

Bílkoviny

**Miroslava Beňovská
OKB FN Brno a KLM LF MU**

Bílkoviny

CB v séru, plasmě, moči a likvoru:

- Mezi základní biochemická vyšetření patří stanovení celkové bílkoviny. Hlavní skupiny bílkovin tvoří albumin (asi 50%) a globuliny
- Albumin je tvořen převážně v játrech. Udržuje stabilní onkotický tlak (podílí se na něm ze 75%) a má významné transportní funkce
- Globuliny - patří tam různé typy proteinů, které dělí na alfa, beta a gamaglobuliny. Globuliny jsou syntetizovány také v játrech, nebo jsou tvořeny imunitním systémem

Celková bílkovina

- *Speciální preanalytické požadavky: nejsou*
- *Referenční rozmezí:*

S/P	64-83 g/l
moč	0-0,15 g/l
likvor	0,15-0,45 g/l

Celková bílkovina

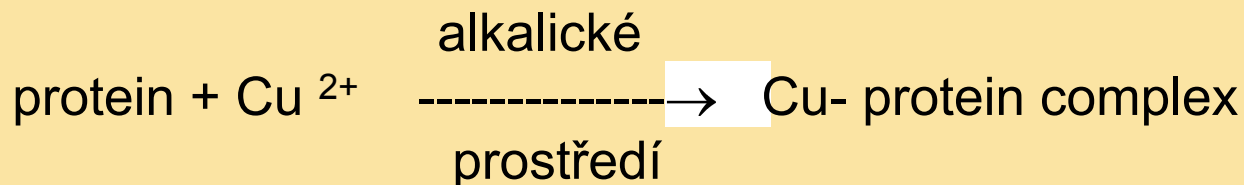
Metody stanovení:

- Referenční metoda: reakce s biuretovým činidlem (pro CB v séru)
- Certifikovaný referenční materiál: NIST/SRM 927a (pro CB v séru)
- Doporučené rutinní metody: reakce s biuretovým činidlem (pro CB v séru)

Fotometrické metody

Metoda s biuretovým činidlem :

- Závisí na přítomnosti peptidových vazeb ve všech proteinech
- Doporučená metoda ke stanovení celkové bílkoviny v séru a plasmě
- Peptidové vazby reagují v alkalickém prostředí s roztokem **mědnaté soli** a tvoří fialově zbarvený komplex nedefinovaného složení
- Komplex je vhodný k fotometrickému stanovení při 540 – 550 nm
- Biuretová reagensie dále obsahuje:
 - **tartarát sodno-draselný** ke komplexaci měďnatých iontů a zabránění vysrážení hydroxidu měďnatého
 - **jodid draselný** - antioxidant - zabraňuje autoredukci mědi



Celková bílkovina v séru a plasmě

Metoda s biuretovým činidlem– pokračování:

- Barevný chelát vzniká mezi Cu^{2+} a látkou kde jsou alespoň dvě $\text{H}_2\text{N}-\text{C}-$, $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-$, CH_2- , $\text{H}_2\text{N}-\text{CS}-$ skupiny spojené přímo nebo přes C nebo N atom
- Měďnatý iont je vázán koordinační vazbou k šesti peptidovým vazbám
- Aminokyseliny a dipeptidy nereagují - malé peptidy dávají růžové zbarvení, ale vzhledem k jejich nízké koncentraci v séru je jejich příspěvek nevýznamný
- Intenzita zbarvení je úměrná počtu peptidových vazeb
- Detekční limit bývá kolem 2 g/l
- Interference: Hemolýza a lipémie vadí až při vysokých koncentracích (hemoglobin reaguje jako protein)

Fotometrické metody

Metody využívající vazbu proteinu na barvivo:

- Pyrogallolová červeň, Coomassie blue
- stanovení v moči a likvoru
- přestávají se používat

Nevýhody:

- nedostatečná stabilita činidla
- nerovnoměrná schopnost vazby na barvivo pro různé typy bílkovin
- falešné snížení koncentrace globulinů

Turbidimetrické metody:

Stanovení s benzethonium chloridem:

