P1

≥ 85% Q30

Up to 100M

30 Gb

~ 19 Hrs

QUALITY
READS
OUTPUT
RUN TIME

P2

≥ 85% Q30

Up to 400M

40–120 Gb

~ 29 Hrs

QUALITY
READS
OUTPUT
RUN TIME

P3

≥ 85% Q30

Up to 1.2B

60 – 360 Gb

~ 48 Hrs



Πλεονεκτήματα Nextseq 2000

Πρωτόκολλα και αντιδραστήρια/ αναλώσιμα πολλών εταιριών συμβατά με τον αναλυτή



DNA

Targeted Panels
Whole Genome
Whole Exome
16S Metagenomics
cfDNA

RNA

miRNA
mRNA
3'transcriptome
Targeted Panels
Whole Transcriptome
Custom Targeted Panels

QIAseq SARS-CoV-2
Panel



DNA

Whole Genome
Whole Exome
Amplicon
Methylation
Custom panels
16S Metagenomics

RNA

miRNA
mRNA
Custom panels
Targeted RNA
Whole Transcriptome
Targeted Re-sequencing
COVID seq panel



Microbiota solution A / Microbiota solution B
SARS-CoV-2 S gene



Hereditary Diseases
Hereditary Cancer
Whole Exome
Clinical Exome
Cardio Solution
Custom Solutions

Myeloid Solution
Solid Tumor Solution
Custom Solutions



BRCA
CFTR
Thalassemia
FH



MICROBIOLOGY &
VIROLOGY APPLICATIONS
DEEPCHEK® ASSAYS



SARS-CoV-2 NGS Assay - EUA
Authorized by the FDA under
Emergency Use

Human Comprehensive Exome (WES)

ΕΝΑΡΞΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΑΝΑΛΥΤΗ
NextSeq 2000 ΣΤΟ ΑΚΙΣΑ
ΥΠΕΥΘΥΝΗ Α.ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ

- ❖ Εγκατάσταση του αλληλουχητή νέας γενιάς NextSeq 2000 στο ΠΓΝ ΑΤΤΙΚΟΝ (2022)
- ❖ Θεωρητική εκπαίδευση για τις εφαρμογές και τη λειτουργία του αλληλουχητή νέας γενιάς NextSeq 2000 από την προμηθεύτρια εταιρεία (2022)
- ❖ Πρακτική εκπαίδευση για την οργάνωση, λειτουργία και πραγματοποίηση πειραμάτων στον αλληλουχητή νέας γενιάς NextSeq 2000 (2022)



ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΓΙΑ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΛΥΤΗ NextSeq 2000

- *Εισαγωγή στην Τεχνολογία και Αρχή Μεθόδου Next Generation Sequencing του οίκου Illumina*
- *Βασικές Αρχές Μεθοδολογιών Προετοιμασίας Βιβλιοθηκών*
- *Αναλυτική Εκπαίδευση στις Λειτουργίες, τα Χαρακτηριστικά, και τις Πρακτικές Χρήσης του συστήματος NextSeq 2000*
- *Διαδικασία και Βέλτιστες Πρακτικές Ελέγχου ενός run NGS στο σύστημα NextSeq 2000*
- *Ανάλυση των Εφαρμογών που μπορούν να πραγματοποιηθούν στο σύστημα NextSeq 2000*
- *Εισαγωγή σε Βασικές Αρχές Βιοπληροφορικής Ανάλυσης*
- *Εισαγωγή στην Αυτοματοποιημένη Βιοπληροφορική Ανάλυση μέσω της πλατφόρμας DRAGEN, που βρίσκεται ενσωματωμένη στο σύστημα NextSeq2000*

ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

16 δείγματα ασθενών, βιολογικό υλικό: αίμα (13), FNA (3)

- 6 ασθενείς με κλινική διάγνωση ατελούς οστεογένεσης (προέλευση Γ' Παιδιατρική Κλινική ΠΓΝ «Αττικό», ΓΝΑ «Λαϊκό»)
 - 2 ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα (προέλευση Γ' Παιδιατρική Κλινική ΠΓΝ «Αττικόν»)
 - 3 ασθενείς με ενδοκρινολογικές διαταραχές (προέλευση Γ' Παιδιατρική Κλινική ΠΓΝ «Αττικόν»)
 - 1 ασθενής με πιθανό σύνδρομο CADASIL και αρνητικό γενετικό έλεγχο για τις πιο συχνές μεταλλάξεις στο γονίδιο *NOTCH3* (προέλευση Β' Νευρολογική Κλινική, ΠΓΝ «Αττικόν»)
 - 3 ασθενείς με καρκίνο θυρεοειδούς με αρνητικό αποτέλεσμα για τις πιο συχνές μεταλλάξεις (δείγματα FNA)
 - 1 ασθενής με κλινική διάγνωση νευροϊνωμάτωσης (προέλευση Β' Κλινική Δερματικών και Αφροδίσιων νόσων, ΠΓΝ «Αττικόν»)
-

ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΑΝΕΛ ~5000 ΓΟΝΙΔΙΩΝ (Clinical Exome)

Clinical Exome Solution V3 by Sophia Genetics



Περιεχόμενο:	Το SOPHIA Clinical Exome Solution v3, καλύπτει τις κωδικοποιούσες περιοχές ($\pm 5\text{bp}$ εσωνικών περιοχών) 4,727 γονιδίων, ολόκληρο το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, και ~ 200 γνωστά παθογόνα variants σε μη κωδικές περιοχές (εσώνια/ενισχυτές/υποκινητές) που σχετίζονται με σπάνιες κληρονομούμενες διατραχές (probe footprint of 16 Mb).
Μεθοδολογία:	Enrichment
Χρόνος προετοιμασίας:	2 days
Ποσότητα Αρχικού υλικού:	50 ng DNA
Αριθμός δειγμάτων ανά run:	NextSeq 2000 P1: 16, P2: 64
Coverage:	$\geq 50\times$
Προτεινόμενο Read-length:	2 × 150 bp
Δευτερογενής Ανάλυση:	Sophia DDM

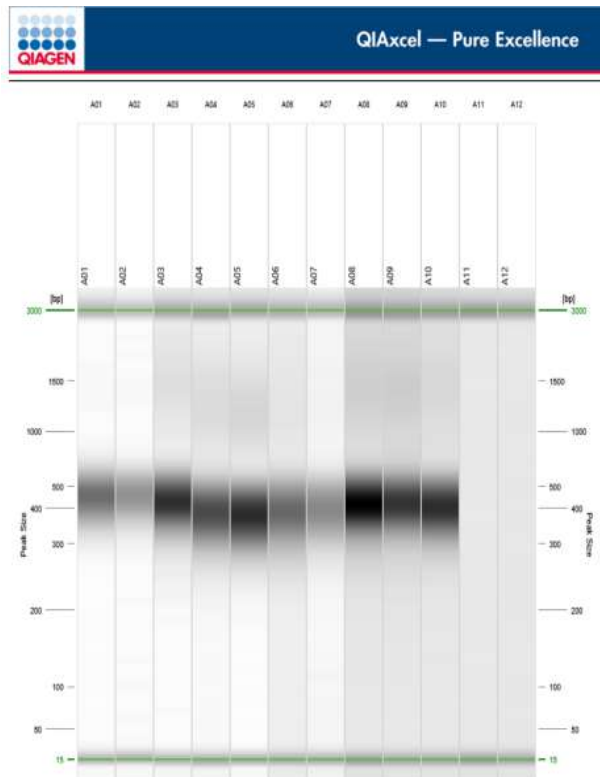
ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Απομόνωση DNA από τα επιλεγμένα δείγματα ασθενών και «δημιουργία βιβλιοθηκών»:

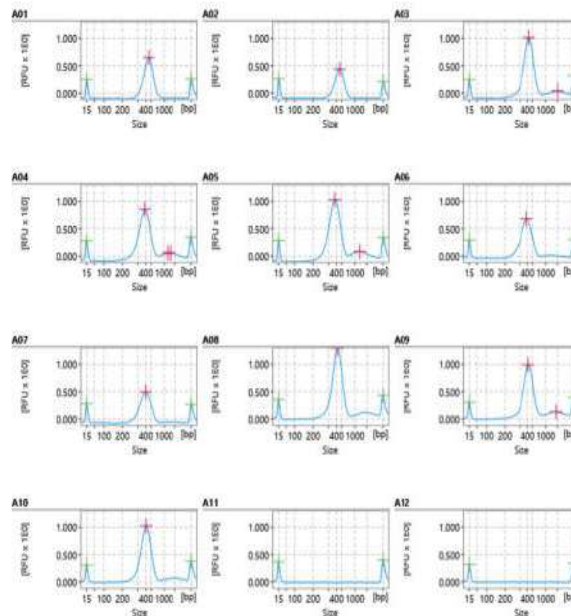
- α. Αξιοποίηση του εργαστηριακού χώρου στη Μονάδα Έρευνας του ΠΓΝ «Αττικόν», καθώς ο χώρος στο ΑΚΙΣΑ δεν ήταν ακόμη έτοιμος (Ιούνιος – Ιούλιος 2022)
- β. Αξιοποίηση του ήδη υπάρχοντος εργαστηριακού εξοπλισμού Κλινικών και Εργαστηρίων του ΠΓΝ «Αττικόν» που φιλοξενούνται στη Μονάδα Έρευνας
- γ. Παροχή συμπληρωματικού εργαστηριακού εξοπλισμού από την προμηθεύτρια εταιρία του συστήματος αλληλούχησης



ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ «ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ»



