

# Bílkoviny krevního séra/plazmy

David Zeman, OKB ÚLM FN Brno  
2021, e-mail: Zeman.david@fnbrno.cz

- **Sérum** získáme ze srážlivé krve (necháme stát 30 min při teplotě místnosti  $\Rightarrow$  proběhne koagulace) centrifugací
- **Plazmu** získáme z nesrážlivé krve (přídavek antikoagulačních činidel: heparin, EDTA) centrifugací (lze ihned po odběru)

# Funkce bílkovin v organismu

- Enzymy (>1500)
- Strukturální (kolagen, keratin)
- Kontraktilní (aktin, myosin – kontrakce svalů)
- Protilátky (imunoglobuliny)
- Transportní (albumin, transferrin, lipoproteiny)
- Proteohormony (např. insulin)

# „Celková bílkovina“

= suma všech bílkovin v analyzovaném materiálu

- Referenční meze: 60  
– 85 g/l
- Snížení: ztráty bílkovin, zejm. albuminu
- Zvýšení: dehydratace, paraproteinémie
- **Stanovení:**
  - 1) Kjeldahlova metoda (dovedávna referenční)
  - 2) Biuretová metoda (dnes referenční)

*Stanovení nízkých koncentrací (moč, likvor):*

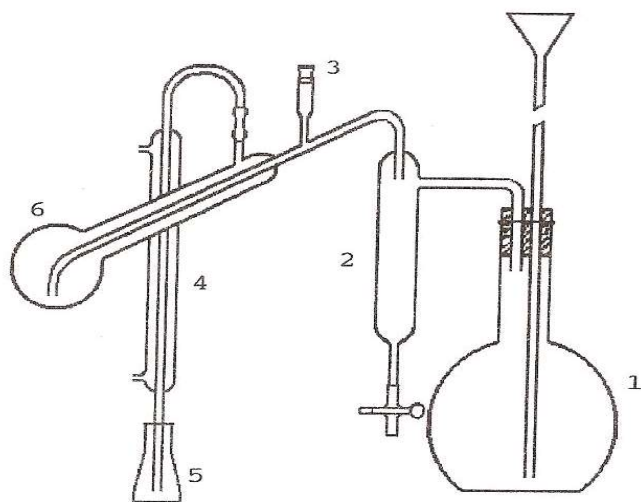
  1. Vazba barviva (Coomassie Brilliant Blue, pyrogallolová červeň/molybdenan)
  2. Turbidimetry (zákal reakcí s TCA, benzethonium-chloridem), popř. nefelometry (měření rozptýleného světla)

# **Kjeldahlova metoda: Parnasův-Wagnerův přístroj pro destilaci amoniaku vodní parou**



# Kjeldahlova metoda

(obr. z Volka a kol. Analytická chemie II. VŠCHT Praha 1995)



Obr. 6.65. Parnasův-Wagnerův destilační přístroj pro stanovení amoniaku  
1 - vyvíječ vodní páry; 2 - kondenzační trubice; 3 - plnicí otvor  
4 - chladič; 5 - jímadlo; 6 - destilační baňka

- 1. Izolace sérových bílkovin srážením (oddělení „nebílkovinného dusíku“)
- 2. Katalyzovaná redukční mineralizace varem s koncentrovanou  $H_2SO_4$
- 3. Ze vzniklé amonné soli se působením koncentrovaného NaOH uvolní v uzavřené aparatuře  $NH_3$
- 4.  $NH_3$  se vydestiluje vodní párou do známého objemu odměrného roztoku kyseliny (nejčastěji  $H_2SO_4$ ) o známém titru (nebo jímáme do slabé kyseliny -  $H_3BO_3$  - a stanovujeme přímo acidimetry)
- 5. Neutralizací vznikne opět amonná sůl a nadbytek kyseliny se stanoví titrací odměrným roztokem hydroxidu
- 6. Výpočet:  
$$n(NH_3) = n(N) = n(H^+) - n(OH^-)$$
- 7. Přepočet na průměrný obsah dusíku v bílkovinách (16 %)

# Kjeldahlova metoda - reakce

- 1) **Digesce** – varem vzorku v kyselině sírové za přítomnosti katalyzátoru:  
$$\textit{organický N} + \textit{H}_2\textit{SO}_4$$
$$\rightarrow (\textit{NH}_4)_2\textit{SO}_4 + \textit{H}_2\textit{O} + \textit{CO}_2 + \textit{H}_2\textit{SO}_4 + \textit{vedlejší produkty matrice}$$
- 2) **Destilace**:
  - a) produkt digesce je kvantitativně převeden do destilačního aparátu a v přebytku se přidá NaOH – dojde ke konverzi síranu amonného na volatilní amoniak:  
$$(\textit{NH}_4)_2\textit{SO}_4 + \textit{NaOH} \rightarrow 2\textit{NH}_3 + \textit{Na}_2\textit{SO}_4 + 2\textit{H}_2\textit{O} + \textit{NaOH}$$
  - b) amoniak je jímán buď do roztoku silné kyseliny, jejíž malý přebytek je poté zpětně titrován standardní zásadou, nebo do kyseliny borité jako dihydrogenboritan amonný:  
$$\textit{NH}_3 + \textit{H}_3\textit{BO}_3 \rightarrow \textit{NH}_4\textit{H}_2\textit{BO}_3 + \textit{H}_3\textit{BO}_3$$
- 3) **Titrace**: při destilaci amoniaku do kyseliny borité následuje jediný titrační krok – titrace silnou kyselinou (zprav.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) za použití acidobazického indikátoru se změnou pH mezi 4 a 6 (smíšený indikátor bromkrezolové zeleně s methylčervení):  
$$2\textit{NH}_4\textit{H}_2\textit{BO}_3 + \textit{H}_2\textit{SO}_4 \rightarrow (\textit{NH}_4)_2\textit{SO}_4 + 2\textit{H}_3\textit{BO}_3$$

## Kjeldahlova metoda – finální výpočet koncentrace celkové bílkoviny (CB, TP = total protein)

- $TP \text{ (g/L)} = (V \cdot T \cdot 0.14007 \cdot 6.25) / V_{\text{vzorku}}$

$V$  = spotřeba titračního činidla v mL na vzorek (přesněji: s odečtením spotřeby titračního činidla na blank);

$T$  = titr titračního činidla (mol/L)

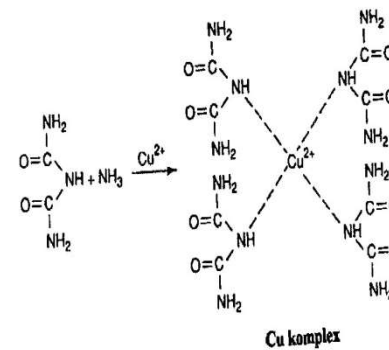
Faktory  $0.14007$  a  $6.25$  slouží k přepočtu titračního činidla na N (mg), resp. TP (g/L)

Blíže viz Chromý V et al. *Crit Rev Anal Chem* 2015;45:106-11 a Vinklárková B et al. *Crit Rev Anal Chem* 2015;45:112-18

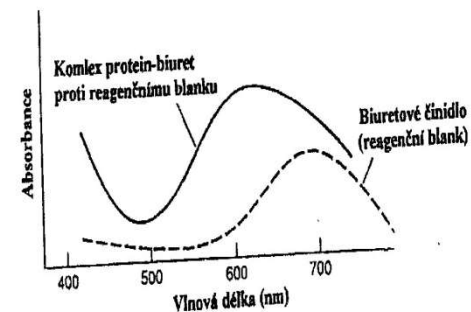
# Biuretová reakce

(schéma vpravo z F. Novák: Úvod do klinické biochemie. Karolinum, Praha 2002)

- „Biuret“ vzniká ze dvou molekul močoviny zahřátím za uvolnění amoniaku; není to reagensie, ale sloučenina, která reaguje s  $\text{Cu}^{2+}$  v alkalickém prostředí analogicky jako peptidová vazba v bílkovinách)



Obr. 6-2 Biuretová reakce



Obr. 6-3 Absorpční spektra biuretového činidla a Cu komplexu



# Biuretová metoda

- Reakce  $\text{Cu}^{2+}$  v alkalickém prostředí s peptidovou vazbou (-CO-NH-) v bílkovinách
- Intenzita vzniklého červenofialového komplexu je úměrná počtu peptidových vazeb
- Fotometrická detekce při 540 – 550 nm
- Interference: lipémie, hemolýza, hyperbilirubinémie (falešně vyšší hodnoty)

## *Složení činidla:*

*$\text{CuSO}_4$ , vínan draselno-sodný (komplexuje  $\text{Cu}^{2+}$ , který by jinak v alkalickém prostředí vypadl jako  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ), jodid draselný (antioxidant-zabraňuje autoredukci  $\text{Cu}^{2+}$ ), NaOH*

Zpravidla end-point stanovení, čas  $\geq 8$  min (ustálení reakční rovnováhy za 15-30 min; za 10 min dosaženo 95-98 % celkového zbarvení)

## Biuretová reakce pro stanovení bílkovin v moči

- Precipitace bílkovin TCA nebo HCl+fosfowolframovou kyselinou v ethanolu
- Koncentrace precipitovaných bílkovin centrifugací
- Rozpuštění bílkoviny a reakce s biuretovým činidlem
- **Folin-Lowryho metoda**
- Činidlo = fosfowolframová + fosfomolybdenová kyselina + alkalický roztok Cu
- Reakce s Tyr a Trp
- Produkce modrého zbarvení měřeného při 650 nm
- Detekční limit 5 – 10 mg/l

# **Turbidimetrické stanovení bílkovin reakcí s benzethonium chloridem**

(doporučená metoda pro stanovení celkové bílkoviny v moči a likvoru)

- Bílkoviny v alkalickém roztoku reagují s benzethonium chloridem (kvartérní amoniovou solí)
- Vzniklý zákal je stabilní a málo závislý na teplotě
- Větší zákal s albuminem než s globuliny
- Velmi vysoká koncentrace bílkovin  $\Rightarrow$  nerovnoměrně rozptýlený zákal  $\Rightarrow$  falešně nízké hodnoty !!

## Stanovení bílkovin podle Bradforda (1976)

- Vazba barviva (Coomassie Brilliant Blue G250) na bílkovinu způsobí posun absorpčního maxima barviva od 465 k 595 nm
- K vazbě dojde do 2 minut a vzniklé zbarvení je stabilní 1 hodinu
- Výraznější reakce s albuminem než s globuliny
- Detergent SDS zeslabuje reakci s albuminem více než reakci s globuliny a nízkomolekulárními proteiny

# Marion Mckinley Bradford

(28. 10. 1946 – 3. 5. 2021)



- A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54

# Stanovení bílkovin metodou s pyrogallolovou červení a molybdenanem

- Při vazbě bílkovin na směs pyrogallolové červeně s molybdenanem za  $\text{pH} = 2,5$  se přesune absorpční maximum od původních 460 nm (samotné činidlo) k 600 nm (580-620 nm – komplex)
- Absorbance při 580-620 nm je v omezeném rozsahu úměrná koncentraci bílkovin v roztoku

## Elektroforéza bílkovin

se provádí s cílem **zjistit abnormality bílkovin krevního séra.**

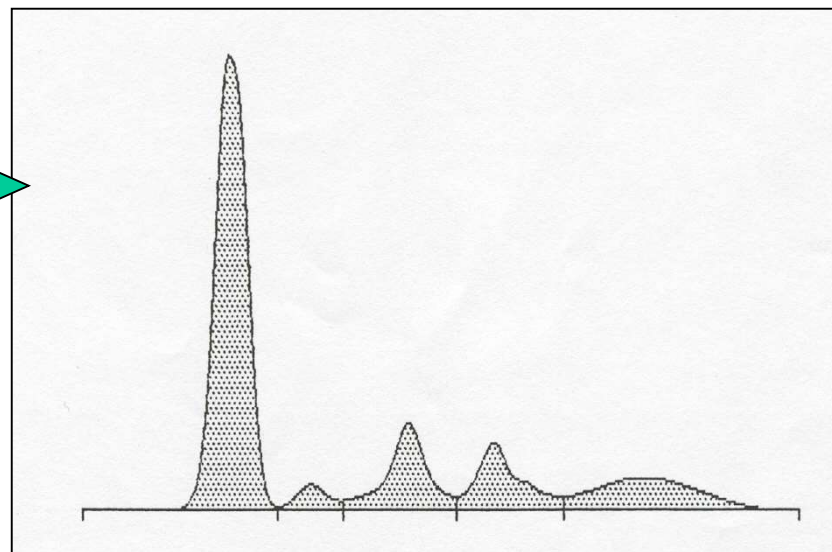
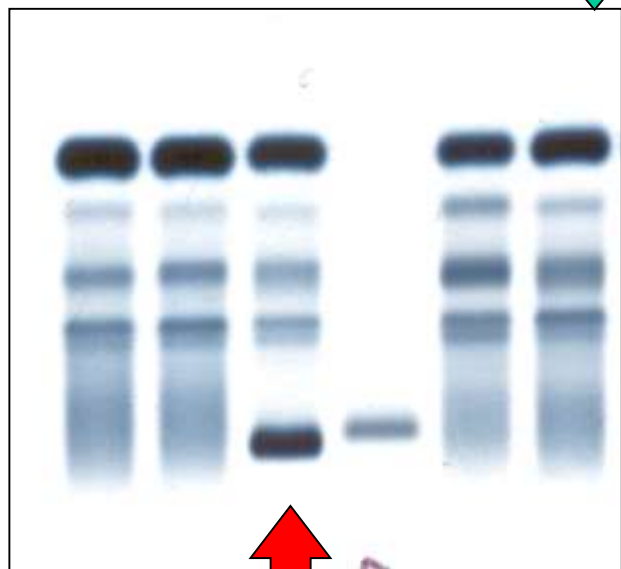
- ☞ Bílkoviny jsou rozděleny podle svých elektroforetických pohyblivostí do skupin (frakcí), které vytvářejí charakteristický obrazec.
- ☞ Změny v tomto obrazci souvisí s různými druhy onemocnění nebo s různými patologickými stavy.

