

VYŠETŘENÍ BÍLKOVIN V KREVNÍM SÉRU A V MOČI. STANOVENÍ DUSÍKATÝCH LÁTEK.

Témata k zopakování

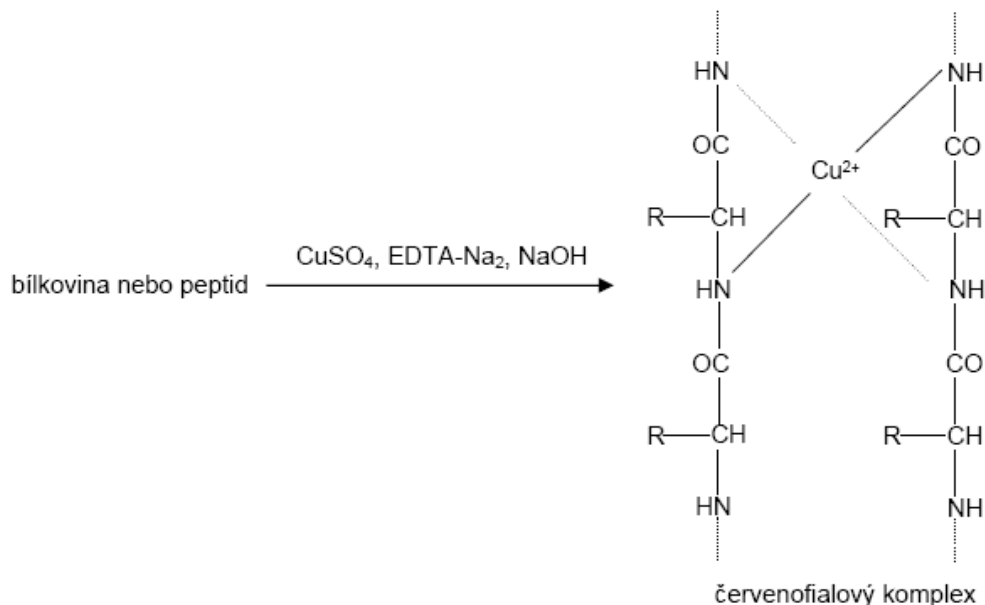
Proteiny v krevní plazmě, jejich funkce. Elektroforéza proteinů krevní plazmy. Proteinurie a její typy

Úvod

V krevní plazmě se nachází několik desítek různých bílkovin. Liší se svým zastoupením, funkcí a strukturou. Většina bílkovin plazmy s výjimkou imunoglobulinů je syntetizována v játrech. Z hlediska funkce lze bílkoviny v plazmě klasifikovat do několika skupin: jsou to bílkoviny s transportní funkcí, bílkoviny bránící infekci, bílkoviny zapojené do srážení krve a fibrinolýzy, enzymy a jejich inhibitory, bílkoviny chránící před účinkem volných radikálů a další. Bílkoviny v plazmě mají dále význam pro udržení koloidně-osmotického tlaku a acidobazické rovnováhy, plní rovněž funkci pohotové proteinové rezervy.

1.1 Stanovení celkových proteinů v séru biuretovou reakcí

Látky obsahující peptidovou vazbu reagují s ionty Cu^{2+} v alkalickém prostředí za vzniku červenofialového komplexu. Měří se absorbance v pásu kolem 550 nm.



Standardní biuretové činidlo obsahuje NaOH 0,6 mol/l, vinan sodno-draselný 32 mmol/l, síran měďnatý 12 mmol/l a KI 30 mmol/l. Po smíchání séra s biuretovým činidlem reaguje alkalický roztok

mědi okamžitě s dostupnými povrchovými peptidovými vazbami a reakce dobíhá, jak se postupně obnažují další vazby při denaturaci bílkoviny.

Hodnocení

Referenční rozpětí koncentrace celkových proteinů v krevním séru 65–85 g/l.