- Koncentrace celkové bílkoviny o dva řády nižší
- Využívají se citlivější metod

Doporučená metoda

- Celková bílkovina reaguje s **benzethonium chloridem** za vzniku zákalu, který se měří turbidimetricky při 505
- Reakce probíhá v alkalickém prostředí v přítomnosti EDTA, který denaturuje bílkovinu a eliminuje interferenci hořčnatých iontů
- Výhoda metody - podobná reaktivita činidla s albuminem a gama globuliny
 - peptidy s krátkým řetězcem neinterferují

Turbidimetrické metody:

- Metoda využívající precipitace bílkovin s kyselinou trichloroctovou nebo sulfosalicylovou:
 - vykazuje nestabilitu nebo flokulaci precipitátu a také rozdíly v chování činidla k jednotlivým bílkovinám ve směsi
 - je nezbytně nutné nepoužívat kalibrátor na basi albuminu, ale zahrnující spektrum bílkovin tak, jak se vyskytují v moči

Další metody

Metoda s kyselinou sulfosalicylovou:

jako doplňující zkumavkový test pro semikvantitativní stanovení bílkoviny při chemické analýze moče pomocí diagnostických proužků, které zachycují pouze albumin a nikoliv lehké řetězce

Metody založeny na schopnosti proteinů vázat

barvivo – např. Amido čern, kyselou violet'

Využívají se zejména k barvení po elektroforetickém rozdělení

Další metody

Kjeldahlova metoda:

- Historicky nejstarší metoda ke stanovení celkové bílkoviny
- Založena na mineralizaci vzorku s kyselinou sírovou a vydestilování amoniaku do předlohy s kyselinou
- Dojde k přeměně bílkovinného dusíku na amonnou sůl
- Její koncentrace se pak stanoví titrací s hydroxidem sodným
- Výsledek se koriguje o dusík nebílkovinné povahy (tato hodnota se získá po vysrážení bílkovin s kyselinou trichloroctovou)
- Nedá se automatizovat, tudíž se v laboratořích klinické biochemie nepoužívá
- Má význam při definování referenčních materiálů pro biuretovu metodu

Albumin

- *Analyzovaný materiál:* sérum, plasma, moč, likvor
- *Speciální preanalytické požadavky:* nejsou
- *Referenční rozmezí:*

S/P	34-48 g/l
moč	0-30 mg/l
likvor	120-300 mg/l

Albumin v séru

- Ve slabě kyselém prostředí se albumin chová jako kation
- Stanovení založeno na reakci s aniontovým barvivem většinou se skupinou – SO_3H
- Využívají se barviva, která se specificky vážou na albumin v přítomnosti ostatních sérových bílkovin
- Nutný posun absorpčního maxima komplexu albumin-barvivo proti absorpčnímu maximu samotného barviva

Stanovení albuminu s bromkresolovou zelení (BCG) v séru a plasmě:

- Žlutozelený roztok bromkresolové zeleně tvoří při pH 4,2 s albuminem zelenomodrý komplex s maximem 630 nm
- Vazba albuminu na barvivo není zcela specifická - barvivo částečně reaguje také s $\alpha 1$ - a $\alpha 2$ -globuliny, ale pomaleji než s albuminem
- Nespecifickou vazbu minimalizuje odečítáním absorbance krátce (30s) po smíchání séra s barvivem
- Jedná se o nejčastěji používanou metodu

Stanovení albuminu s bromkresolovým purpurem (BCP) v séru a plasmě :

- Žlutý roztok bromkresolového purpuru tvoří při pH 5,2 za přítomnosti povrchově aktivních látek s albuminem zelený komplex – maximum 600 nm
- Metoda je vysoce specifická

Stanovení albuminu v séru a plasmě

- Referenční metoda – neexistuje
- Historicky používaná metoda s methyl oranží - vzhledem k nežádoucím interferencím se nepoužívá

Albumin v moči

- Podobně jako při stanovení CB se jedná o mnohem nižší koncentrace než v séru

Imunoturbidimetrie nebo imunonefelometrie

- Se specifickou protilátkou proti lidskému albuminu tvoří albumin precipitát imunokomplexu
- Vzniklý zákal se měří imunoturbidimetricky nebo imunonefelometricky