Bílkoviny se dělí na 5 – 6 hlavních frakcí:

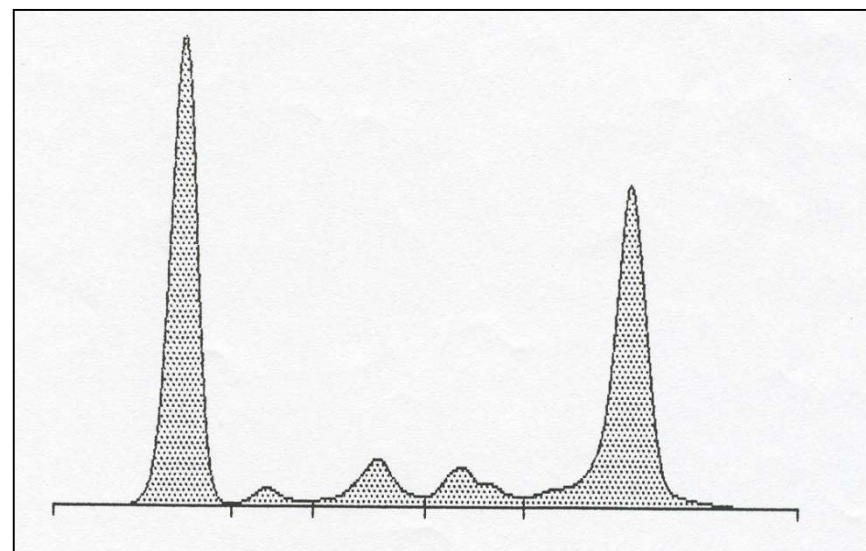
✦	Albumin	56 – 66 %
✦	$\alpha$ 1 globuliny	2 – 3 %
✦	$\alpha$ 2 globuliny	8 – 12 %
✦	$\beta$ globuliny ( $\beta$ 1, $\beta$ 2)	7 – 10 %
✦	$\gamma$ globuliny	10 – 18 %

# Denzitometrické vyhodnocení

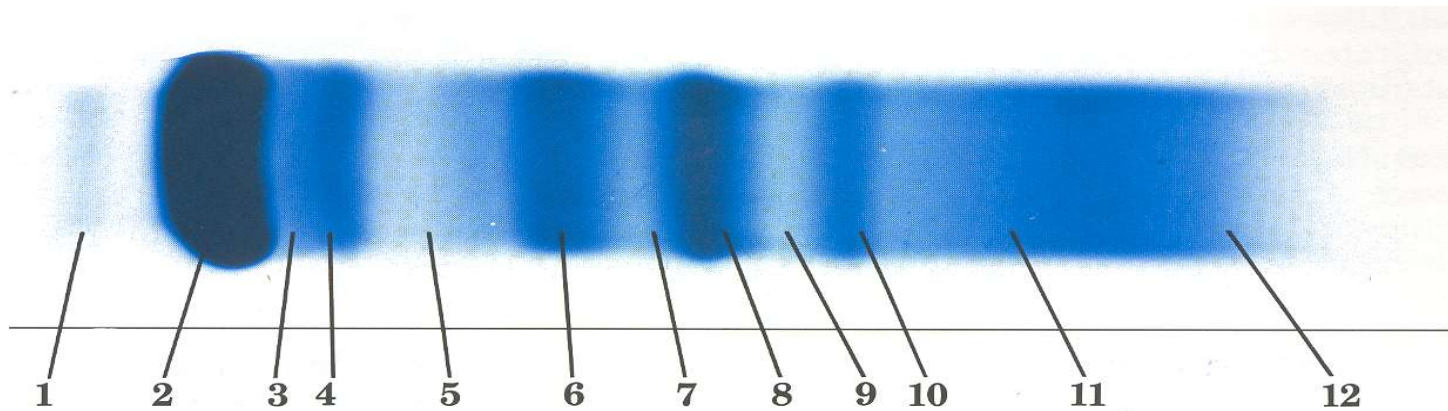
Normální nález



„M“ gradient







1.	prealbumin
2.	albumin
3.	$\alpha$ -lipoprotein, $\alpha$ -fetoprotein
4.	A1AT, orosomukoid
5.	$\alpha_1$ antichymotrypsin, Gc globulin
6.	A2M, Hp
7.	hemoglobin

8.	Transferin
9.	Beta-lipoprotein
10.	C3
11.	IgA, IgM, fibrinogen, „M“, VLŘ
12.	IgG, CRP, „M“, VLŘ

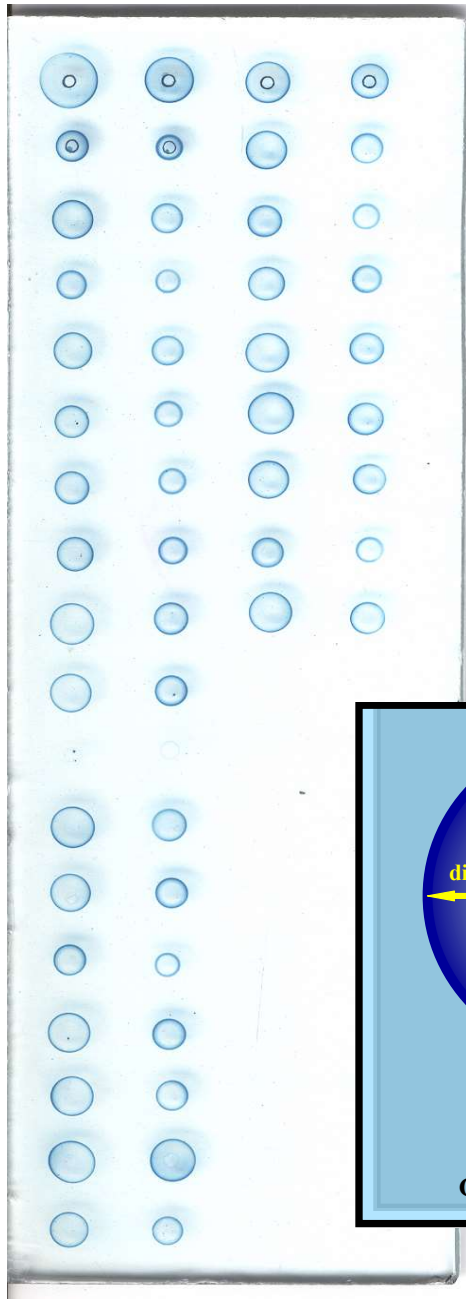
# Stanovení jednotlivých plazmatických bílkovin

- V naprosté většině případů **reakce se specifickou protilátkou** (výjimky: albumin, fibrinogen – lze i jiným způsobem)
- **Radiální imunodifúze (RID)** – precipitační metoda ( $d^2$  precipitačního prstence je úměrné koncentraci analytu)
- **Reakce v roztoku** (protilátka vždy v nadbytku!!) – úbytek intenzity záření ze zdroje po průchodu kyvetou s roztokem daný rozptylem světla na imunokomplexech (**turbidimetrie**) nebo měření rozptýleného světla (**nefelometrie**); pro nízké koncentrace (cca 0,5 – 10 mg/L) je specifická protilátka navázaná na latexové částice (nižší detekční limit – viz dále)
- Reakce se značeným třetím reaktantem (pro velmi nízké koncentrace analytu <0,1 – 1 mg/l)

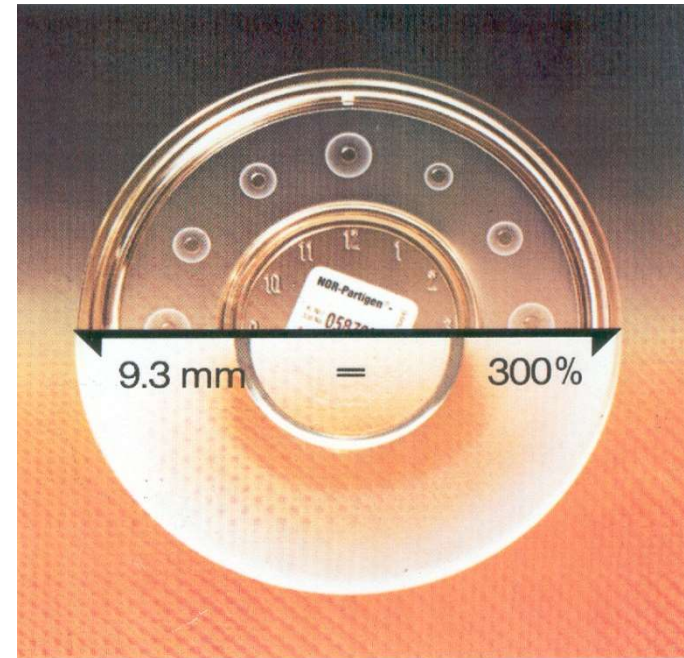
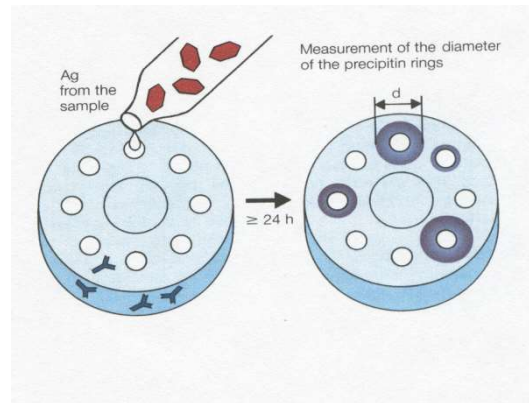
**Kvantitativní stanovení: pro koncentrace nad 5 - 10 mg/L**

- A) Imunoprecipitační reakce v gelu (RID podle Manciniové)
- B) Elektroimunostanovení (EID) podle Laurella
- C) Imunoprecipitační reakce v roztoku ( s turbidimetrickou  
nebo nefelometrickou detekcí)

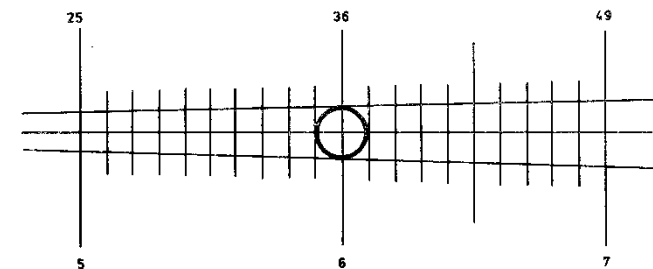
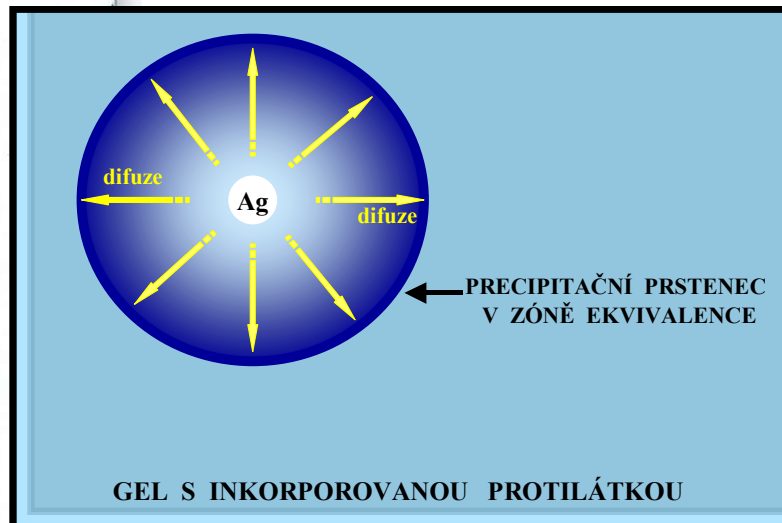
# A) Imunochemická reakce v gelu