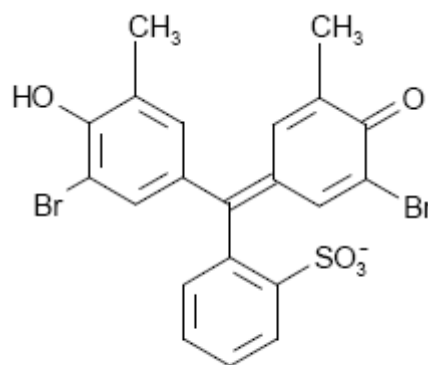
K *hypoproteinemii* dochází při poruše proteosyntézy u jaterních chorob, u podvýživy a v průběhu těžkých akutních infekčních chorob nebo rozsáhlých nádorových onemocnění, též při nadměrných ztrátách albuminu v exsudátech nebo moči. Relativní pokles koncentrace nastává při zředění plazmy (objemné infúze nebo zástava vylučovací činnosti ledvin).

Hyperproteinemie je méně častým nálezem. Příčinou bývá dehydratace organismu při nadměrné ztrátě tekutin (dlouhodobé žíznění, vysilující průjmy, zvracení), nebo zvýšená syntéza imunoglobulinů (např. v průběhu chronických zánětů nebo u tzv. gamapatií).

1.2 Stanovení albuminu v séru

Albumin je kvantitativně nejvýznamnější protein krevní plazmy. Jeho hlavní funkce jsou udržení onkotického tlaku krevní plazmy, pufrací účinek a funkce transportní. Je syntetizován v hepatocytech a odtud uvolňován do plazmy, u dospělých asi 14 g za den. Poločas odbourání je přibližně 19 dní.

Princip: Albumin váže poměrně specificky bromkresolový purpur (5,5'-dibrom-*o*-kresol-sulfoftalein, BCP). Toto barvivo je acidobazický indikátor s barevným přechodem v rozpětí pH 5,2–6,8 a jeví jako některé jiné indikátory tzv. *proteinovou chybu*, to znamená že absorpční maximum komplexu albumin-barvivo se posouvá k vyšší vlnové délce. Reakce probíhá ve slabě kyselém prostředí, za přítomnosti povrchově aktivních látek. Obecně se využívají ta barviva, která tvoří ochotněji komplex s albuminem než s ostatními bílkovinami séra. Na stejném principu spočívá i detekce proteinurie diagnostickými proužky albuPHAN. Protože lidský a animální (např. bovinní) albumin mají různé afinity k barvivu, kalibrace musí být prováděna lidským albuminem.



bromkresolový purpur (BCP)

Hodnocení

Referenční rozpětí koncentrace albuminu v krevním séru je 35–53 g/l. Zvýšení koncentrace albuminu nastává zřídka, obvykle je známkou dehydratace.

Hypoalbuminemie je nejčastěji odrazem buď snížené proteosyntézy v jaterních buňkách (patologické procesy v játrech nebo nedostatečný přívod bílkovin potravou) nebo nadměrných ztrát albuminu (např. močí, u rozsáhlých popálenin nebo u chronických zánětů trávicího ústrojí), které nemohou být kompenzovány ani zvýšenou proteosyntézou v játrech. Hodnoty jsou ovlivněny také změnami jeho distribuce (únik do ascitu). Albumin má poločas 15–20 dnů, neklesá tedy u akutních poruch. U chronických jaterních chorob jeho hladina postupně klesá, obvykle se současným vzestupem gama-globulinů, takže celková koncentrace bílkovin se nemění. Hladina albuminu klesá i u pokročilých cholestáz, současně stoupají β -globuliny. Výrazné snížení je typické hlavně pro alkoholické cirhózy, kdy se přidruží i porucha výživy a nepříznivý vliv alkoholu na proteosyntézu.

Elektroforéza proteinů

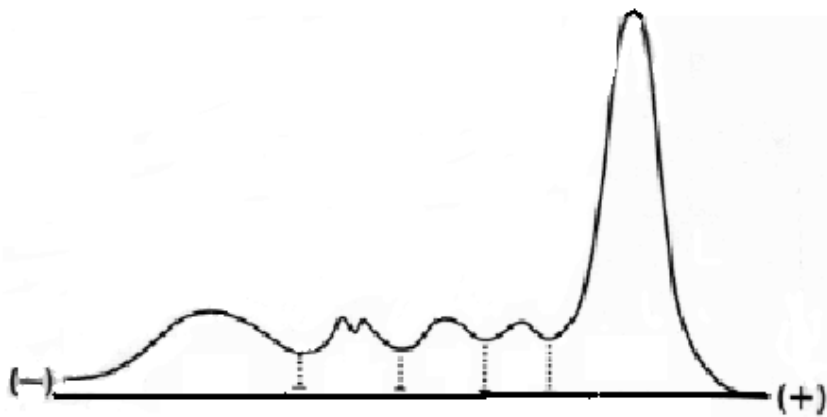
Elektroforéza lze použít k separaci a kvantitativnímu hodnocení hlavních proteinových frakcí lidského séra. Proteiny migrují v elektrickém poli různou rychlostí, která závisí na jejich struktuře, elektrickém napětí, pufru (pH a iontová síla), elektroosmóze a charakteru nosiče.