Dříve se ke stanovení albuminu v moči používala metoda ELISA nebo RIA

Stanovení dalších proteinů

- Další proteiny přítomné v séru v nízkých koncentracích se převážně stanovují **imunoturbidimetry** nebo **imunonefelometry**
- Pro stanovení v séru a moči postačuje imunoturbidimetrie, pro stanovení v likvoru je pro svou citlivost vhodná imunonefelometrie
- **Historicky** - reakce na agarose s obsahem protilátky
Radiální imunodifuze – po obarvení kroužky
Elektroimunodifuze (elfo + imunoreakce současně) -
raketky

CRP v séru a plasmě

- C-reaktivní protein - **nejčastěji stanovovaný** velmi citlivý **protein akutní fáze**
- Jeho koncentrace se prudce zvedá při zánětu
- Není specifický
- Stanovuje se většinou imunoturbidimetry
- Existují metody pro stanovení supersenzitivního CRP (pro novorozence, kardio) stanovované např. luminiscenční analýzou - v praxi se neprosadily
- Rozšířené jsou metodiky na stanovení širokospektrálního CRP s mezí stanovitelnosti kolem 1 mg/l
- **Imunoturbidimetrické stanovení** zesílené na částicích (**particle-enhanced**) – antigen (CRP) reaguje a protilátkou proti CRP, která je navázaná na latexových mikročásticích. Vzniklý komplex – precipitát se stanoví turbidimetry

Imunoglobuliny v séru (plasmě) a likvoru

Imunoglobuliny v séru a likvoru

- dostatečnou citlivost mají pouze imunochemické metody

Imunoglobuliny G, A a M v séru či plasmě - stanovují se imunoturbidimetry (imunonefelometry)

v likvoru pouze imunonefelometrie
(dostatečná citlivost)

- Imunoturbidimetrické i turbidimetrické metody jsou založeny na měření zákalu vytvořeného interakcí měřeného analytu se specifickou protilátkou
- Vznik precipitátu se projevuje vzrůstem zákalu reakční směsi
- U imunoturbidimetrických metod reakce často probíhá v přítomnosti PEG, který zvyšuje rychlost reakce, citlivost a výrazně omezuje možnost rozpouštění precipitátu v přítomnosti nadbytku antigenu
- Hlavní vlnová délka pro měření absorbance - 340 nm

Imunoglobuliny

- Analýza jednotlivých polyklonálních imunoglobulinů zahrnuje stanovení koncentrace směsi proteinů různé velikosti s podobnou konstantní částí a různou variabilní částí
- Protilátky a referenční kalibrátory jsou postaveny proti normálním lidským sérům složeným ze směsi imunoglobulinových podtříd
- Stanovení jednotlivých polyklonálních imunoglobulinů - spolehlivé

Imunoglobuliny

- Stanovení monoklonálních imunoglobulinů – problematické
- Monoklonální imunoglobuliny mají pouze některé z determinant, s kterými protilátky v antiséru reagují
- Dochází k rychlé tvorbě precipitátu, pro vysoké koncentrace monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů) jsou výsledky získané zejména po naředění nadhodnoceny
- Pro absolutní koncentraci paraproteinů - elektroforéza a denzitometrie
- Imunochemické metody lze využít ke sledování změny koncentrace téhož paraproteinu

Imunoglobuliny D a E

Imunoglobuliny D a E v séru

- Vyžadují ke stanovení ještě citlivější analytické metody
- Obvykle se využívají imunoanalyzátory na principu chemiluminiscence

Další proteiny:

- **Prealbumin a transferin** - velmi čtené stanovení - v séru (imunoturbidimetricky) a likvoru (imunonefelometricky)
- **Orosomukoid, Haptoglobin** v séru (imunoturbidimetricky) a likvoru (imunonefelometricky)
- **Alfa 1 – antitrypsin, Proteiny komplementu C3 , C4** v séru (imunoturbidimetricky)
- **Alfa 2 – makroglobulin** v séru a moči, **Alfa 1 – mikroglobulin** v moči (imunoturbidimetricky)
- **Ceruloplasmin** – imunonefelometricky v séru – zejména pro monitorování Wilsonovy choroby nutná velmi citlivá metoda