## RID (Manciniová)



## Kvantitativní měření

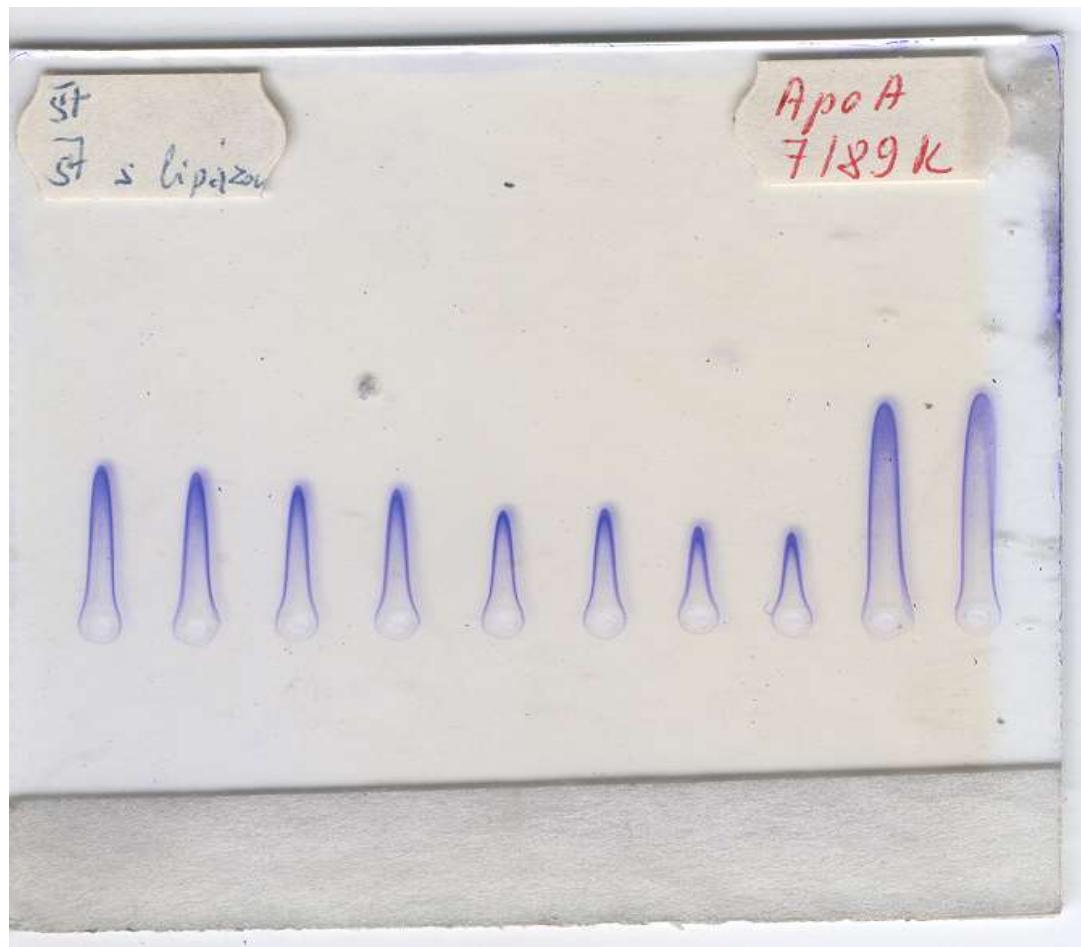


**B)**

**Imunochemická reakce v gelu**

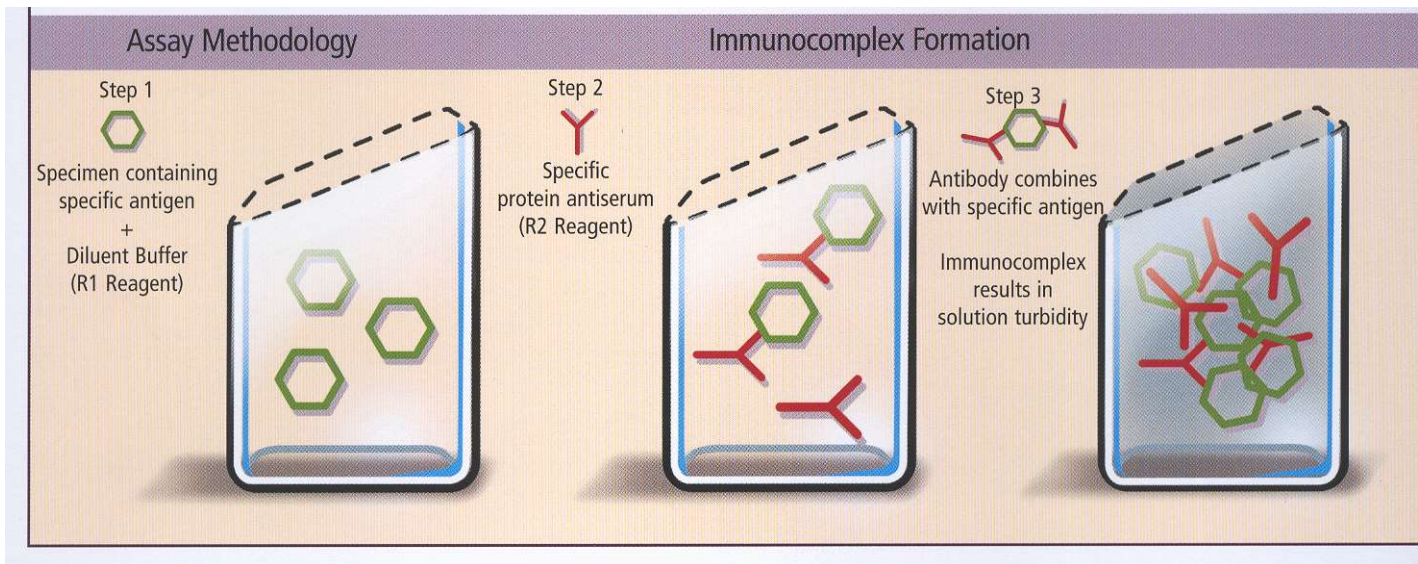
**Kvantitativní měření**

**Elektroimunodifuze dle Laurella**

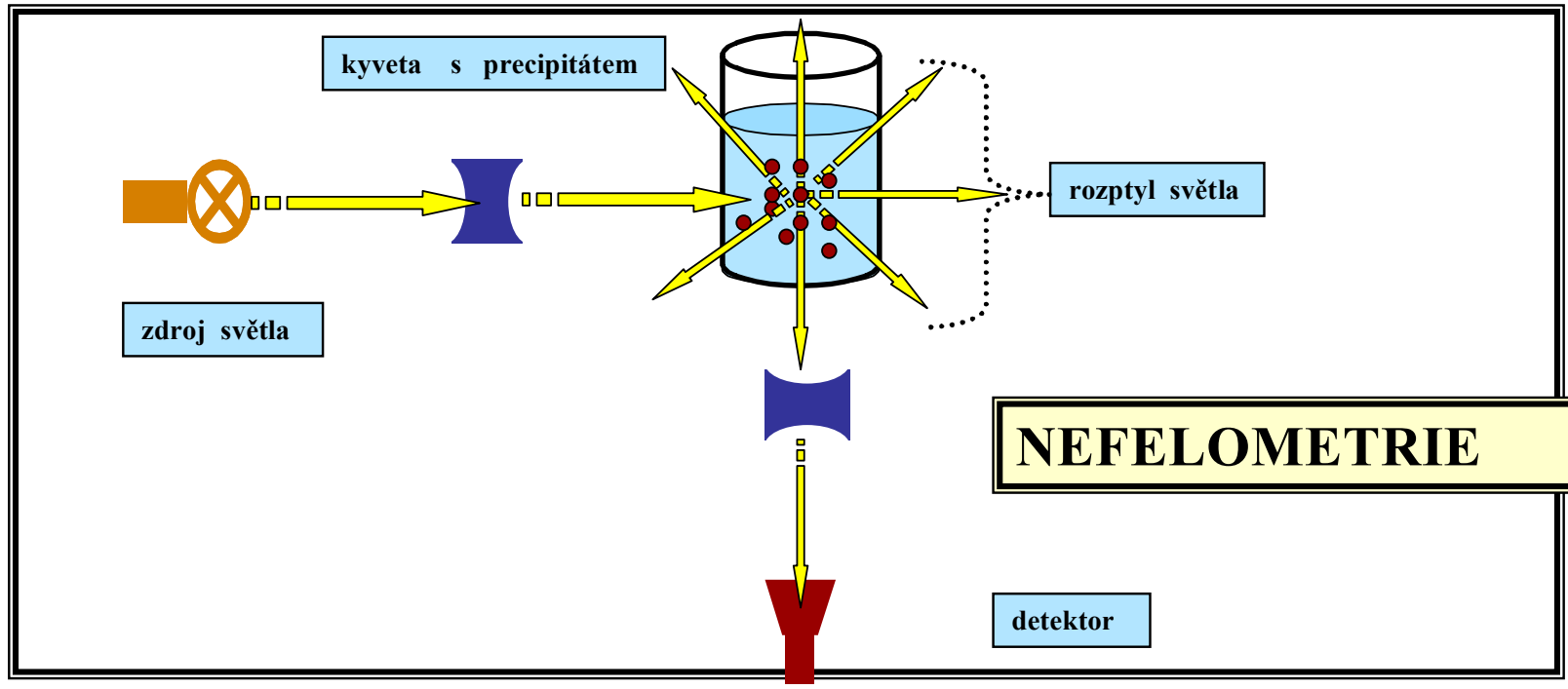
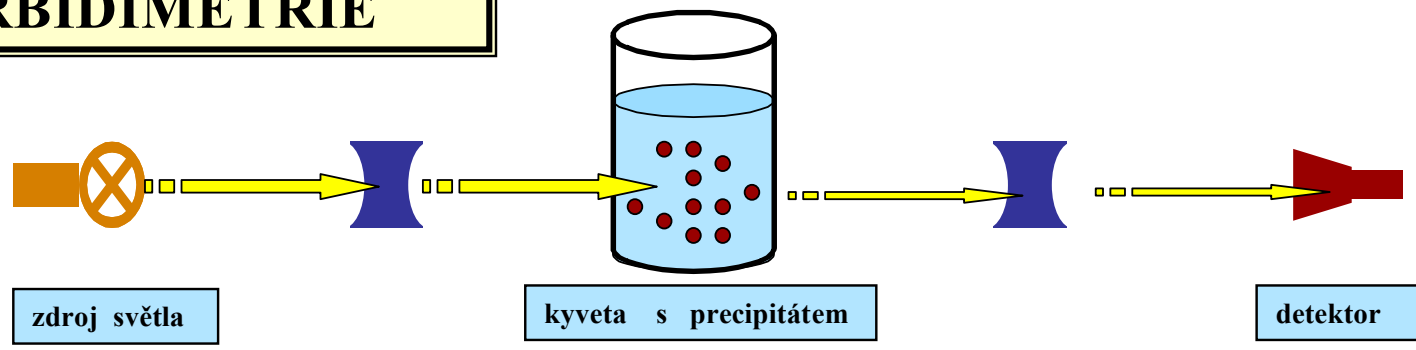




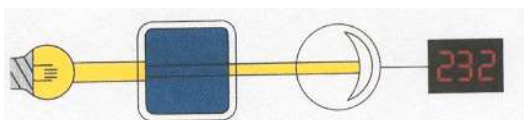
- C) Imunoprecipitace v roztoku:**  
**Prostředí: PEG**  
**Detekce: nefelometrie, turbidimetrie**  
**Stanovení koncentrace: IgG, IgA, IgM, proteiny akutní fáze**



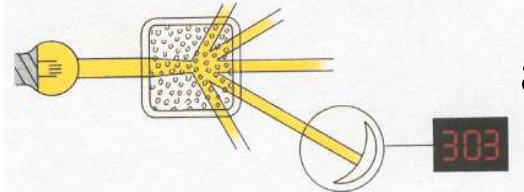
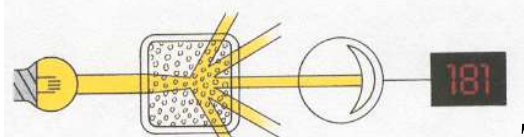
# TURBIDIMETRIE



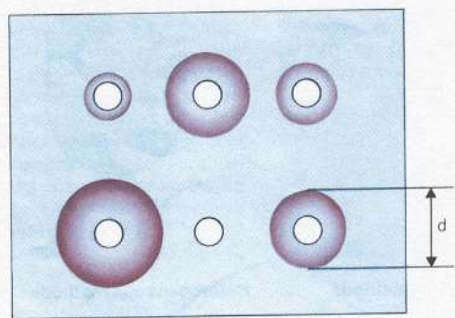
# Měřicí techniky



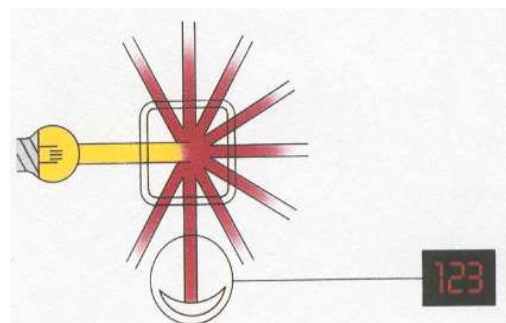
fotometrie



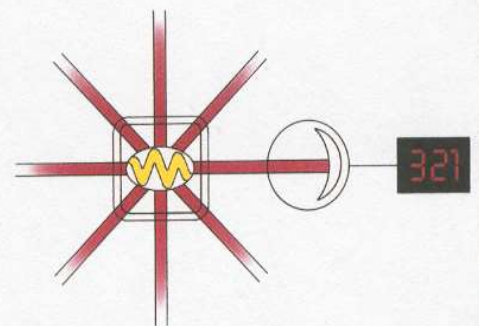
Turbidimetrie  
a nefelometrie



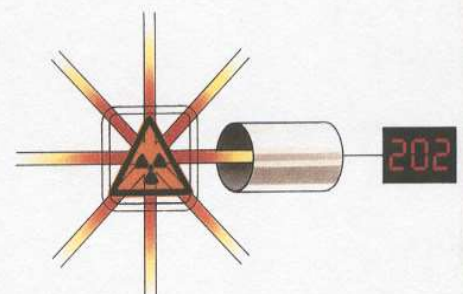
Radiální  
imunodifuze



fluorescence



luminiscence

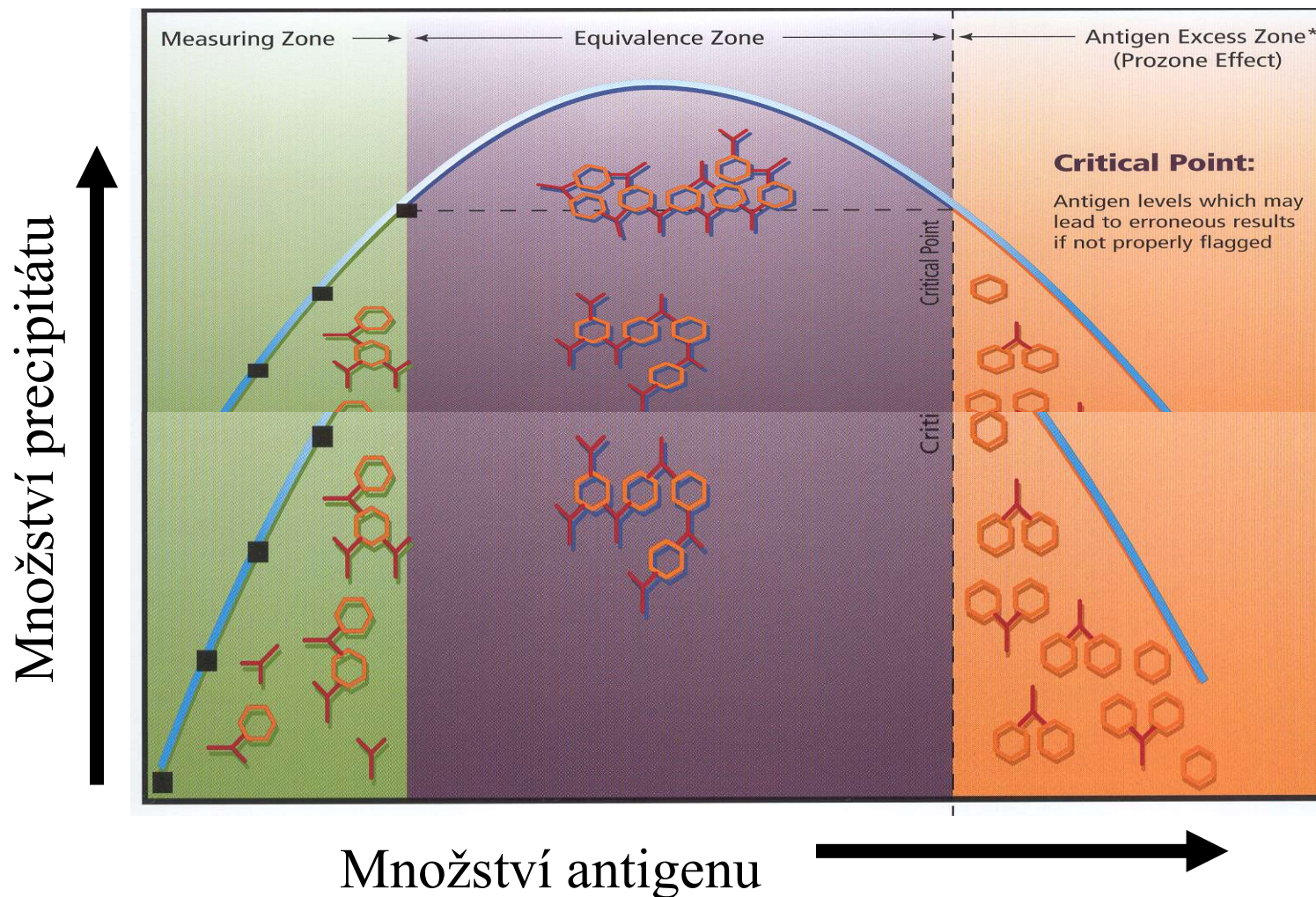


radioaktivita

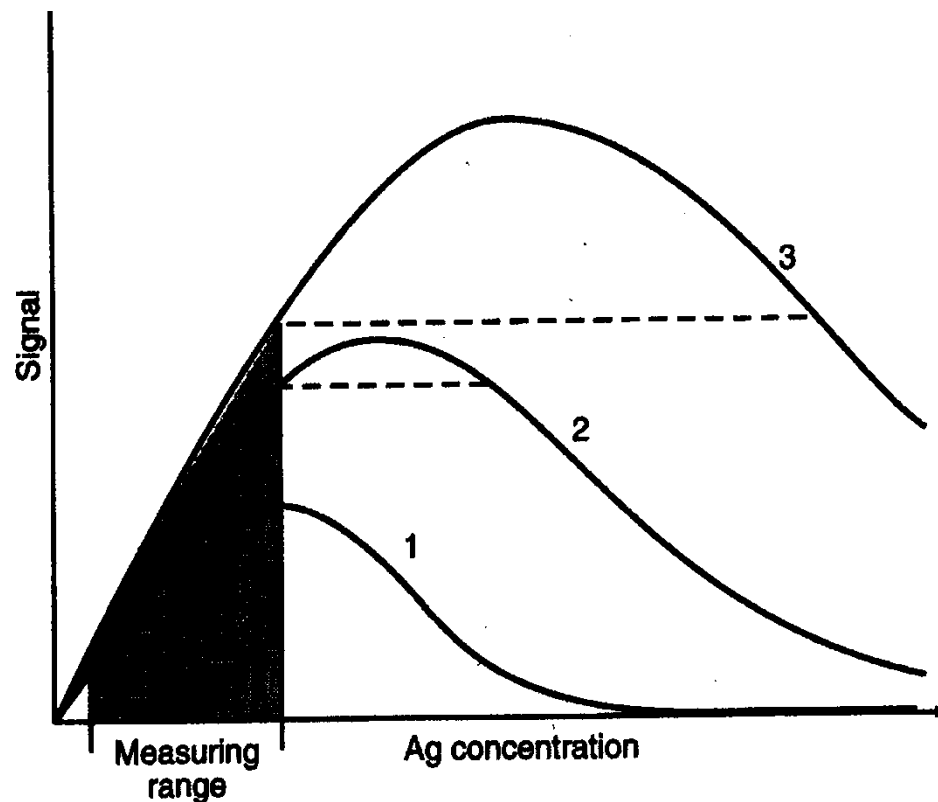


# Heidelbergerova-Kendallová křivka

(Heidelberger M, Kendall FE. A quantitative theory of the precipitation reaction. *J Exp Med* 1935, 62: 697-720)