QIAxcel — Pure Excellence



QIAxcel — Pure Excellence

Sample Header			
Position:	A1	Run Date:	6/27/2022 3:36:05 PM
Plate ID:	C211020142 2022-06-27 15-36-05, R: 1, E: 1		

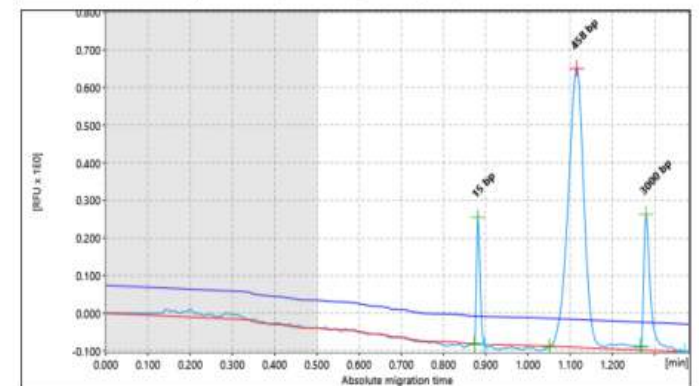


Figure: 3

Result Table			
#	Size [bp]	#	Size [bp]
1	15	2	458
3	3000		

Sample Header			
Position:	A2	Run Date:	6/27/2022 3:36:05 PM
Plate ID:	C211020142 2022-06-27 15-36-05, R: 1, E: 1		

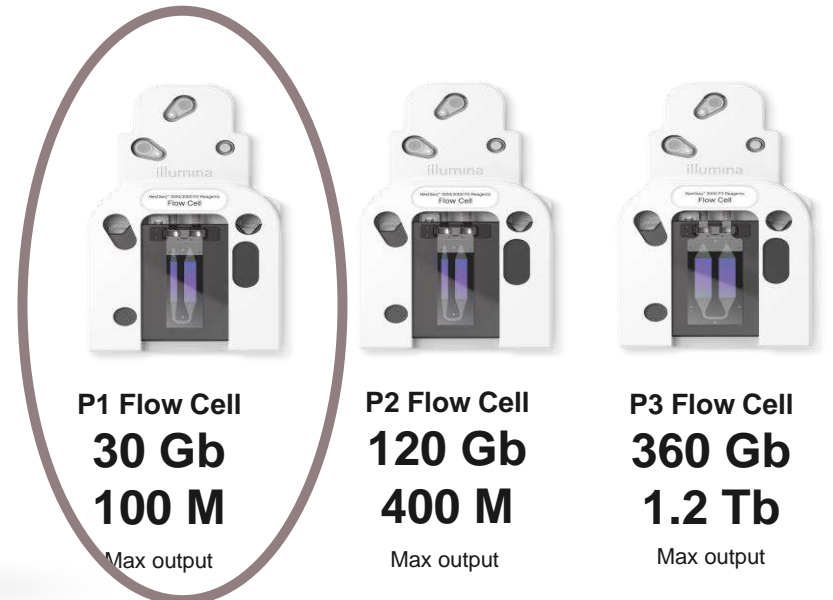
Έλεγχος μεγέθους των ενισχυμένων γενομικών περιοχών

ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ

- Το τελικό προϊόν (βιβλιοθήκη) μεταφέρεται στον αναλυτή με τα κατάλληλα αντιδραστήρια



NextSeq 2000 System



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ - % ΚΑΛΥΨΗΣ

Sample ID	25×	50×	100×	200×	500×	1000×
328997-1-S1	97.87%	77.93%	16.66%	1.35%	0.26%	0.18%
328998-2-S2	97.12%	70.94%	10.89%	1.19%	0.25%	0.16%
328999-3-S3	97.46%	78.70%	21.89%	1.69%	0.33%	0.19%
329000-4-S4	99.44%	96.47%	69.77%	11.33%	0.72%	0.25%
329001-5-S5	98.67%	86.58%	30.01%	2.10%	0.32%	0.20%
329002-6-S6	96.72%	74.41%	15.53%	1.32%	0.26%	0.19%
329003-7-S7	97.58%	75.03%	12.70%	1.14%	0.25%	0.18%
329004-8-S8	98.41%	84.08%	28.49%	2.03%	0.33%	0.19%
329005-9-S9	98.98%	90.14%	37.44%	2.60%	0.33%	0.20%
329006-10-S10	98.65%	89.64%	39.39%	2.64%	0.33%	0.18%
329007-11-S11	98.64%	90.08%	41.12%	2.76%	0.36%	0.20%
329008-12-S12	96.90%	76.28%	15.22%	1.15%	0.26%	0.18%
329009-13-S13	98.59%	87.35%	27.11%	1.78%	0.27%	0.18%
329010-14-S14	98.96%	90.28%	34.25%	2.34%	0.32%	0.19%
329011-15-S15	98.84%	89.03%	39.57%	3.48%	0.40%	0.20%
329012-16-S16	98.68%	88.65%	36.58%	2.51%	0.37%	0.19%