Indikace tohoto vyšetření jsou:

1. diagnostika nebo kontrola průběhu zánětlivých onemocnění, hepatopatií, onemocnění se ztrátami bílkovin (nefrotický syndrom, exsudativní enteropatie, popáleniny), maligních tumorů, revmatických chorob, paraproteinemií,
2. doplňkové vyšetření při patologickém nálezu jiných laboratorních testů (zvýšení sedimentace erytrocytů, proteinurie, hypoproteinemie apod).

Hodnocení

Proteiny lidského séra se rozdělí do 5 základních zón. Elektroforeogram se hodnotí denzitometricky při vlnové délce 570 nm jako podíl integrované absorbance jednotlivých frakcí z celkové absorbance separovaného vzorku. Orientační hodnocení lze provést i vizuálně.



ící pohyblivosti):

Proteinová frakce	Charakteristika	Referenční rozmezí	Příklady
Albumin	výrazný pás v čele	0,52–0,70	Prealbumin, albumin
α_1 -Globuliny	nevýrazný úzký pás	0,02–0,05	α_1 -Glykoprotein, α_1 -antitrypsin
α_2 -Globuliny	difúzní pás	0,05–0,10	Ceruloplasmin, haptoglobin
β -Globuliny	často rozděleny na β_1 a β_2	0,06–0,13	Transferrin, fibrinogen
γ -Globuliny	velmi široký pás	0,10–0,19	Imunoglobuliny

Pro některé patologické stavy jsou změny ve spektru sérových proteinů charakteristické. V rané fázi akutních zánětlivých onemocnění dochází ke zvýšení α_1 - a α_2 -globulinů (tzv. *reaktantů akutní fáze*), později se zvyšují γ -globuliny a snižuje albumin. Pro chronické záněty je typické zvýšení γ -globulinů. Rovněž další onemocnění jsou spojena s výraznými změnami spektra proteinů, např. nefrotický syndrom, některé maligní tumory, mnohočetný myelom a jiné monoklonální gamapatie.

Podrobnější dělení základních elektroforetických frakcí umožňují imunoelektroforetické metody.

Bílkovinné frakce při elektroforéze krevního séra

Prealbumin

Transtyretin |

Transportní protein pro tyreoidální hormony (hlavně T_4). Vytváří komplex s retinol-binding proteinem (RBP) - transportuje vitamin A. Brání ztrátám vit.A do moči.

Snížení:

- proteinová malnutrice
- těžké hepatopatie

Alfa1-globuliny

Alfa1 frakce

- alfa1-inhibitor proteáz (alfa1-antitrypsin) – vzniká v játrech, zvýšená koncentrace při zánětech. Snižovaná koncentrace u těžkých hepatopatií.

- alfa1-kyselý glykoprotein (orozomukoid) – vzniká v játrech, stoupá u akutních zánětů, klesá při porušení proteosyntézy.
- alfa1-fetoprotein – tumorový marker
- alfa1-lipoprotein (HDL)
- alfa1-mikroglobulin – stoupá při snížení glomerulární filtrace

Alfa2-globuliny

Alfa2 frakce

- alfa2-makroglobulin – inhibitor endoproteáz. Velká molekula, špatně proniká glomerulem, koncentrace bývá zvýšená u nemocných s nefrotickým syndromem. Klesá u akutní pankreatitidy.
- haptoglobin – váže pevně molekulu hemoglobinu, komplex je rychle vychytán buňkami RES. Vyrůstá u akutních stavů. Pokles při poruchách proteosyntézy v játrech. Nízká až téměř neměřitelná koncentrace svědčí pro intravaskulární hemolýzu.
- Ceruloplazmin - váže a transportuje měď. Fyziologicky vyrůstá v těhotenství
- Feritin – zásobní bílkovina obsahující Fe, v krvi normálně nízká koncentrace