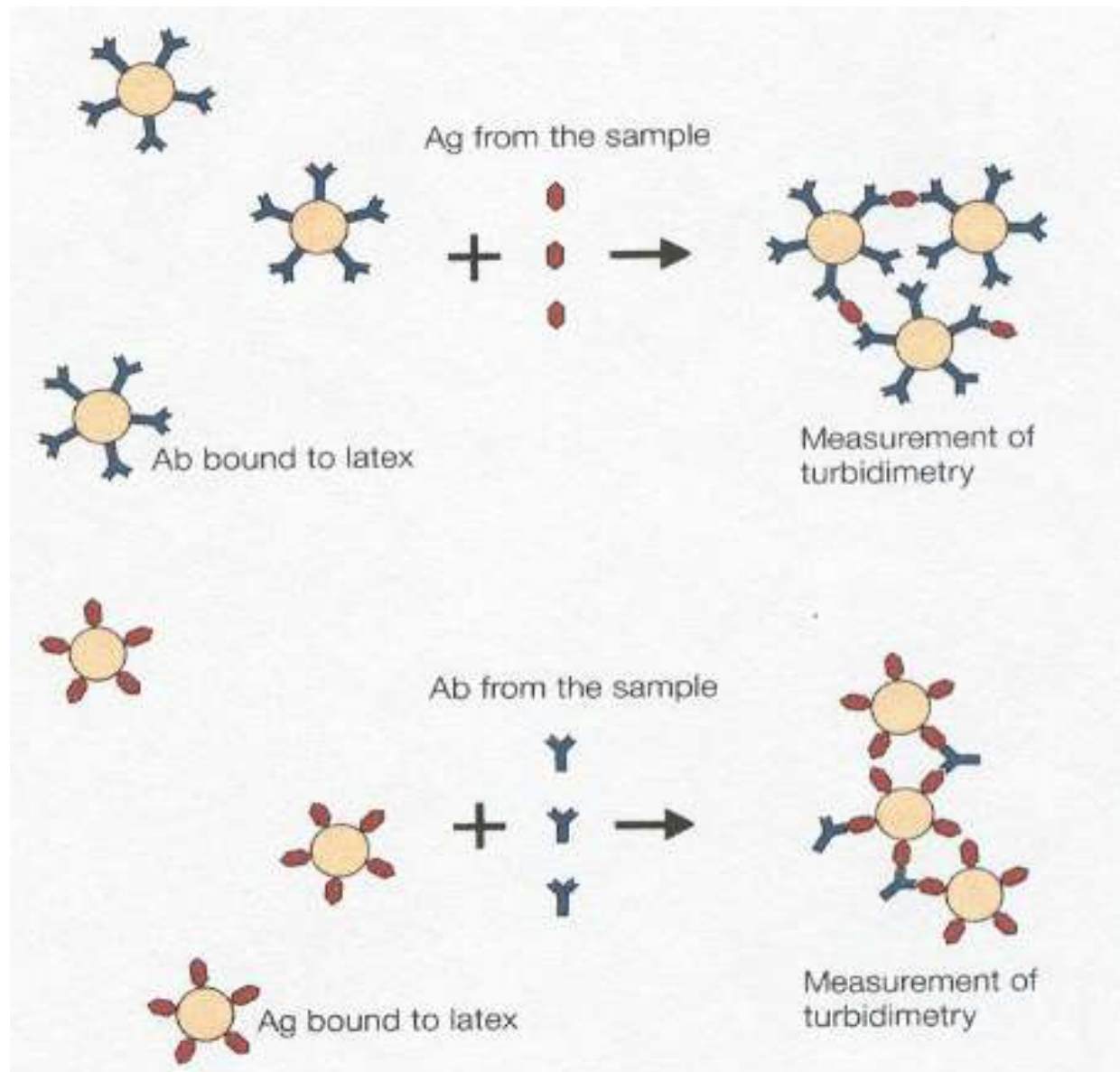


## Vliv koncentrace protilátky na zónu „bezpečí“



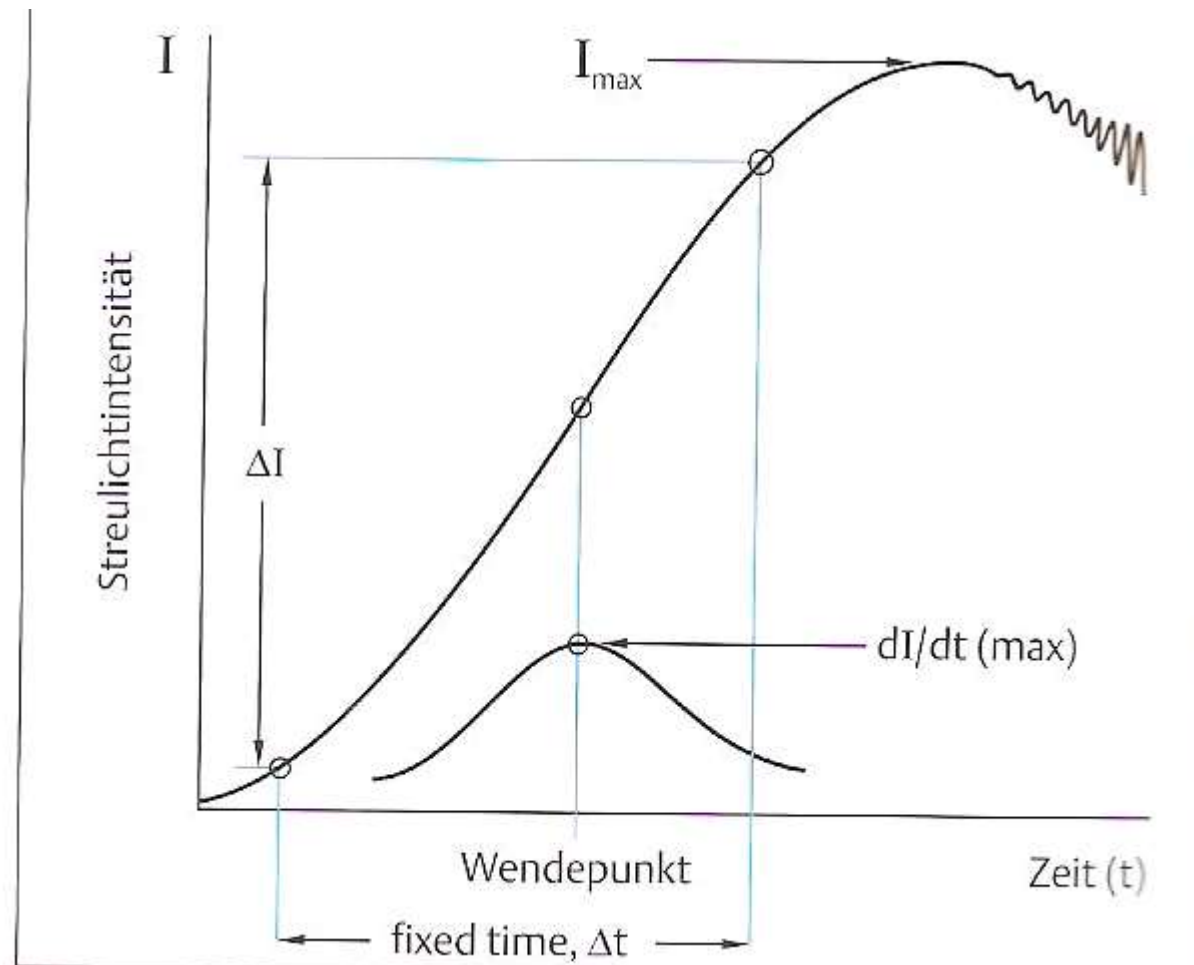
*Figure 19. Dose-response curves illustrating the effect of increasing antibody concentration on the security range (dotted line).  
1: Low, 2: Medium, 3: High antibody concentration.*

## Využití latexových částic (pro nízké koncentrace analytu)



# Kinetika versus end-point stanovení

(obr. z H. Reiber: Methodische Grundlagen der Analytik. In: Wildemann, Oschmann, Reiber (Eds.): Neurologische Labordiagnostik. Thieme, Stuttgart, 2006: p. 20.)



# End point nefelometrie

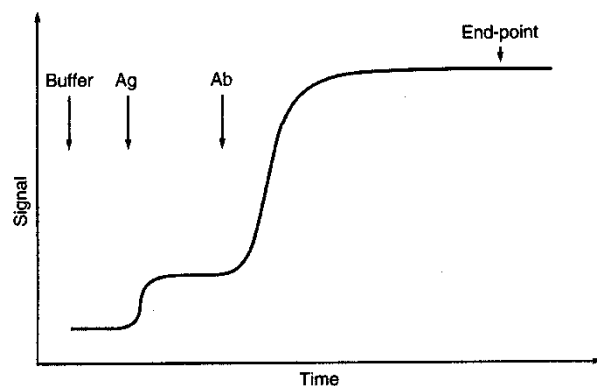


Figure 3. Signal development as a function of time. The addition of buffer, antigen (Ag), and antibody (Ab) to the reaction cuvette is indicated by arrows.

fixní čas

# Rate nefelometrie

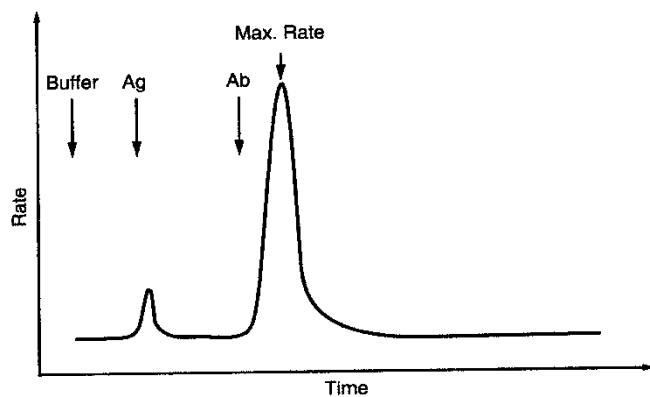
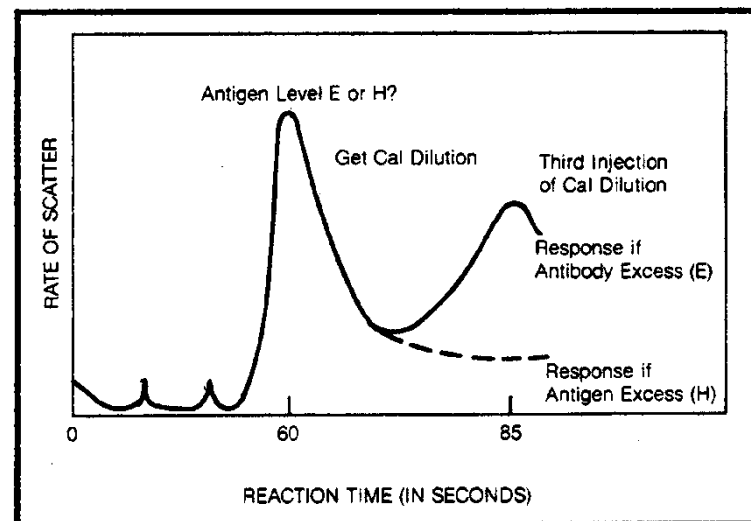
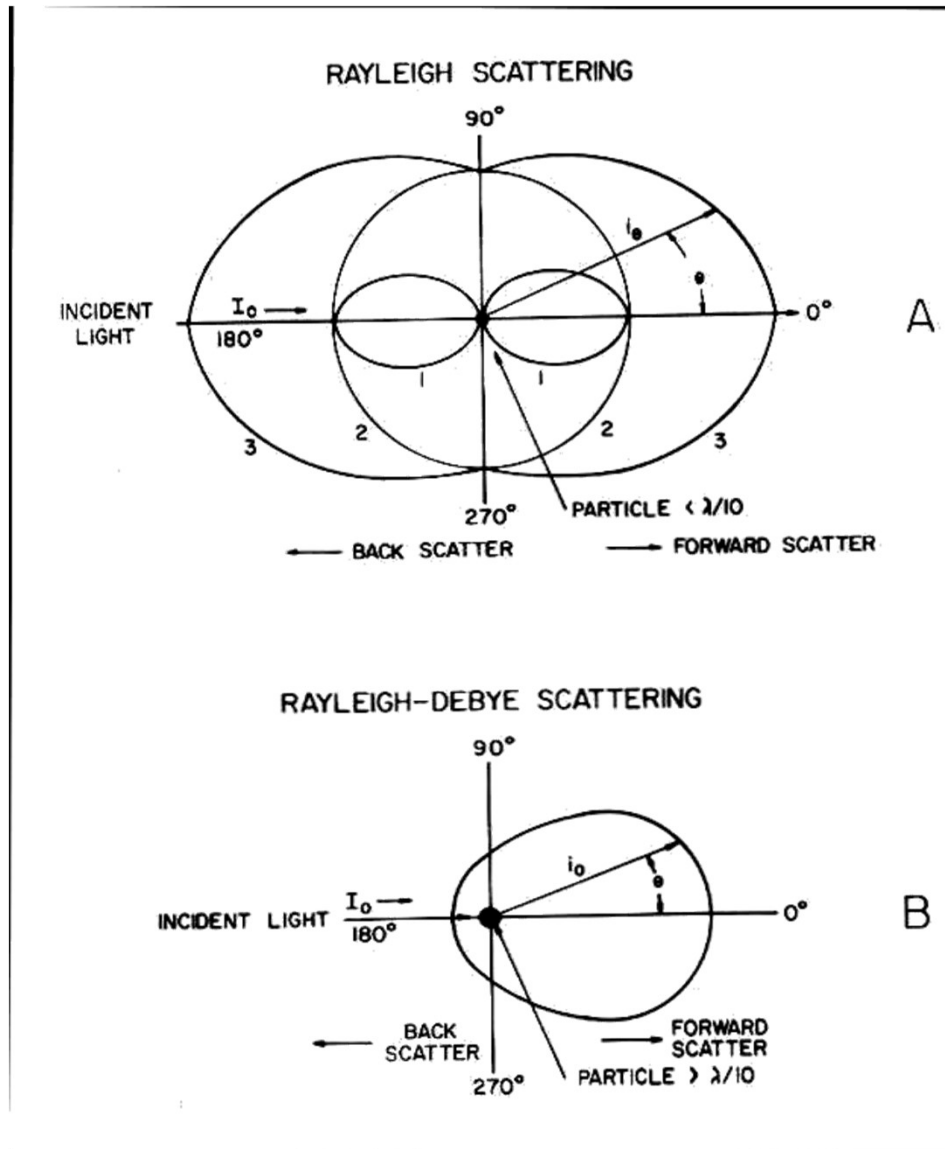


Figure 4. Reaction velocity (rate) as a function of time. The addition of buffer, antigen (Ag), and antibody (Ab) to the reaction cuvette is indicated by arrows.





## Vliv velikosti částice a vlnové délky



## Lord Rayleigh (1871)

$$I_s = I_0 \cdot 16 \cdot \pi^2 \cdot a \cdot \sin^2 \Theta / \lambda^4 \cdot r^2$$

$I_s$  – intenzita rozptylu

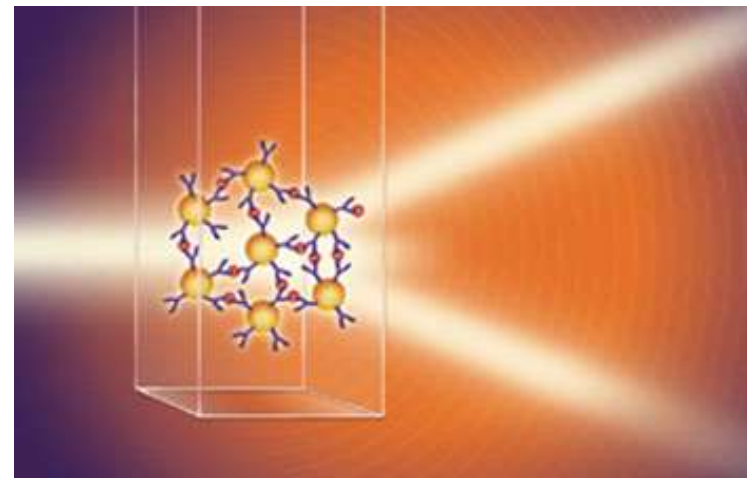
$I_0$  – intenzita původního paprsku

$a$  – koeficient polarizovatelnosti

$\Theta$  – úhel pozorování

$\lambda$  – vlnová délka

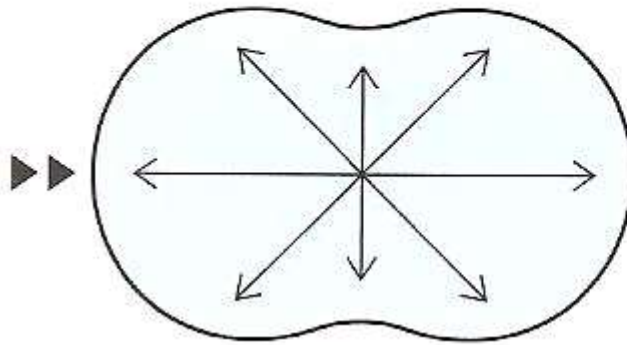
$r$  – vzdálenost od detektoru



# Nefelometrie: rozptyl světla na částicích

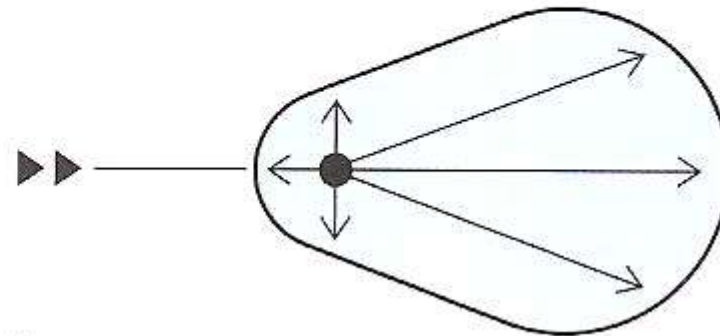
(obr. z H. Reiber: Methodische Grundlagen der Analytik. In: Wildemann, Oschmann, Reiber (Eds.): Neurologische Labordiagnostik. Thieme, Stuttgart, 2006: p. 20.)