1.5 Sample correlation for CES_v3 gene panel

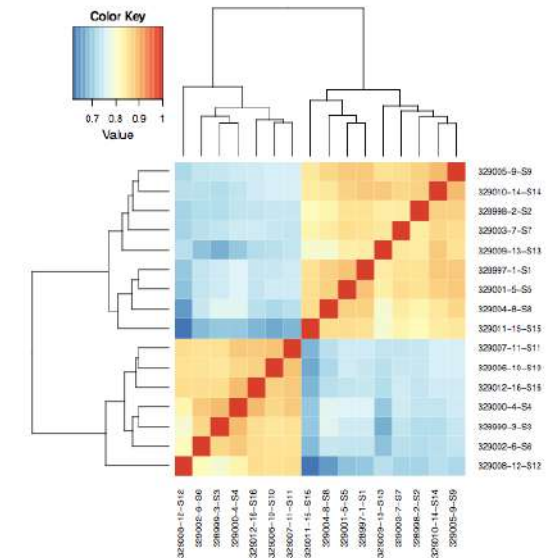


Figure 1.8: Pairwise Pearson correlation of the log transformed target region coverage is illustrated as a heatmap. Colors indicate the level of correlation between samples. The lowest correlation is associated with blue and the highest with red. However, even the lowest correlation might still be high. Please, check the color key in the top left corner.

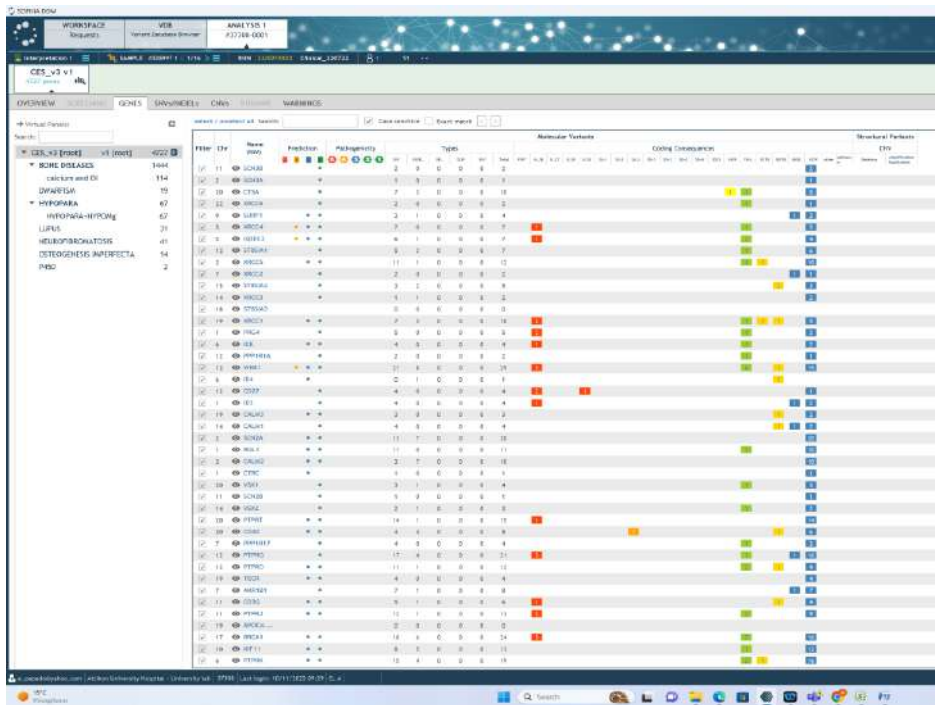
ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- **Δευτερογενής ανάλυση: Automated Variant calling**
 - Ενσωματωμένη πλατφόρμα δευτερογενούς ανάλυσης
Illumina DRAGEN Bio-IT Platform
 - Illumina Base Space Sequence Hub
 - **Sophia DDM**
- **Τριτογενής ανάλυση: Biological annotation of v**
 - Variant annotation and filter tools
 - **Sophia DDM**