Beta-globuliny

Beta frakce

- transferin – syntéza v játrech. Transportuje Fe. Vyrůstá při nedostatku Fe v organismu. Vznikne-li nedostatek Fe následkem malnutrice a chybějí-li současně i bílkoviny, k vzestupu koncentrace transferinu nedochází. Pokles nastává při přebytku Fe a porušené proteosyntéze. U alkoholiků – bezsacharidový transferin (CDT)
- hemopexin – váže hem. Koncentrace klesá u hemolytické anémie a stoupá u akutních stavů.
- složky komplementu (C3 a C4) – komplement = komplex proteinů obsažených v neaktivní formě v plazmě. Nejčastěji se stanovuje C3 a C4. Jejich aktivace nastává při akutní zátěži.
- beta-lipoprotein (LDL)
- beta2-mikroglobulin – je součástí HLA systému na povrchu buněk. Tumorový marker. Zvýšená koncentrace může být příčinou amyloidózy
- C-reaktivní protein - bílkovina krevní plazmy, jejíž označení se odvozuje od schopnosti vázat se na polysacharidový obal pneumokoků C. Má významnou roli při nespecifické imunitní odpovědi, která se objevuje v počáteční fázi po penetraci antigenů do organismu a působí při stimulaci fagocytózy. CRP je dominující bílkovina akutní fáze s rychlou odpovědí (začíná po 6 h, max. za 48 h). Její koncentrace významně stoupá při zánětlivé reakci a při maligním nádorovém bujení
- Fibrinogen – plazmatická bílkovina. Pohybuje se mezi frakcemi β a γ . Vzestup je součástí akutní odpovědi organismu, vysoké koncentrace u zánětů. Pokles u hepatopatií nebo zvýšenou spotřebou (intravaskulární koagulopatie).

Gama-globuliny

Gama frakce

- Ig G – největší podíl plazmatických imunoglobulinů.
- Ig A
- Ig M
- Ig D
- Ig E

Hypoimmunoglobulinemie: fyziologické poruchy u novorozenců, dědičné poruchy syntézy, získané poruchy syntézy u nádorů, ztráta imunoglobulinů např. při nefrotickém syndromu

Hyperglobulinemie – polyklonální při chronických zánětech, chronických hepatopatiích, autoimunitní choroby, monoklonální - myelom

Základní elektroforetické typy:

Typ akutního zánětu

Celková bílkovina je normální, lehké snížení albuminu.

Nejvýraznější je vzestup α_1 α_2 globulinů, často i β_2 -globulinů.

Čím jsou způsobeny změny v bílkovinném spektru?

Typ chronického zánětu

Vzestup α_1 α_2 globulinové frakce (méně výrazný než u akutního zánětu)

Široký pruh γ -globulinové frakce (polyklonální hyperimmunoglobulinemie)

Nález je provázen poklesem koncentrace albuminu.

Vysvětlete příčiny nálezů.

Typ chronické hepatopatie

U nemocných s fibrózou až cirhózou nacházíme snížený podíl albuminu, α_1 α_2 globulinů i β_2 -globulinů. Typický je nález γ -globulinové frakce, difuzní a přímo nasedající na β -globuliny. (β - γ bridging)

U akutní hepatitidy je obraz akutního zánětu. U těžkého průběhu klesá albumin a α_2 -globuliny.

Pokuste se vysvětlit tyto nálezy.

Typ nefrotického syndromu

Typický je veliký pokles koncentrace albuminu, obvykle i γ -globulinů. Naproti tomu α , často i β -globuliny výrazně stoupají.

Pokuste se vysvětlit tyto nálezy.

Malnutriční typ

Typická je hypoalbuminemie a pokles β_1 -globulinů. Je-li současně nedostatek železa, změny v β_1 -globulinech se nemusí projevit. Někdy bývá pozorováno zvýšení α_1 a α_2 globulinů.

Pokuste se vysvětlit nález

Monoklonální hyperimmunoglobulinemie.

Úzký proužek monoklonálního imunoglobulinu kdekoli od α_1 po γ frakci. Bývá nižší koncentrace albuminu. U těžších stavů vymizí frakce γ -globulinů.