Rayleigh-Streuung  
( $d \ll \lambda$ )



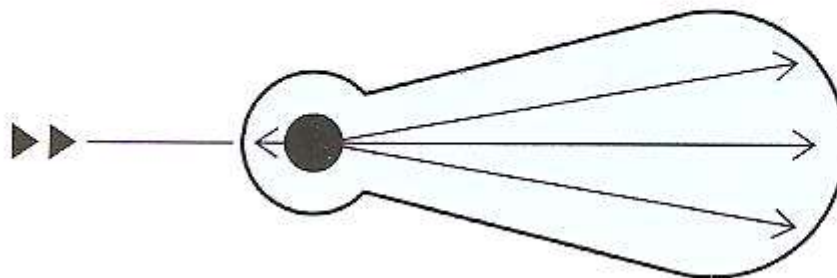
a

Rayleigh-Debye-Streuung  
( $d \leq \lambda$ )



b

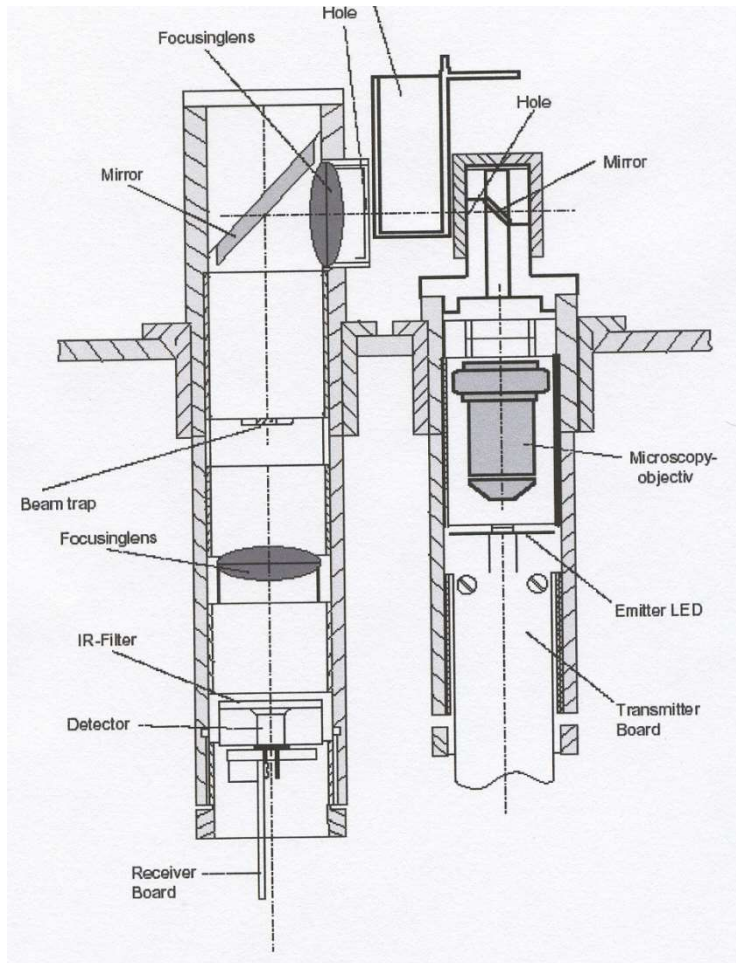
Mie-Streuung  
( $d > \lambda$ )



c

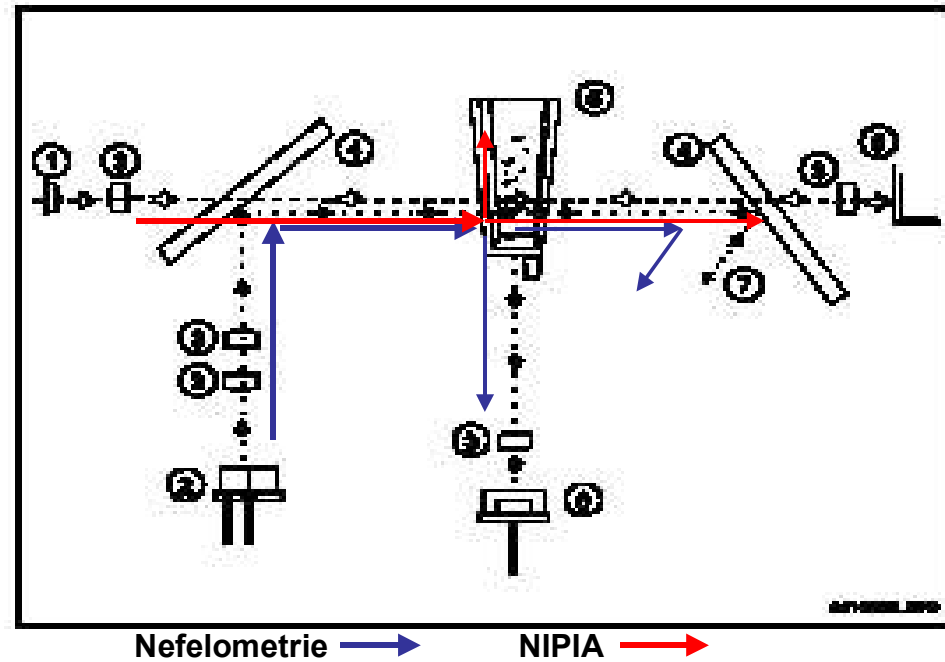
- ▶▶ = einfallender Lichtstrahl
- = Richtung und Intensität des Streulichts
- d = Partikeldurchmesser
- $\lambda$  = Wellenlänge

# Nefelometr BN 100



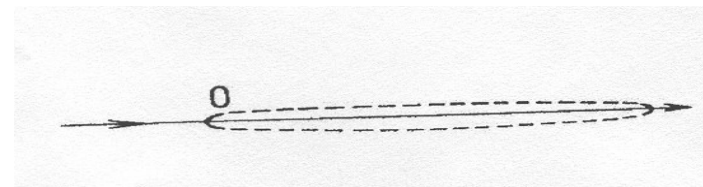
840 nm

# Nefelometr Image 680 nm



## NIPIA režim

(near infra-red particle immunoassay)



940nm



## Shrnutí:

### Turbidimetrie

- snížení intenzity paprsku světla po průchodu mikroheterogenním prostředím roztoku ( $180^\circ$ )
- turbidance způsobena: rozptylem, odrazem, absorpcí
- možnost měření citlivými spektrofotometry
- s příchodem stabilních fotometrů s vysokým rozlišením konkuruje v citlivosti nefelometrii v oblasti metod pro imunologickou kvantifikaci sérových proteinů

### Nefelometrie

- detekce světelné energie rozptýlené nebo odražené směrem k detektoru, v jiném úhlu než  $180^\circ$
- často měření v úhlu  $90^\circ$ , jindy v menším úhlu při rozptylu na větších částicích
- metoda volby : vyšší senzitivita (zejm. v end-point provedení) pro detekci nízkých hladin komplexu Ag-Ab

# Pojmy absorbance (A) a optická denzita (OD)

- **Absorbance (A)**
  - $A = \log (1/T)$
  - Zeslabení paprsku po průchodu reakčním prostředím způsobené absorpcí = pohlcením fotonu spojeným s excitací molekuly do vyššího energetického stavu
  - Ve zředěných roztocích platí pro A Lambertův-Beerův zákon:  $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$ , tj. lze předpokládat lineární závislost A na koncentraci stanovovaného analytu
- **Optická denzita (OD)**
  - $OD = \log (1/T)$
  - Zeslabení paprsku po průchodu reakčním prostředím způsobené absorpcí, rozptylem světla aj.
  - OD je pojem nadřazený pojmu A
  - Pro OD obecně neplatí Lambertův-Beerův zákon, tj. nelze **obecně** předpokládat lineární závislost OD na koncentraci stanovovaného analytu  $\Rightarrow$  často třeba vícebodová kalibrace

**Certifikovaný referenční materiál (CRM) na bázi lidského  
séra:  
ERM-DA470k/IFCC**

<b>Protein</b>	<b>Certifikovaná hodnota</b>	<b>nejistota</b>
Alfa2-makroglobulin (A2M)	1,43 g/L	0,06 g/L
Alfa1-kyselý glykoprotein (AAG)	0,617 g/L	0,013 g/L
Alfa1-antitrypsin (AAT)	1,12 g/L	0,03 g/L
Albumin	37,2 g/L	1,2 g/L
C3c	1,00 g/L	0,04 g/L
C4	0,162 g/L	0,007 g/L
Haptoglobin (HPT)	0,889 g/L	0,021 g/L
IgA	1,80 g/L	0,05 g/L
IgG	9,17 g/L	0,18 g/L
IgM	0,723 g/L	0,027 g/L
Transferin (TRF)	2,36 g/L	0,08 g/L
Transthyretin (prealbumin) (TTR)	0,220 g/L	0,018 g/L
Beta2-mikroglobulin (B2M)	2,17 mg/L	0,07 mg/L

# Prealbumin = transthyretin

- M.r. 54 000
- Syntéza v játrech (a v plexus choroideus mozkových komor)
- Asociace s retinol-vázajícím proteinem
- Krátký biologický poločas ⇒ citlivý ukazatel stavu výživy a proteosyntézy v játrech
- Schopnost vázat dvě molekuly  $T_4$  nebo  $T_3$
- Referenční meze: 0,2 – 0,4 g/l
- Snížení: snížený příjem proteinů; jaterní nemoci (snížená syntéza)
- Zvýšení: onemocnění ledvin (snížená rychlost glomerulární filtrace)

# Albumin

- M.r. 67 000
- Gen na 4. chromosomu
- Jeden řetězec, 585 aminokyselin; neobsahuje sacharidy (není glykoprotein)
- Referenční meze: 35-53 g/l
- FUNKCE:
- Fyzikálně-chemické: zajišťuje koloidně-osmotický (onkotický) tlak, pufrovací kapacita
- Transportní funkce

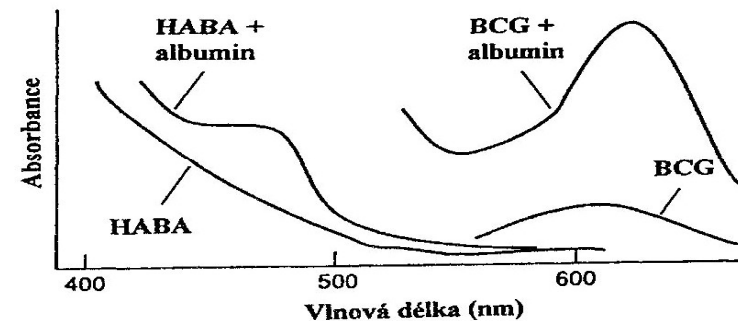
## Albumin – transportní funkce

- Látky ve vodě nerozpustné:
  - nekonjugovaný bilirubin
  - Mastné kyseliny
  - Hormony
  - Léky (!)
- Látky hydrofilní (adsorpcí):
  - $\text{Ca}^{++}$
  - $\text{Zn}^{++}$
  - Kyselina močová

# Stanovení albuminu

(schéma vpravo z F. Novák: Úvod do klinické biochemie. Karolinum, Praha 2002)

- Vazba barviva  $\Rightarrow$  změna jeho absorpčního maxima: bromkresolová zeleň (BCG); bromkresolový purpur (BCP), 2-(4'-hydroxyazobenzen)benzoová kyselina (HABA)
- BCG: v prostředí o pH 4,2 fotometrické měření při 630 nm: pozitivní interference ( $\alpha_1$  a  $\alpha_2$ -globuliny) se zvyšuje s časem a teplotou  $\Rightarrow$  měřit rychle (30 s po smíchání séra s barvivem)
- Reakcí se specifickou protilátkou proti lidskému albuminu (RID, turbidimetrie, nefelometrie)
- Stanovení CB + výpočet koncentrace albuminu z elfo (denzitometrické vyhodnocení)



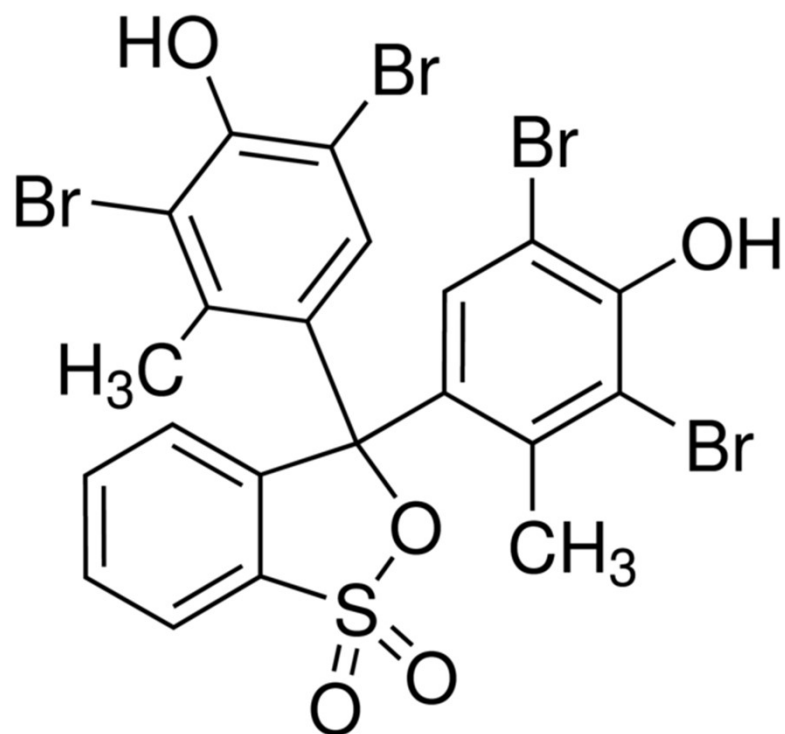
Obr. 6-4 Spektra BCG, HABA a jejich komplexů s albuminem