Volné lehké řetězce κ a λ

- **Imunoglobulinové molekuly :**
 - dva těžké řetězce ($\alpha, \delta, \epsilon, \gamma$ nebo μ , které určují imunoglobulinovou třídu)
 - dva identické lehké řetězce
 - každý lehký řetězec je kovalentně navázán na těžký řetězec
 - těžké řetězce jsou kovalentně spojeny v stěžejní část
- U zdravých jedinců je koncentrace volných lehkých řetězců minimální
- Volné lehké řetězce kappu existují v séru převážně jako monomery a řetězce lambda jako dimery
- Proto různý poměr u glomerulární filtrace
- V séru je poměr volných kappu ku lambda 0,625 zatímco poměr vázaných volných lehkých řetězců je 2
- Ke stanovení se používá imunonefelometrická případně imunoturbidimetrická metoda

Heavylite, Binding Site

- Stanovení poměru molekul IgG κ / IgG λ
IgM κ / IgM λ
IgA κ / IgA λ
- Prediktivní marker při posuzování vývoje monoklonální gamapatie nejasného významu (benigní)

Presepsin

- **Soluble CD14 subtype (z membránového glykoproteinu)**
- **Rychlá diagnostika a prognóza sepse**
- **POCT analyzátor na principu chemiluminiscence (Mitsubishi chemical)**

Nízkomolekulární proteiny či polypeptidy

Prokalcitonin – polypeptid, prekurzor hormonu kalcitoninu

- Tvorba je stimulována bakteriální a mykotickou infekcí (bakteriální meningitidy, sepse)
- Vysoká specificita, ale ne 100% (např. tumory)
- Stanovení v na principu luminometrie (Brahms)
chemiluminiscence (Roche)

Cystatin C – polypeptid, jeho koncentrace stoupá úměrně poklesu glomerulární filtrace

- imunonefelometricky v séru se specifickou protilátkou chemicky vázanou na polystyrénových částicích (Particle-Enhanced Nephelometry)

Beta2 – mikroglobulin v séru - luminiscence

Referenční hodnoty (dospělí)

- C3 0,9 - 1,8 g/l
- C4 0,1 - 0,4 g/l
- CRP 0,0 – 5,0 mg/l
- alfa - antitrypsin 0,9 - 2,0 g/l
- orosomukoid 0,25 - 4,0 g/l
- prealbumin 0,2 - 0,4 g/l
- transferin 2,0 - 3,6 g/l
- haptoglobin 0,3 - 2,0 g/l

Referenční hodnoty (dospělí)

- IgA 0,7 – 4,0 g/l
- IgG 7,0 – 16,0 g/l
- IgM 0,4 – 2,3 g/l
- ceruloplasmin 0,22 - 0,4 g/l M
0,25 - 0,6 g/l Ž
- prokalcitonin 0,0 – 0,5 ug/l

Kalprotektin (Biovendor)

- Leukocytární cytosolový protein – stanovení ELISA nebo POCT (snímač Quantum Blue)
- Uvolňuje se z leukocytů po jejich aktivaci nebo lýze
- Tvoří jej především [monocyty](#) a [neutrofilly](#)

- Vhodný ukazatel při diagnostice i monitorování akutních i chronických střevních zánětlivých onemocnění – [ulcerózní kolitidy](#), [Crohnovy choroby](#) a [nekrotizující enterokolitidy](#) u dětí
- Obsah kalprotektinu ve stolici koreluje s množstvím leukocytů vyloučených do střevního lumen
- Stanovení koncentrace **ve vzorku stolice** - cut-off hodnota 30 mg/l

- **Pro diferenciální diagnostiku mezi IBD – Inflammatory Bowel Disease (ulcerózní kolitida, akutní Crohnova choroba) a IBS (syndromem dráždivého tračníku)**
- Kalprotektin ve stolici je rovněž testován jako marker [kolorektálního karcinomu](#)

Další bílkoviny

- Není zde pojednáno o dalších parametrech, které sem patří složením
- Vzhledem k diagnostickému významu jsou zařazeny jinde (např. ferritin, volný hemoglobin, glykovaný hemoglobin, fruktosamin, C – peptid)