Důkaz proteinurie

Za fyziologických okolností proniká bazální membránou glomerulů do filtrátu jen malá část plazmatických proteinů, z nichž je většina resorbována v tubulech. V moči se pak za den fyziologicky vyloučí nejvýše několik miligramů málo rozměrných globulinů krevní plazmy s $M_r < 60\,000$ a glykoproteinů z epitelu dutého systému ledvin a vývodných cest. Běžné zkoušky na proteinurii toto množství neprokáží.

Jako *proteinurie* se označuje vylučování více než 150 mg proteinů za den.

V průběhu dne je vylučování proteinů močí u zdravého člověka asi dvakrát větší než v noci (závislost na poloze těla, na námaze). Proto je nutné vyšetřovat první ranní moč (zachycení noční klidové proteinurie). Při pozitivním výsledku opakujeme vyšetření několik dní po sobě, abychom odlišili fyziologickou přechodnou proteinurii od patologické (z příčin prerenálních, renálních nebo postrenálních). "Neškodné" fyziologické proteinurie se vyskytují zvláště u mladých osob při zhoršeném prokrvení ledvin, např. po tělesné námaze, silných emocích, dlouhém stání.

Po zjištění proteinurie musí nezbytně následovat vyšetření hematurie, morfologické vyšetření močového sedimentu, mikrobiologické vyšetření moči, podle potřeby funkční zkoušky ledvin, kvantitativní stanovení proteinurie (např. biuretovou reakcí) a určení jejího typu (např. SDS-elektroforézou v polyakrylovém gelu).

Jen podle koncentrace proteinů nelze usuzovat na závažnost příčiny, někdy i nepatrná proteinurie může být příznakem velmi závažného stavu.

Průkaz proteinurie sulfosalicylovou kyselinou

Působením sulfosalicylové kyseliny bílkovina denaturuje, což se projeví tvorbou zákalu až sraženiny v závislosti na množství přítomné bílkoviny.

Hodnocení

Zkouška je velmi citlivá (lze prokázat bílkoviny v koncentraci asi od 100 mg/l), je proto vhodná pro screeningová vyšetření. Pokud je negativní, je zbytečné provádět další zkoušky. Slabě pozitivní výsledek ještě proteinurii nemusí prokazovat, musí být potvrzen některou další zkouškou.

Průkaz proteinurie diagnostickými proužky albuPHAN

K důkazu se využívá tzv. *proteinové chyby* některých acidobazických indikátorů. Tyto indikátory mění své zbarvení v přítomnosti proteinů a vykazují zdánlivě jinou hodnotu pH, než odpovídá skutečnosti. Příkladem jsou indikátory sulfoftaleinového typu. Indikační zóna na konci proužku je nasycena uvedeným indikátorem a kyselým pufrům o hodnotě pH 3. Po smočení v roztoku obsahujícím proteiny indikátor nabude zbarvení odpovídající podstatně vyšší hodnotě pH, než které v indikační zóně zajišťuje pufr (indikátor vykazuje proteinovou chybu).

Hodnocení

Exkrece proteinů močí u zdravých dospělých do 150 mg/den, z toho množství albuminu není větší než 20 mg/l. Proužky albuPHAN indikují albumin již od koncentrace 100 mg/l, na globuliny a glykoproteiny jsou méně citlivé. Žlutě zelený odstín, slabší než odpovídá barevnému poli stupnice 1 (300 mg/l), se hodnotí jako "stopy". Při proteinurii vzniká zbarvení žlutě zelené až modré.

Falešně pozitivní výsledky se mohou vyskytovat u pacientů, kterým byly podávány chininové preparáty nebo léčiva na bázi chinolinu, nebo v neobvykle alkalických močích (pH \approx 8), případně v neutrálních koncentrovaných močích s vysokou pufrací kapacitou. V těchto případech stačí okyselit vzorek několika kapkami zředěné kyseliny na pH 5–6 a provést zkoušku s novým papírkem.

Typy proteinurie

Podle typu bílkovin přítomných v moči rozlišujeme několik typů proteinurie.