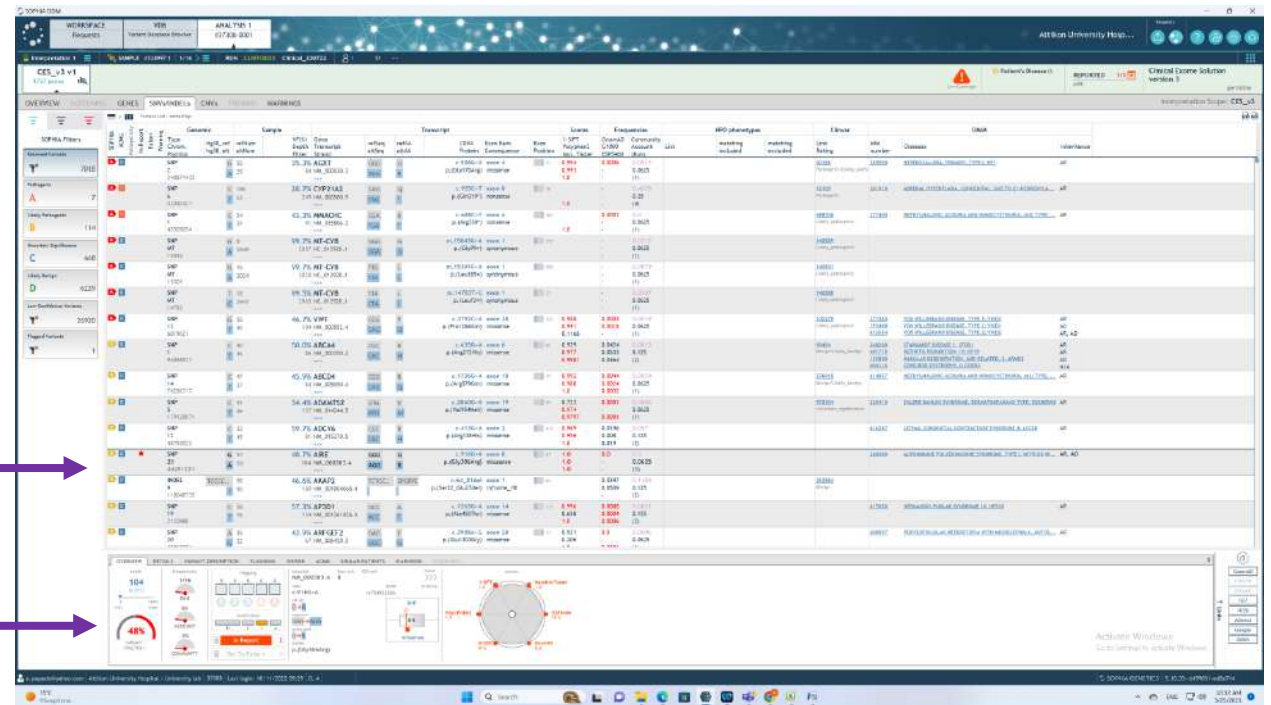
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΡΙΤΟΓΕΝΟΥΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Παράδειγμα: Ασθενής Νο 1,
Κλινική διάγνωση: υποπαραθυροειδισμός (αρνητικό αποτέλεσμα μοριακού ελέγχου για *CaSR*)



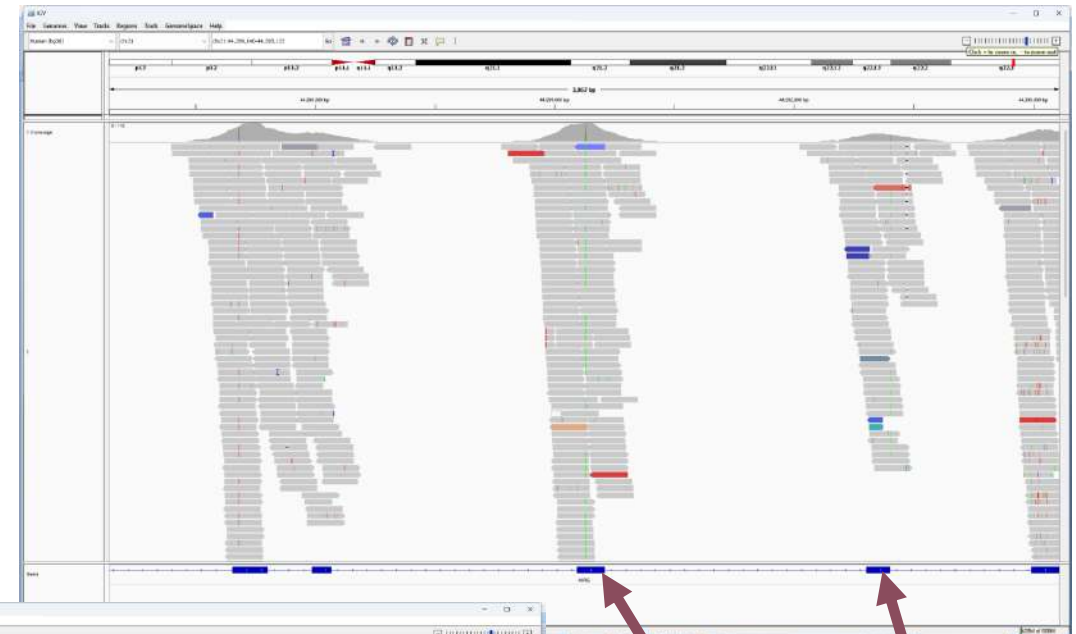
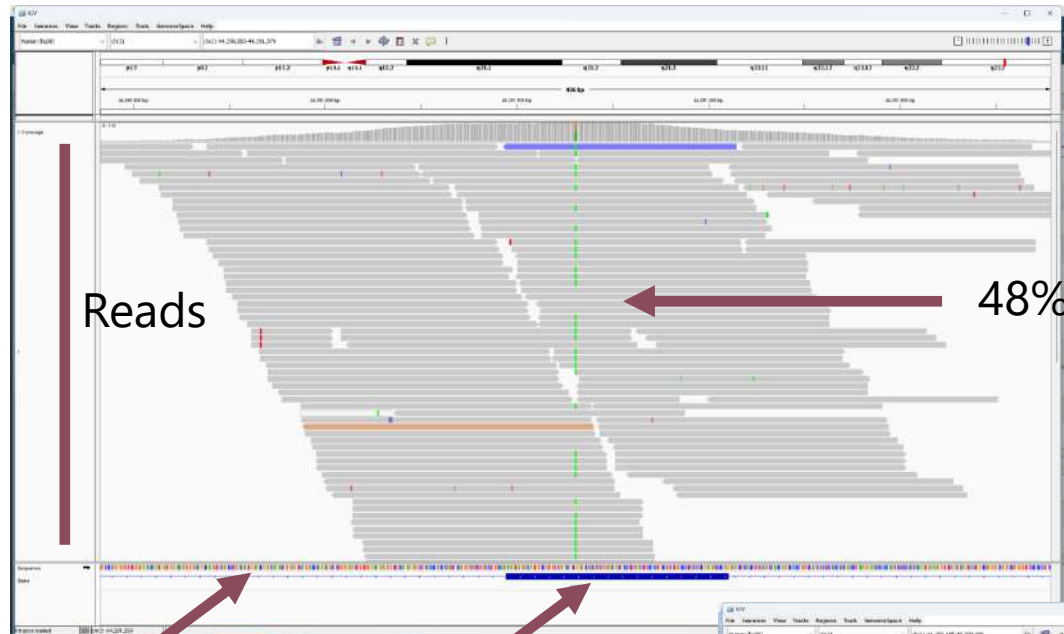
Γονίδιο