## Barviva využívaná pro stanovení albuminu

### Bromocresol green (BCG)

3,3',5,5'-Tetrabromo-*m*-cresolsulfonphthalein

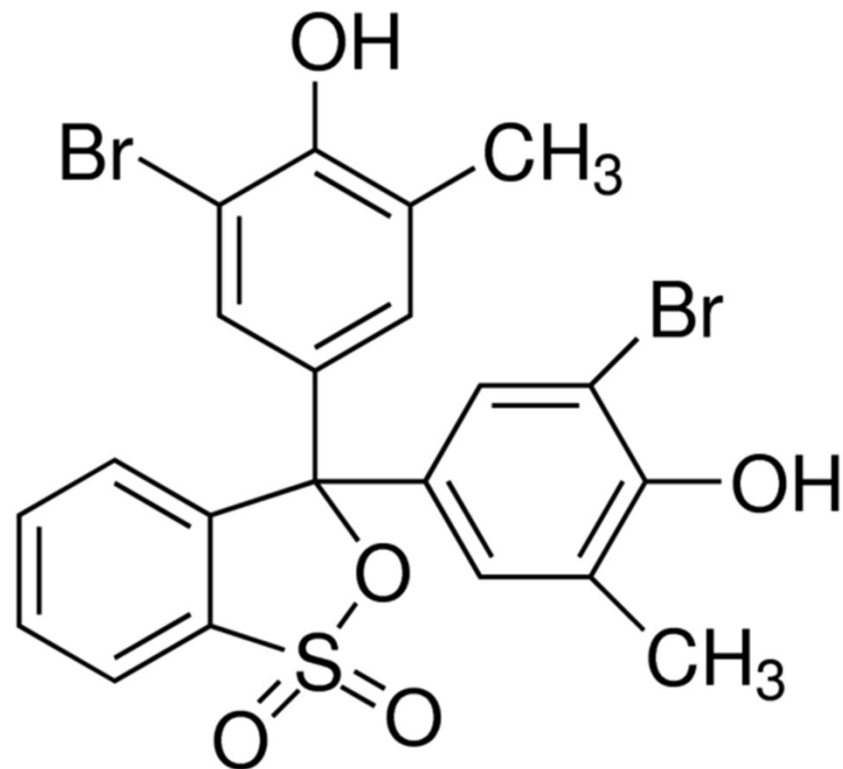
M.w. 698.01



### Bromocresol purple (BCP)

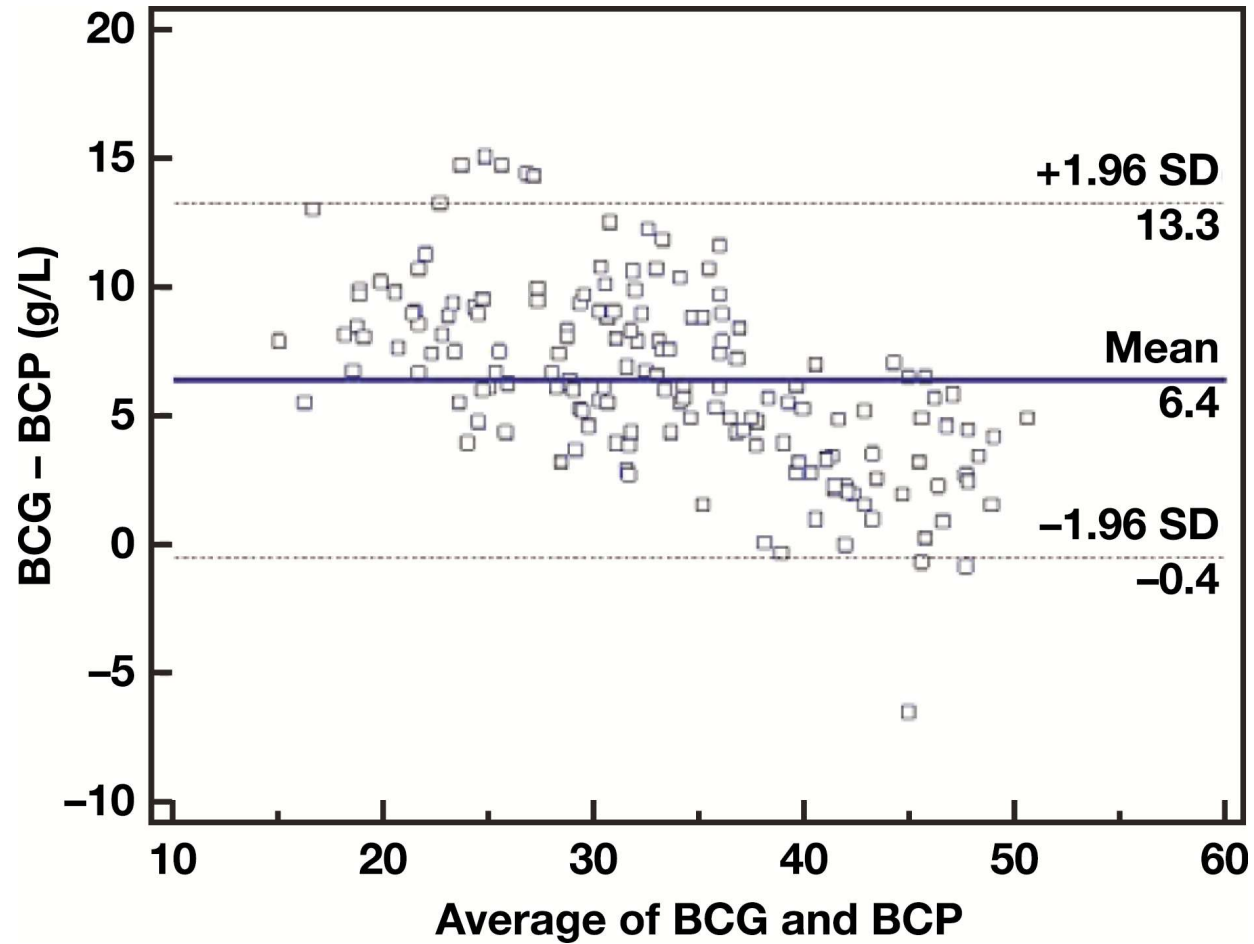
5,5'-Dibromo-*o*-cresolsulfonphthalein

M.w. 540.22

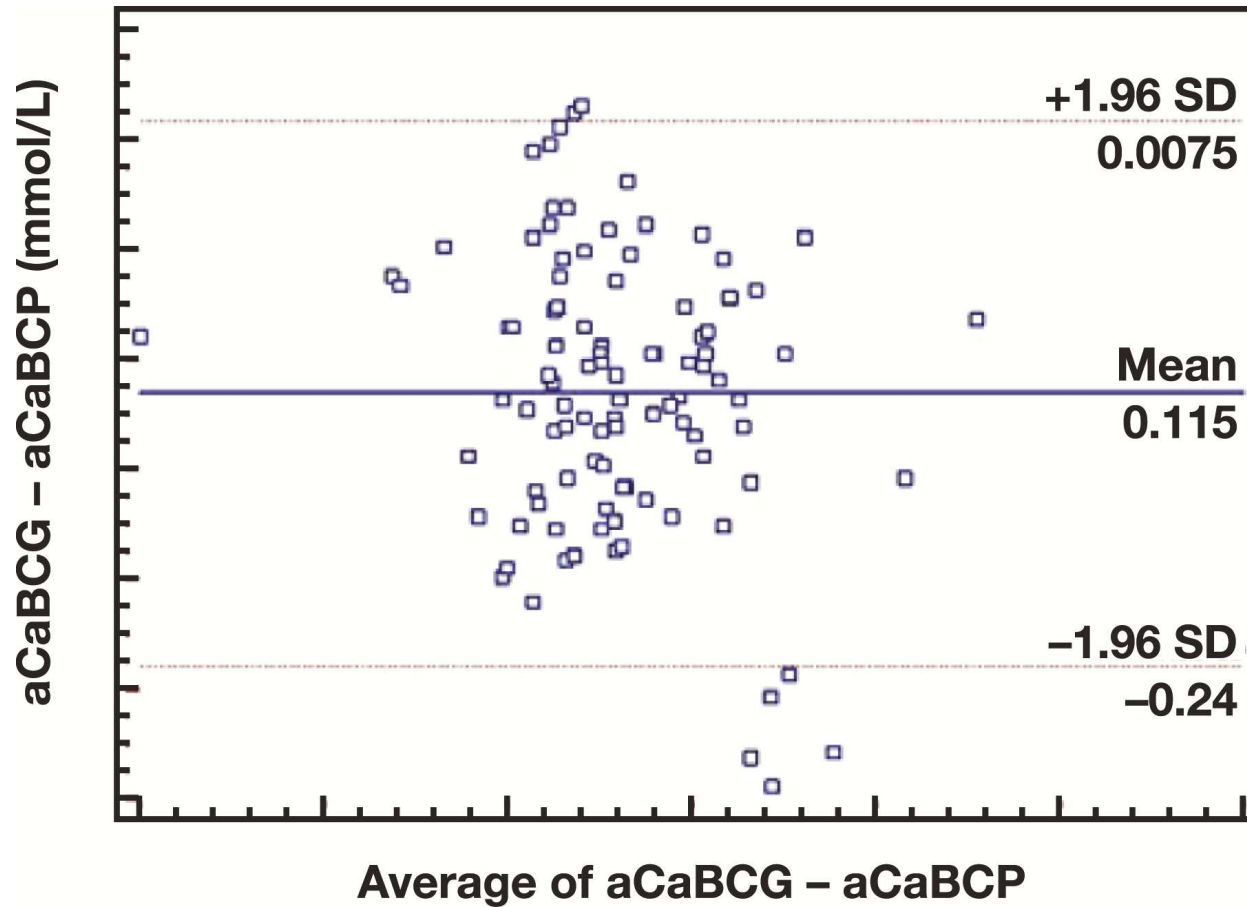




**Figure 1** Average and range for albumin values, as tested by bromocresol green (BCG) and bromocresol purple (BCP) ...



**Figure 6** Bland–Altman analysis for adjusted calcium (aCa) in mmol/L calculated according to the 2 methods available ...



# Výhody a nevýhody metod pro stanovení koncentrace albuminu v séru/plazmě

Moreira VG et al. *Lab Med*, Volume 49, Issue 4, November 2018, Pages 355–361

Bromkrezolový purpur (BCP)	Bromkrezolová zeleň (BCG)
Podhodnocuje koncentraci albuminu u selhání ledvin a dialyzovaných pacientů	Nadhodnocuje koncentraci albuminu v oblasti nízkých koncentrací, podhodnocuje koncentraci albuminu v oblasti vysokých koncentrací
Specifičtější, protože se váže na lidský albumin a neváže se na globuliny	Interference specifické pro metodu – váže se nejen na albumin, ale také na $\alpha$ 1- a $\alpha$ 2-globuliny
Okamžitá reakce	Delší inkubace zvyšuje vazbu BCG na jiné bílkoviny než albumin
Výsledky v dobré shodě s imunonefelometrií a elektroforézou	Pozitivní bias oproti imunonefelometrii a elektroforéze
Snadno automatizovatelná	Snadno automatizovatelná
Vyžaduje kalibrátory a kontroly na bázi lidského séra (nízká afinita pro non-humánní albumin)	Lze použít zvířecí kontroly a kalibrátory

# **Alfa-1-globuliny**

- **Alfa-1-fetoprotein (AFP)**
- **Alfa-1-lipoprotein (HDL)**
- **Alfa-1-glykoprotein (orosomukoid; AAG = alfa-1-acid glycoprotein)**
- **Alfa-1-antitrypsin (AAT)**
- **Alfa-1-antichymotrypsin**

# Alfa-1-antitrypsin

## (AAT, $\alpha_1$ -inhibitor proteinas = $\alpha_1$ -Pi)

- Kvantitativně nejvýznamnější inhibitor proteinas v plazmě
- 33 genetických variant
- Defektní alely: deficit AAT – nedostatečná inaktivace proteinas (elastasy) vznikajících při fagocytóze v plicních sklípcích  $\Rightarrow$  proteolytická destrukce elastinu  $\Rightarrow$  plicní emfyzém  $\Rightarrow$  porucha ventilace, náchylnost k těžkým infekcím dýchacích cest

# Alfa-1-antitrypsin (AAT)

- Indikace vyšetření:
  - podezření na vrozený nedostatek AAT  
( $\downarrow\downarrow\alpha_1$ -globulinové frakce na elfo!)
  - Pacienti s plicním emfyzémem
  - Novorozenci a kojenci s nejasnou hepatopatií
- Metody stanovení:
  - 1) Imunochemicky (RID, **nefelometrie**)
  - 2) Amidolytické stanovení:  
AAT + trypsin (v nadbytku)  
→ komplex AAT-trypsin  
+ zbylý volný trypsin  
BAPA (chromogen) →  
benzoylarginin + p-nitroanilin (fotometrické stanovení při 405 nm)

# Alfa-1-antitrypsin

- Referenční meze:

Novorozenci 2,0 – 4,0 g/l

Kojenci 1,3 – 2,4 g/l

Děti 1,3 – 3,0 g/l

Dospělí 1,9 – 3,5 g/l

- Speciální vyšetření při nedostatku AAT:
  - Izoelektrická fokusace
  - Určení genotypu molekulárně-biologickými metodami

## **Alfa-1 kyselý glykoprotein (AAG, orosomukoid)**

- M.r. 40 000, pI 2,7; poločas: 2-3 dny
- 45 % sacharidů
- Syntéza v játrech
- Referenční meze: 0,48 – 1,26 g/l
- Reaktant akutní fáze (vzestup za 12-24 hodin, maximum za 4 dny) ⇒ výhodné stanovení současně s CRP (začátek/vrchol/odeznívání onemocnění)



# **Alfa-2-globuliny**

- **Ceruloplazmin**
- **Inhibitor C1-esterasy (C1-INH)**
- **Haptoglobin (Hp)**
- **Alfa-2-makroglobulin**
- **Pre-beta-lipoprotein (VLDL)**

# Ceruloplazmin

- M.h. 150 kD
- 1 molekula váže 8 atomů mědi
- 95 %  $\text{Cu}^{2+}$  v séru je vázáno na ceruloplazmin
- Funkce: a) transport mědi, b) jako ferroxidasa – oxiduje  $\text{Fe}^{2+}$  na  $\text{Fe}^{3+}$  (nutný krok pro zabudování  $\text{Fe}^{2+}$  do molekuly transferrinu)
- **Referenční meze:** 165 – 660 mg/l
- **Zvýšení:** jako (později reagující) protein akutní fáze (antioxidační působení?) při zánětech, cholestáza, cirrhosa jater, nádorová onemocnění; vlivem estrogenů (v těhotenství, při užívání perorálních kontraceptiv)
- **Snížení:** Wilsonova nemoc, Menkesův syndrom

# Haptoglobin

- Dva lehké řetězce ( $\alpha$ ) a dva těžké řetězce ( $\beta$ ) navzájem spojené disulfidovými můstky
- Syntéza v játrech
- Poločas odbourávání 3,5-4 dny
- Funkce: vychytávání uvolněného hemoglobinu (zábrana ledvinného poškození a ztrátám Fe), antiproteinasová aktivita
- Referenční meze: podle typu (Hp 1-1, 2-1, 2-2)
- Zvýšení: reaktant akutní fáze
- Snížení: tvorba haptoglobin-hemoglobinových komplexů (intravaskulární hemolýza; komplex vychytáván z krevního oběhu za 9 minut)

## **Alfa-2-makroglobulin**

- M.r. 725 000
- Inhibitor proteinas
- Vysoká molekulová hmotnost  $\Rightarrow$  u nefrotického syndromu (ztráty bílkovin – viz dále) zůstává v plazmě a odpovídá za relativně vysokou hodnotu alfa-2 frakce

# Beta-globuliny

- **Beta-lipoprotein (LDL)**
- **Hemopexin (Hx)**
- **Transferrin (Tf)**
- **Komplement (C3, C4)**
- **Fibrinogen (Fbg)**
- **CRP**
- **Beta-2-mikroglobulin**
- **Zčásti imunoglobuliny**

# Hemopexin

- M.r. 57 000
- Váže uvolněnou hemovou skupinu a přenáší ji do jater k metabolické konverzi na bilirubin
- Referenční meze: 0,5 – 1,5 g/l
- Snížen tehdy, kdy se v plazmě objeví volný hem
- U hemorhagické pankreatitidy a krvácení do tělesných dutin je hemopexin snížen při  $\pm$  normálních hodnotách haptoglobinu

# Transferin

- M.h. 76 kD
- Referenční meze:
  - ženy 1,74 – 2,78 g/l
  - Muži 0,83 – 2,96 g/l
- Funkce: každá molekula transferinu má dvě vazebná místa pro  $\text{Fe}^{3+}$
- Může vázat také Mn, Cu a jiné kovy
- Apo-transferin syntetizován zejména v játrech, syntéza stoupá při nedostatku železa

# Transferrin

- Saturace transferrinu – výpočet:
- $TfS (\%) = 3,98 * Fe-S (\mu mol/l) / Transferrin (g/l)$
  
- **Index selektivity S:**
- $S = (IgG-U/IgG-S) : (Transferrin-S/Transferrin-U)$
- $S < 0,1$  ... selektivní proteinurie
- $S > 0,2$  ... neselektivní proteinurie
- $0,1 < S < 0,2$  ... selektivitu nelze vyhodnotit
- **Alternativa: Albumin/IgG index**



# Komplement

- Soustava cca 30 sérových a membránových bílkovin; hlavní složky: 9 sérových bílkovin označovaných C1-C9
- Ústřední složkou je C3: fragment C3b se pevně (kovalentně!) váže na mikrobiální povrch
- Komplex C5b-C9: „MAC“ = membrane attack complex – perforuje membrány některých mikroorganismů (mikroorganismy však mohou být vůči lytickému působení komplementu chráněny buněčnou stěnou)