Glomerulární proteinurie

Dochází k ní při poškození glomerulů. Příčinou je zejména ztráta negativního náboje glomerulární membrány (kyselina sialová v povrchové vrstvě membrány). Při mírném poškození nacházíme v moči zejména albumin a bílkoviny o molekulové hmotnosti do 100 tisíc, např. transferin. Porucha se označuje jako **glomerulární selektivní proteinurie**. Je-li poškození glomerulární membrány většího stupně, najdeme v moči i bílkoviny s větší molekulovou hmotností, např. imunoglobuliny. Jedná se o **glomerulární neselektivní proteinurii**. Pacient ztrácí močí velké množství bílkovin, gramy až desítky gramů.

Tubulární proteinurie

Při poškození tubulárních buněk nemohou být bílkoviny, které prošly glomerulem, vstřebávány a dostávají se do definitivní moči. Typický je nález bílkovin s menšími molekulovými hmotnostmi – např. β_2 -mikroglobulin, α_1 -mikroglobulin, lysozym ad.

Postrenální (subrenální) proteinurie

Bílkoviny pocházejí z močových cest, např. při zánětech a krváceních. V moči jsou současně leukocyty, příp.erytrocyty.

Prerenální proteinurie

Funkce ledvin není poškozena. Pacient má v krvi bílkovinu s malou molekulou, která prochází glomerulem – např. hemoglobin při masivní hemolýze, nebo myoglobin při zhmoždění svalů, Bence –Jonesova bílkovina u mnohočetného myelomu.

Arteficiální proteinurie

Pacient přidává bílkovinu do moče záměrně (obvykle vaječný bílek

Typ proteinurie lze prokázat např. PAGE- SDS-elektroforézou.

Průkaz Bence-Jonesovy bílkoviny v moči - paraproteinemie

Bence Jonesova bílkovina (BJB) bývá prokazována v moči při onemocnění mnohočetným myelomem. Mnohočetný myelom vzniká klonální proliferací plazmatických buněk produkujících protilátky. V kostní dřeni vznikne zhoubný kmen těchto buněk (myelomových buněk). Od funkčních plazmocytů se liší nekontrolovaným množením a dlouhým životem v kostní dřeni. Myelomové buňky produkují monoklonální imunoglobuliny, tzv.paraproteiny, které se dají v plazmě prokázat elektroforeticky. Nejčastěji se jedná o kompletní molekulu imunoglobulinu, v některých případech se do plazmy dostanou jen lehké řetězce. Lehké řetězce snadno pronikají glomerulem a dostávají se do moči. Nazývají se Bence-Jonesova bílkovina (BJB), v moči se vyskytují ve formě monomerů, dimerů i fragmentů o nízké molekulové hmotnosti, vykazují také velký stupeň polymerace. Jejich koncentrace v moči může dosáhnout až několik desítek g/l.

BJB má neobvyklé precipitační vlastnosti, po okyselení kyselinou octovou při zahřívání (kolem 60°C) vzniká zákal, který se při delším zahřívání (varu) rozpouští. Tento termoprecipitační test je však málo citlivý a má jen historickou cenu.

Pro stanovení Bence Jonesovy bílkoviny není vhodné použití běžných diagnostických proužků Albuphan, které jsou založeny na principu proteinové chyby acidobazického indikátoru. Tyto proužky indikují albumin, avšak jsou výrazně méně specifické na globuliny, glykoproteiny a Bence Jonesovu bílkovinu. Na posouzení zvýšené proteinurie, která může být způsobena i jinými bílkovinami (např.BJB) je vhodná reakce s kyselinou sulfosalicylovou, která vykazuje vysokou citlivost a lze ji použít jako rychlý screening zvláště při podezření na přítomnost Bence Jonesovy bílkoviny. V případě pozitivity následují další biochemická vyšetření. V současné době je nejčastějším postupem hodnocení BJB elektroforéza proteinů

s následnou imunofixací. Při imunofixaci se k elektroforeogramu přidávají protilátky proti jednotlivým imunoglobulinům a na základě specifické precipitace se hodnotí typ monoklonálního imunoglobulinu. Stanovení Bence Jonesovy bílkoviny patří mezi důležité testy v diferenciální diagnostice monoklonálních gamapatií.

Hodnocení Bence Jonesovy bílkoviny:

Bence Jonesova bílkovina se v moči může vyskytovat v koncentraci od několika mg/l až po desítky g/l. Stanovení Bence Jonesovy bílkoviny patří mezi důležité testy v diferenciální diagnostice monoklonálních gamapatií.