Γενετικές αλλαγές που ανιχνεύθηκαν στον ασθενή



Εντοπισμός παθολογικών γενετικών παραλλαγών σχετικών με την κλινική διάγνωση

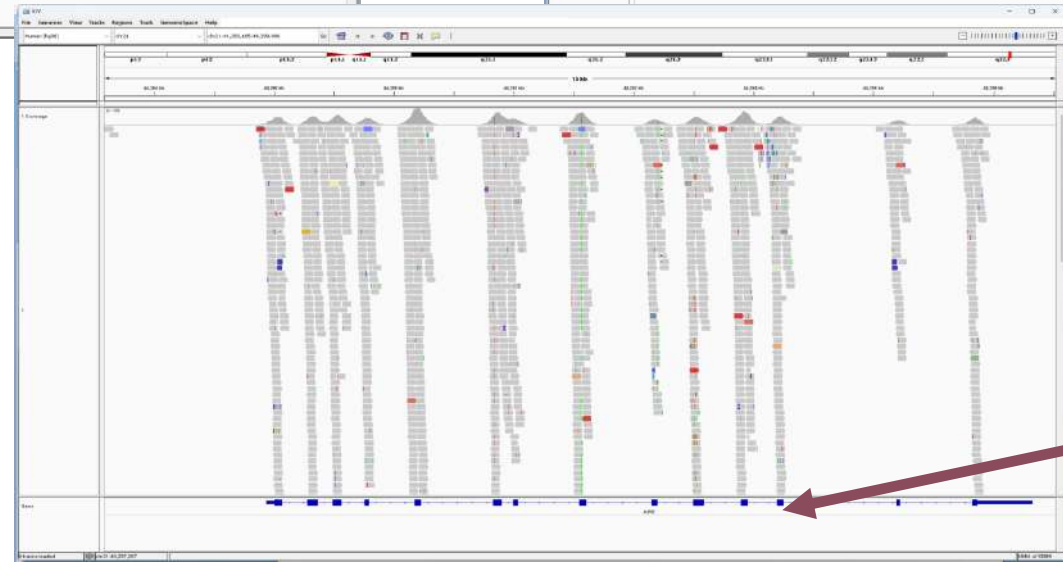
IGV: Απεικόνιση των «διαβασμάτων» σε διάφορες μεγεθύνσεις