# Funkce komplementu

- **Oponizace (C3b)**
- **Chemotaxe (C3a, C5a)**
- **Osmotická lýza (MAC: C5b-C9)**
- *AKTIVACE KOMPLEMENTU:*
  - **klasická cesta:** vazba protilátky (nebo pentraxinů – CRP; nebo mannosu vázající lektin /“lektinová cesta“/) na povrch (např. bakterie) → odhalení vazebného místa pro C1 → navázané C1 získá proteolytickou aktivitu – štěpí proteiny C4 a C2 → vzniká „klasická“ C3-konvertasa (C4bC2a), ta štěpí C3 na C3a a C3b → vzniká C5-konvertasa (C4bC3bC2a)
  - **alternativní cesta:** C3 se v malé míře samovolně štěpí na C3b a C3a; v C3b se odhalí reaktivní thioesterová skupina, která reaguje s hydroxy- a aminoskupinami v blízkém okolí (na povrchu nějaké částice); k C3b se připojí faktor B, ten je pak štěpen faktorem D na Ba a Bb; komplex C3bBb stabilizovaný faktorem P (properdin) působí jako alternativní C3-konvertasa

# Komplement – diagnostické využití

- C1-INH = inhibitor C1-esterasy vrozený deficit je příčinou hereditárního angioneurotického edému (Quinckeho edém)
- C3, C4: omezený význam v diagnostice imunokomplexových onemocnění (SLE, glomerulonefritis)

## Beta-2-mikroglobulin

- M.r. 12 000
- Součást HLA antigenů I. třídy, exprimován zejména hojně na povrchu lymfocytů
- Dříve používáno stanovení v moči v diagnostice tubulárních proteinurií (ALE: nestabilní v kyselé moči)
- Stanovení v séru: biomarker u malignit vycházejících z lymfocytární řady

# Fibrinogen

- Na elektroforeogramu plazmy migruje v beta-gama interzóně
- Koagulační faktor (faktor I)
- M.r. 340 000
- Dimer ze tří polypeptidových řetězců
- Funkce: regulovaná přeměna na fibrin
- Referenční meze: 2,5 – 3,6 g/l (u starších jedinců až 4,8 g/l)
- **Metody stanovení:** a) klasická metoda založená na trombinem katalyzované přeměně fibrinogenu na fibrin, b) reakce se specifickou protilátkou (elektroforéza není vhodná – nedokonalá separace fibrinogenu mezi frakcemi  $\beta$ - a  $\gamma$ - globulinů)

# **Gama-globuliny: IMUNOGLOBULINY**

- **IgG, IgA, IgM, IgD, IgE**
- **Těžké řetězce gamma, alfa, mí, delta, epsilon ( $\gamma, \alpha, \mu, \delta, \epsilon$ )**
- **Lehké řetězce kappa ( $\kappa$ ), lambda ( $\lambda$ )**
- **Molekula Ig tvořena 2 těžkými a 2 lehkými řetězci (vždy stejné)**

# Imunoglobuliny – základní charakteristiky

izotyp	Biol. poločas (dny)	lokalizace	funkce	Konc. v séru (g/l)
<b>IgG</b>	21	Sérum, intersticiální tekutina	Oponizace; neutralizace; aktivace komplementu; přestup placentou; sekundární protilátková reakce	7-16
<b>IgA</b>	6	Sérum, slzy, sliny, povrch sliznic, kolostrum, mateřské mléko	Ochrana sliznic, oponizace	0,8-4,0
<b>IgM</b>	6	Sérum, membrána B lymfocytů	Aktivace komplementu; primární protilátková reakce; receptor pro Ag na B lymfocytech	0,5-2,4
<b>IgD</b>	3	Sérum, membrána B lymfocytů	Receptor pro Ag na B lymfocytech	0,1
<b>IgE</b>	2	Sérum, intersticiální tekutina	Ochrana proti parazitům	0,0003

# Imunoglobuliny

- **Snížené koncentrace: hypoimmunoglobulinémie**
    - primární (hereditární) defekty
    - sekundárně: těžký nefrotický syndrom, snížená syntéza při nádorových onemocněních, těžké infekce, cytostatická léčba; zvýšené odbourávání (hyperthyreosa, myotonická dystrofie, některá autoimunitní onemocnění)
  - **Zvýšené koncentrace: hyperimmunoglobulinémie**
    - polyklonální: kompetentní odpověď imunitního systému na infekci
    - Monoklonální („paraproteinémie“):
      - a) MGUS: monoklonální gamapatie neurčeného významu
      - b) maligní: plazmocytom (IgG>IgA>fLC>IgM>>nemoc těžkých řetězců, IgD, kryoglobulinémie)
- Pozn.: IgM = „Waldenströmova makroglobulinémie“

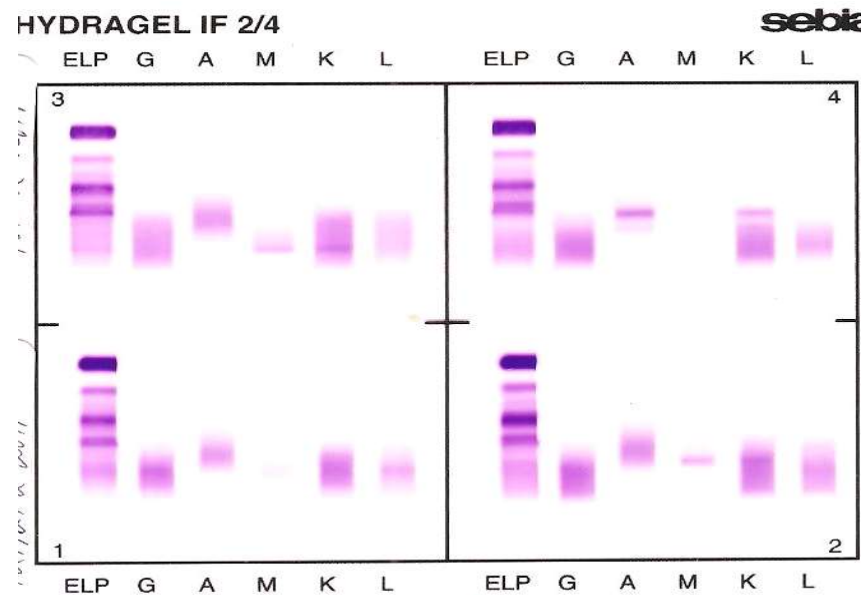


# Kryoglobuliny

- **imunoglobuliny reverzibilně precipitující při teplotách nižších než je teplota lidského těla.**
- Dělíme je do 3 typů:
  - - I. typ: izolované monoklonální kryoglobuliny (paraproteiny IgM, vzácněji IgG, IgA nebo monoklonální lehké řetězce)
  - - II. typ: smíšené kryoglobuliny (kombinace paraproteinu s polyklonálním imunoglobulinem, obvykle paraprotein IgM s protilátkovou aktivitou proti polyklonálním IgG)
  - - III. typ: polyklonální imunoglobuliny, kdy je kryoglobulin tvořen imunoglobuliny jedné nebo více tříd tvořícími antigen-protilátkový komplex
- Kryoglobulinémie ovlivňuje řadu laboratorních vyšetření (mj. zpomaluje sedimentaci), na všechna vyšetření by měl být vzorek séra nebo plazmy předeříván; někdy se doporučuje před elektroforézou inkubace séra s merkaptoethanolem nebo dithiothreitem.
- Ještě vzácnější než kryoglobuliny jsou tzv. **pyroglobuliny** – monoklonální imunoglobuliny ireverzibilně precipitující při teplotě 56°C.

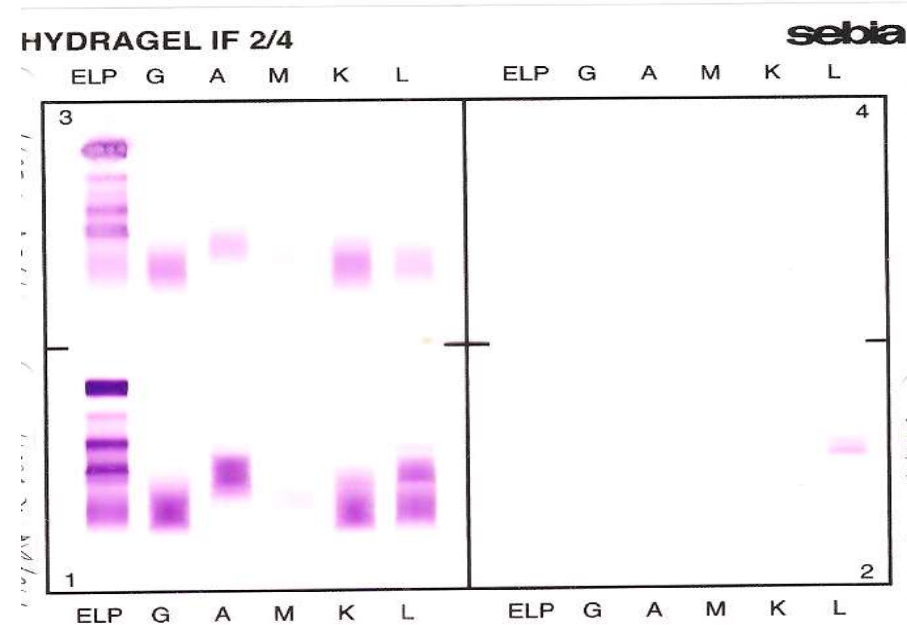
# Paraproteiny - typizace

- A) imunoelektroforéza (dnes se již téměř nepoužívá)
- B) **imunofixace** – antiséra anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-kappa, anti-lambda (dle potřeby lze použít i anti-IgD, anti-IgE, anti-free kappa, anti-free lambda) po elektroforéze „fixují“ paraprotein dané třídy v gelu, ostatní proteiny se odmyjí a gel se poté obarví



# Paraproteiny - typizace

- M gradient v zóně kappa nebo lambda bez korelátu v zónách IgG, IgA, IgM (IgD, IgE)  $\Rightarrow$  volné lehké řetězce (v moči: „Bence-Jonesova bílkovina“)



# Henry Bence Jones (1813-1873)



- První publikovaný popis bílkoviny v moči precipitující při zahřátí na 40-60°C (po dosažení teploty 75°C se precipitát rozpustí) – „hydratovaný deutoxid bílkoviny“ u pacienta s myelomem (1846)
- Dnes víme, že jde o volné lehké řetězce (Edelman a Gally 1962)

# Volné lehké řetězce (fLC)

- Kappa – gen na 2. chromosomu
- Lambda – gen na 22. chromosomu
- (těžký řetězec: gen na 14. chromosomu)
- Fyziologicky produkovány v mírném nadbytku nad těžkými řetězci
- M.r. 23 000
- Poločas v séru 2-4 hodiny (free kappa – přev. monomery), 3-6 hodin (free lambda – dimery)
- **Stanovení:** ELISA, RIA (home-made), nyní komerčně dostupné kity pro nefelometrické a turbidimetrické stanovení - protilátky vázané na latexových částicích:
  - a) Polyklonální (Freelite™ firmy The Binding Site)
  - b) Směs dvou monoklonálních (N Latex FLC kappa a lambda firmy Siemens)

# Volné lehké řetězce

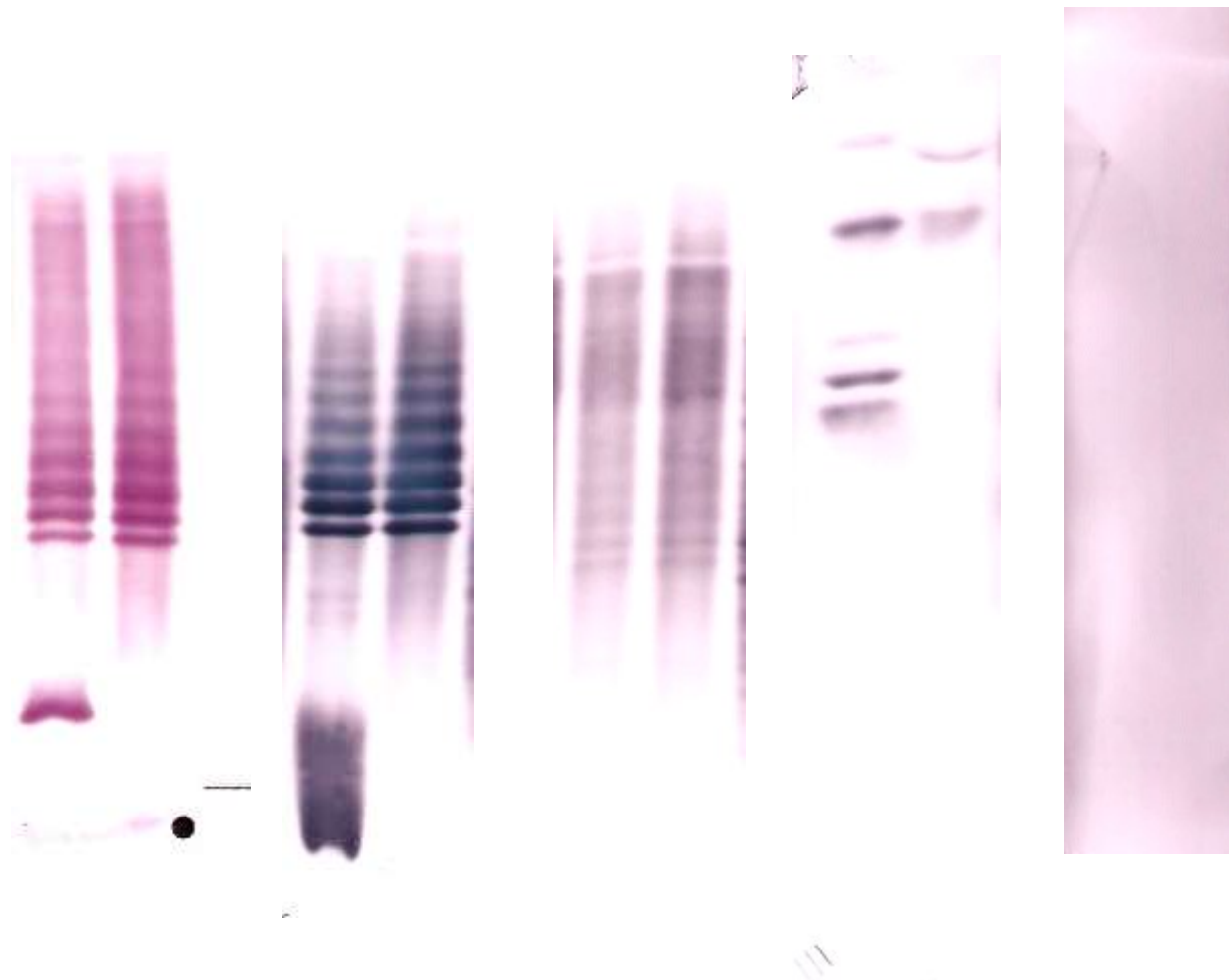
- **Referenční meze** (Freelite™):
- sérum: free kappa 3,3-19,4 mg/l, free lambda 5,7 – 26,3 mg/l; **poměr  $f\kappa/f\lambda$**  0,26 – 1,65
- Moč: free kappa  $5,4 \pm 4,95$  mg/l, free lambda  $3,17 \pm 3,3$  mg/l; průměrný poměr  $f\kappa/f\lambda$  0,46-4,0 (první ranní moč)
- **Klinický význam** stanovení v séru - marker maligního myelomu, vhodný ke sledování pacientů (drahé  $\Rightarrow$  nevhodný jako screeningový test)
- Stanovení v moči není doporučováno (*řada možných interferencí*) !