Αλληλουχία αναφοράς

Εξόνιο γονιδίου AIRE

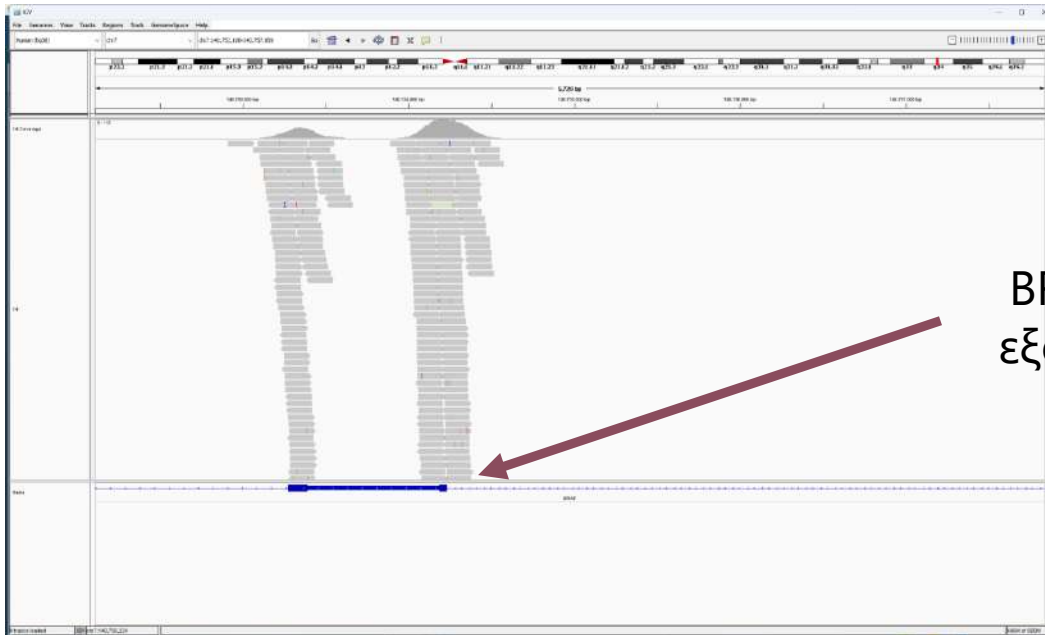
Εξόνια γονιδίου AIRE (έλεγχος πλήρους κάλυψης των υπό εξέταση γενομικών)



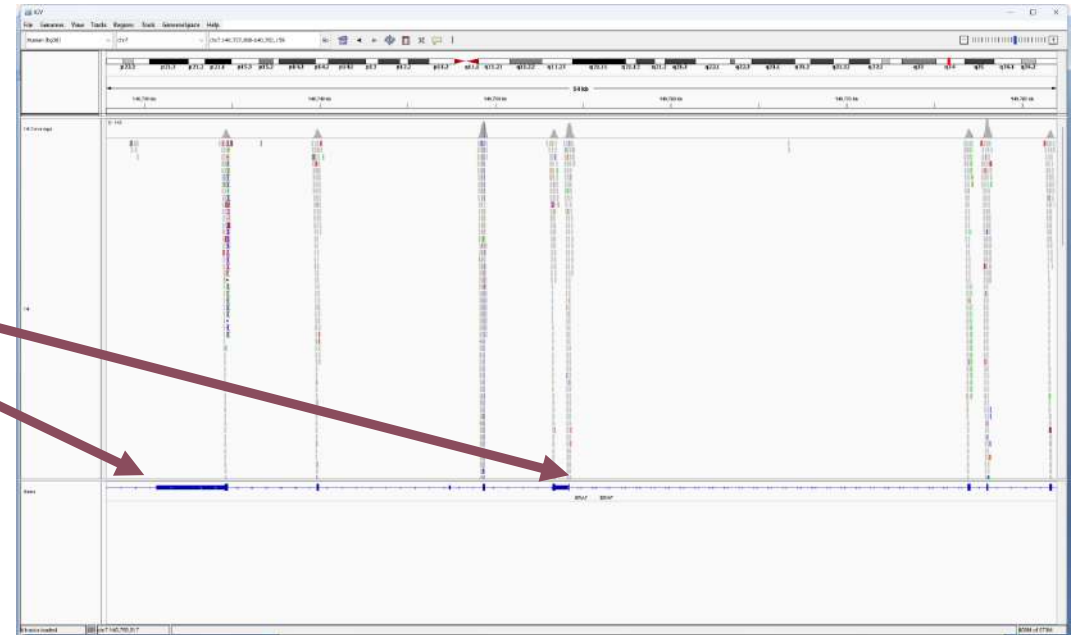
**Παράδειγμα: Ασθενής Νο 14, δείγμα FNA
Θυρεοειδής, όζος 20mm, Bethesda IV
Μοριακό έλεγχο καρκίνου θυρεοειδούς**

Στα δείγματα FNA που αναλύθηκαν με NGS είχε προηγηθεί μοριακός έλεγχος για συγκεκριμένες παθολογικές παραλλαγές σε επιλεγμένα γονίδια (πάνελ), ο οποίος είχε διενεργηθεί στο Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας με **Sanger Sequencing** και ήταν **αρνητικός**. Τα γονίδια του πάνελ: BRAF, HRAS, NRAS, KRAS, PIK3CA, TERT, EIF1AX, AKT1, αναλύθηκαν σε όλη τους την έκταση με το NGS.

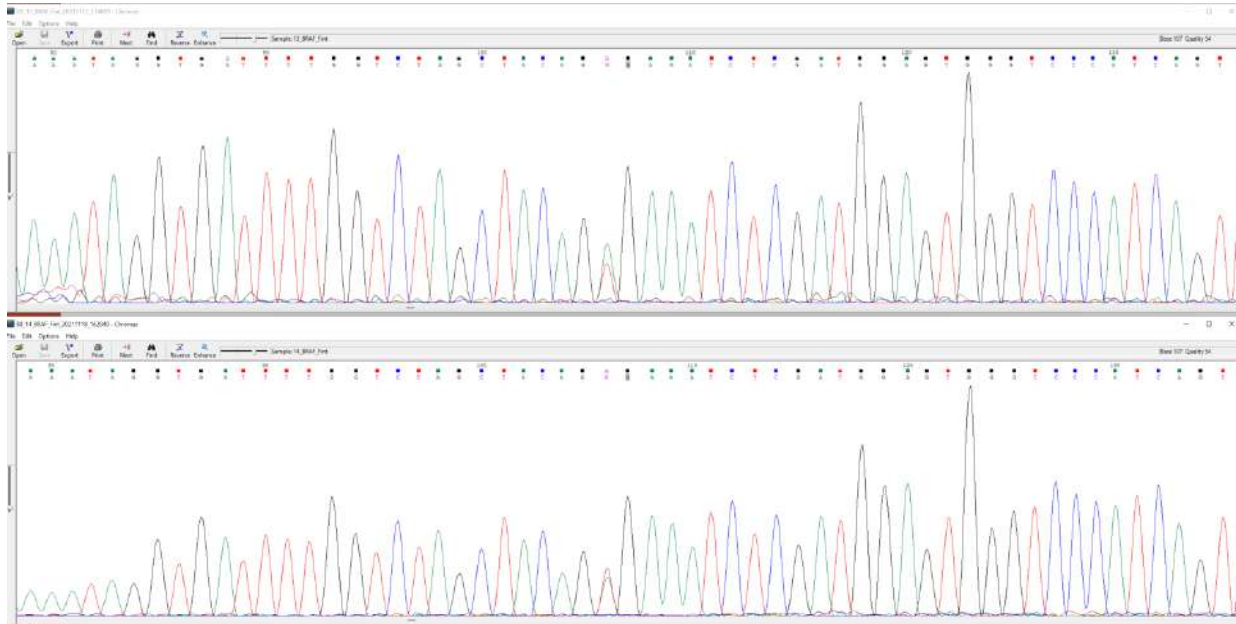
Αποτέλεσμα με NGS επίσης αρνητικό!



BRAF,
εξόνια



Επαλήθευση των Ευρημάτων με Sanger Sequencing



SeqStudio, ThermoFisher Scientific, Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας, ΠΓΝ «Αττικόν»

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΓΝ ΑΤΤΙΚΟΝ)

A. NGS

1. ANNA PAPAΔOPOYΛOY , ΕΔΙΠ, (ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΕΡΓΑΣΙΩΝ NGS)

2. Ioanna Kokkinopoulou, Biologist, MSc, PhD, Post-Doc

«ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ» ΕΣΠΑ 2014-2020 (ΒΙΟΑΛΓΑFOOD)

«ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ» ΕΣΠΑ 2014-2020 (TASTE STEVIA)

«ΔΙΜΕΡΕΙΣ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΕΡΕΙΣ Ε&Τ ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΕΣ» Συνεργασία Ελλάδας-Κίνας ΕΣΠΑ 2014-2020 (PROBIYO)

«ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ Β' ΚΥΚΛΟΣ» ΕΣΠΑ 2014-2020 (OMEGA-3 NUTRICARE)

3. Adriana Diakoumi, Biologist, MSc

«ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ Β' ΚΥΚΛΟΣ» ΕΣΠΑ 2014-2020 (OMEGA-3 NUTRICARE)

B. LC-MS/MS

1. Christos Velesiotis, Chemist, MSc, PhD Candidate (ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΕΡΓΑΣΙΩΝ LC-MS/MS)

«ΔΙΜΕΡΕΙΣ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΕΡΕΙΣ Ε&Τ ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΕΣ» Συνεργασία Ελλάδας-Κίνας ΕΣΠΑ 2014-2020 (PROBIYO)

«ΔΙΜΕΡΕΙΣ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΕΡΕΙΣ Ε&Τ ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΕΣ» Συνεργασία Ελλάδας-Κίνας ΕΣΠΑ 2014-2020 (WASTE2PLASTICS)

«3η Προκήρυξης Υποτροφιών ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. για Υποψήφιους Διδάκτορες»

2. Maria Karvouni, Chemist, MSc

«ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ Β' ΚΥΚΛΟΣ» ΕΣΠΑ 2014-2020 (OMEGA-3 NUTRICARE)