# Monoklonální IgG kappa a free kappa v séru a intrathekální syntéza v likvoru detekovaná metodou izoelektrické fokusace

*Zleva doprava:*

IgG (IEF/IF, Sebia), IgG $\kappa$ , IgG $\lambda$ , free  $\kappa$ , free  $\lambda$  (IEF/AIB)

9 9'



## Reaktanty akutní fáze

- „pozitivní“  
(koncentrace v séru/plazmě při zánětu stoupá):

CRP, SAA, AAG,  $\alpha_1$ -  
antitrypsin,  $\alpha_1$ -  
antichymotrypsin,  
haptoglobin,  
ceruloplazmin,  
fibrinogen

- „negativní“  
(koncentrace v séru/plazmě při zánětu klesá):

transferrin, prealbumin  
(transthyretin),  
albumin



# C-reaktivní protein (CRP)

- M.r. 110-140 000
- Pět identických polypeptidových podjednotek o M.r. 21 000 (každá podjednotka může vázat  $\text{Ca}^{2+}$ )
- Patří mezi tzv. pentraxiny
- Referenční meze:  $< 5 \text{ mg/l}$
- U bakteriálních zánětů zvýšení až na stovky  $\text{mg/l}$  (vzestup už po 6 hodinách, max. za 48 hod.)
- U virových zánětů normální nebo mírně zvýšené koncentrace
- Korelace s aktivitou některých autoimunitních onemocnění (revmatoidní arthritida, M. Crohn)
- **STANOVENÍ:** turbidimetricky pomocí protilátky navázané na latexové částice
- **FUNKCE:**
- Schopnost aktivovat komplement
- Vazba na různé ligandy (např. polysacharidový obal pneumokoků C, cholinové fosfatidy, některé proteiny z rozpadlých buněk)
- Oponizace fragmentů nukleových kyselin a histonů  $\Rightarrow$  jejich rychlejší odstranění  $\Rightarrow$  zábrana tvorby autoprotiilátek proti jaderným strukturám

# Další markery bakteriálního zánětu

(ke stanovení nutné použít vysoce citlivé imunanalytické metody se značeným reaktantem – ELISA, CLIA apod.)

- **Prokalcitonin**
  - Biologická funkce neznámá
  - Vzestup u systémových bakteriálních infekcí
  - Referenční meze:  $< 0,5 \mu\text{g/l}$
  - Hodnoty u těžkých bakteriálních infekcí:  $10\text{-}100 \mu\text{g/l}$
- **LBP = lipopolysacharid vázající protein**
  - Tvorba v játrech vlivem IL- $1\beta$  a IL-6; váže lipopolysacharid (LPS) gramnegativních bakterií
  - Vzestup během několika hodin u těžkých lokalizovaných i systémových bakteriálních infekcí
- **Interleukin-6**
  - Tvorba v monocytech, makrofázích, endotelových buňkách
  - Stimuluje jaterní buňky k produkci reaktantů akutní fáze (je iniciátorem vzestupu CRP)
  - Vzestup za 2-4 hodiny, koncentrace úměrná tíži zánětu
  - Méně specifický
  - Nejvyšší hodnoty u těžkých traumat a u sepse

# Proteinurie

- Glomerulární kapilární stěna (zejm. glomerulární bazální membrána) efektivně brání průniku bílkovin do moči; většina plazmatických bílkovin se za fyziologického pH chová jako polyanionty, jejichž filtraci brání negativní náboj bazální membrány glomerulů
- Většina profiltrovaného albuminu (99%) je resorbována v tubulech – fyziologicky se močí vyloučí <30 mg albuminu/24 h
- Nízkomolekulární bílkoviny jsou volně filtrovány v glomerulech, ale jsou účinně resorbovány a katabolizovány v proximálním tubulu – i jejich koncentrace v moči jsou minimální
- Fyziologická proteinurie je <150 mg/24 h, její nejvýznamnější součástí je uromodulin (Tammův-Horsfallův protein) secernovaný tubulárními buňkami Henleho kličky (30 – 50 mg/24 h)

# Proteinurie

- **Doporučená stanovení:**
  - **Albumin:** uvádět v mg/L a jako ACR (poměr albumin/kreatinin v g/mol)
  - **Celková bílkovina:** uvádět v g/l a jako PCR (poměr protein/kreatinin v g/mol)
  - Orientační semikvantitativní stanovení proteinu testovacími proužky v moči (mez detekce cca 150 mg/L)
- *Je preferován „náhodný“ (nejlépe první ranní) vzorek moči před 24-hodinovým sběrem*
- *Korekce na kreatinin* (poměr bílkovina/kreatinin, albumin/kreatinin)

Kategorie CKD podle albuminurie a porovnání s proteinurií			
	A1	A2	A3
Albuminurie (mg/24h)	<30	30 - 300	>300
ACR (g/mol kreatininu)	<3	3 - 30	>30
Proteinurie (mg/24 h)	<150	150 - 500	>500
PCR (g/mol kreatininu)	<15	15 - 50	>50
Doporučení České nefrologické společnosti a ČSKB k diagnostice chronického onemocnění ledvin (CKD) 2021			

**Mikroalbuminurie** = vylučování malých množství albuminu močí (žádný „mikroalbumin“ neexistuje!)

*— dnes víceméně historický, ale stále používaný termín*

- 20 – 200 mg/l
- Kvantitativní nefelometrické nebo turbidimetrické stanovení
- Často známkou počínající diabetické nefropatie nebo poškození ledvin při hypertenzi (vysokém krevním tlaku)

# Diferenciální diagnostika proteinurií

podle Doporučení České nefrologické společnosti a ČSKB k diagnostice chronického onemocnění ledvin (CKD) 2021, [www.cskb.cz](http://www.cskb.cz) – sekce Doporučení

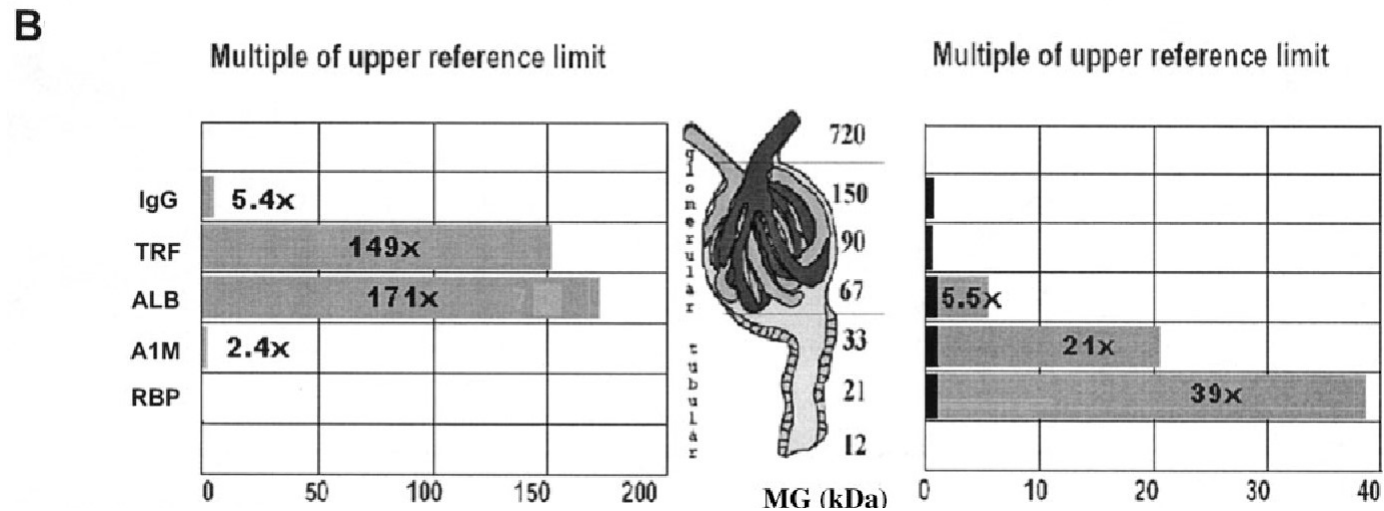
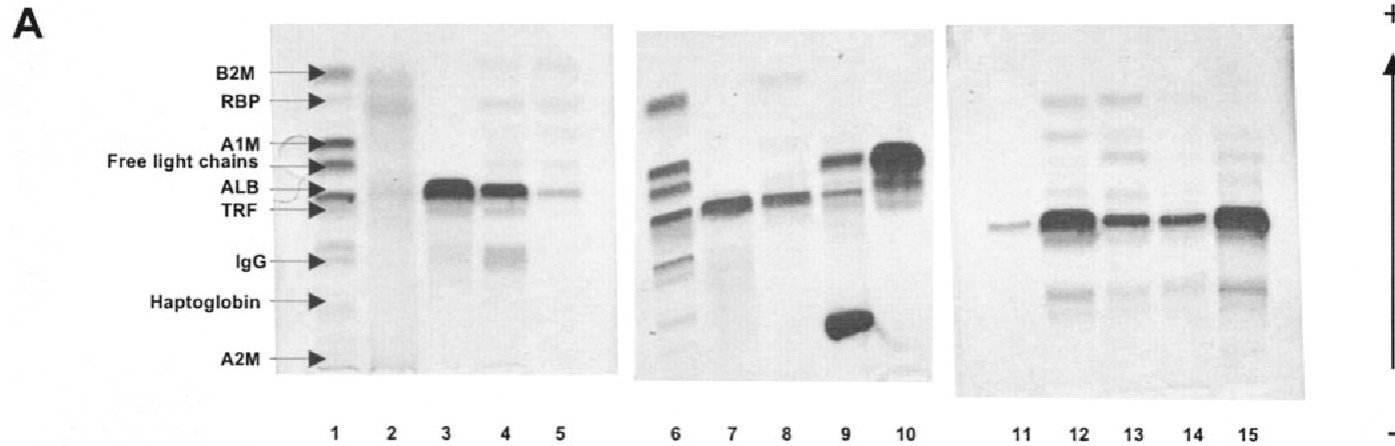
Proteinurie	příčina	charakteristika
funkční (při těžší práci/cvičení, ortostatická)	Hemodynamická/glomerulární	PU <1 g/24 h, přechodná
prerenální	Zvýšená plazmatická koncentrace nízkomolekulárních bílkovin, jejichž filtrace překročí resorpční kapacitu proximálního tubulu	Např. volné lehké řetězce u monoklonálních gamapatií, myoglobin u rhabdomyolýzy, hemoglobin u akutní hemolýzy
glomerulární	Poškození glomerulární filtrační bariéry	Selektivní (převaha albuminu) Neselektivní (albumin i imunoglobuliny)
tubulární	Porucha zpětné resorpce profiltrovaných nízkomolekulárních bílkovin v proximálním tubulu	Přítomnost nízkomolekulárních bílkovin (alfa1-mikroglobulin, beta2-mikroglobulin)
postrenální	Sekrece bílkovin do moči ve vývodných močových cestách (krvácení, zánět)	Přítomnost alfa2-makroglobulinu a IgM

## Hlavní bílkoviny používané v diagnostice proteinurií (PU)

bílkovina	M.h. (kD)	Diagnostický význam; příčina	Rozhodovací meze	
			mg/l	mg/g Kr, (mg/mmol Kr)
$\alpha_1$ -mikroglobulin	33	Tubulární PU; nedostatečná tubulární zpětná resorpce	< 12	< 14 (<1,58)
albumin	67	Glomerulární PU; zvýšená filtrace	< 20	< 30 (<3,40)
transferrin	76	Jako albumin	< 1,2	< 1,9 (< 0,21)
IgG	150	Neselektivní glomerulární PU; kvocient IgG/albumin > 0,03	< 10	< 10 (<1,13)
$\alpha_2$ -makroglobulin	725	Postrenální PU; krvácení, exsudace; kvocient $\alpha_2$ /albumin > 0,02	< 7	< 7 (<0,79)
Celková bílkovina			< 100	< 70 (<7,91)

# Typy proteinurie

- A – SDS gely (Sebia) – rozdělení bílkovin podle mol.hmotnosti
  - B – Hodnocení za použití markerových (indikátorových) bílkovin
- Maachi M et al. *Clin Chem* 2004;50:1834-7





## Bílkoviny mozkomíšního moku (likvoru, CSF)

Bílkovina	m.h. (kDa)	Hydrodynamický poloměr (nm)	Orientační referenční rozmezí (dospělí)	Význam stanovení
Celková bílkovina	n/a	n/a	0,15 – 0,45 g/L	Orientační zhodnocení funkce hemato-likvorové bariéry
Albumin	67	3,5	100 – 300 mg/L	Poměr koncentrací v likvoru a séru vypovídá o funkci hemato-likvorové bariéry (ani za patologických okolností není albumin syntezován v CNS – veškerý albumin v likvoru je plazmatického původu)
IgG	150	5,3	10 – 40 mg/L	Odhad (výpočtem) či průkaz (elektroforeticky) intrathekální syntézy u zánětlivých onemocnění CNS
IgM	970	13	≤1,1 mg/L	
IgA	160	5,7	≤5,0 mg/L	
<b>BTP</b> (beta-trace protein)	31	2,4	10 – 20 mg/L	Koncentrace >1,3 mg/L v biologické tekutině (sekretu z nosu, ucha, z drénu po operaci aj.) nebo poměr koncentrací sekret/sérum >2,0 svědčí pro přítomnost likvoru v tekutině, tj. pro únik likvoru (likvorheu)
<b>Prealbumin</b>	61	3,3	12 – 27 mg/L	Běžně se nestanovuje
Transferin	80	3,7	7 – 22 mg/L	Celkový TRF se běžně nestanovuje; detekce asialofrakce TRF v biologické tekutině svědčí pro přítomnost likvoru (likvorheu)

# Bílkoviny mozkomíšního moku

- **Plazmatického původu** (difúze přes hemato-likvorovou bariéru – cca 80%): stanovíme koncentraci v likvoru a séru a vypočteme **KVOCIENT**  $Q_{Prot}$  :
- $Q_{Prot} = \frac{[Prot]_{CSF}}{[Prot]_{serum}}$
- Podíl kvocientu zkoumaného proteinu a kvocientu albuminu označujeme jako **INDEX** zkoumaného proteinu, např.
- $IgG\ index = \frac{Q_{IgG}}{Q_{Alb}}$
- Zvýšené hodnoty indexu mohou nasvědčovat intrathekální syntéze
- V praxi nejčastěji posuzujeme intrathekální syntézu imunoglobulinů u zánětlivých onemocnění CNS
- **Syntezované v CNS** (intrathekálně - cca 20%): zpravidla stanovujeme koncentraci pouze v likvoru; původ může být:
  - *gliální* (S100B, GFAP)
  - *neuronální/axonální* (NSE, bílkoviny neurofilament, Tau protein)
  - *leptomeningeální* (BTP, cystatin C)
- Některé se využívají v diagnostice vybraných neurologických onemocnění (celkový a /hyper/fosforylovaný tau protein,  $A\beta_{42}$  u Alzheimerovy nemoci, bílkoviny neurofilament u amyotrofické laterální sklerózy aj.)

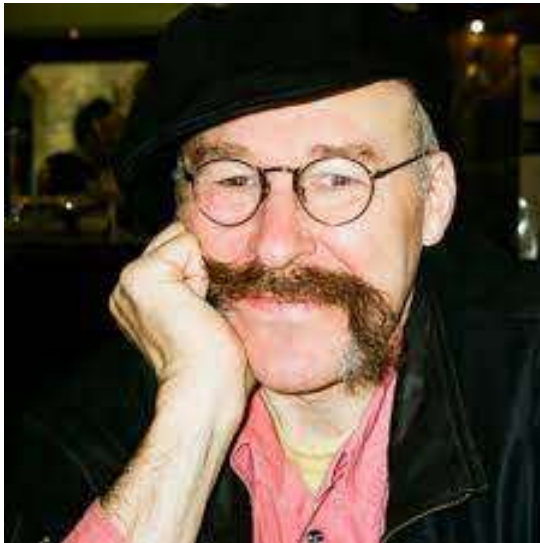
### Koncentrace bílkovin v likvoru závisí i na místě odběru:

- koncentrace CB a plazmatických bílkovin je vyšší v lumbálním likvoru oproti komorovému likvoru
- koncentrace bílkovin syntezovaných v buňkách mozku je vyšší v komorovém než v lumbálním likvoru
  - referenční meze publikované v literatuře platí pro lumbální likvor
  - horní hranice referenčního rozmezí  $Q_{Alb}$  je v komorovém likvoru odhadnuta na 40%, v likvoru z cerebelomedulární cisterny na 65% hodnoty pro lumbální likvor

<i>Původ bílkoviny</i>	<i>Příklady</i>	<i>V:L gradient</i>	<i>S ↑ Q-alb koncentrace</i>
Neurony, glie	Tau-protein, NSE, S-100B	> 1	se nemění
Lepto-meningy	Beta-trace protein, cystatin C	1:11 1:3,5	lineárně stoupá
Částečně z plazmy	Transthyretin, ACE, s-ICAM	1,1:1 (TT)	
Plazmatické	Alb, IgG, IgM, IgA, ...	1:2,5 (Alb)	nelineárně stoupá

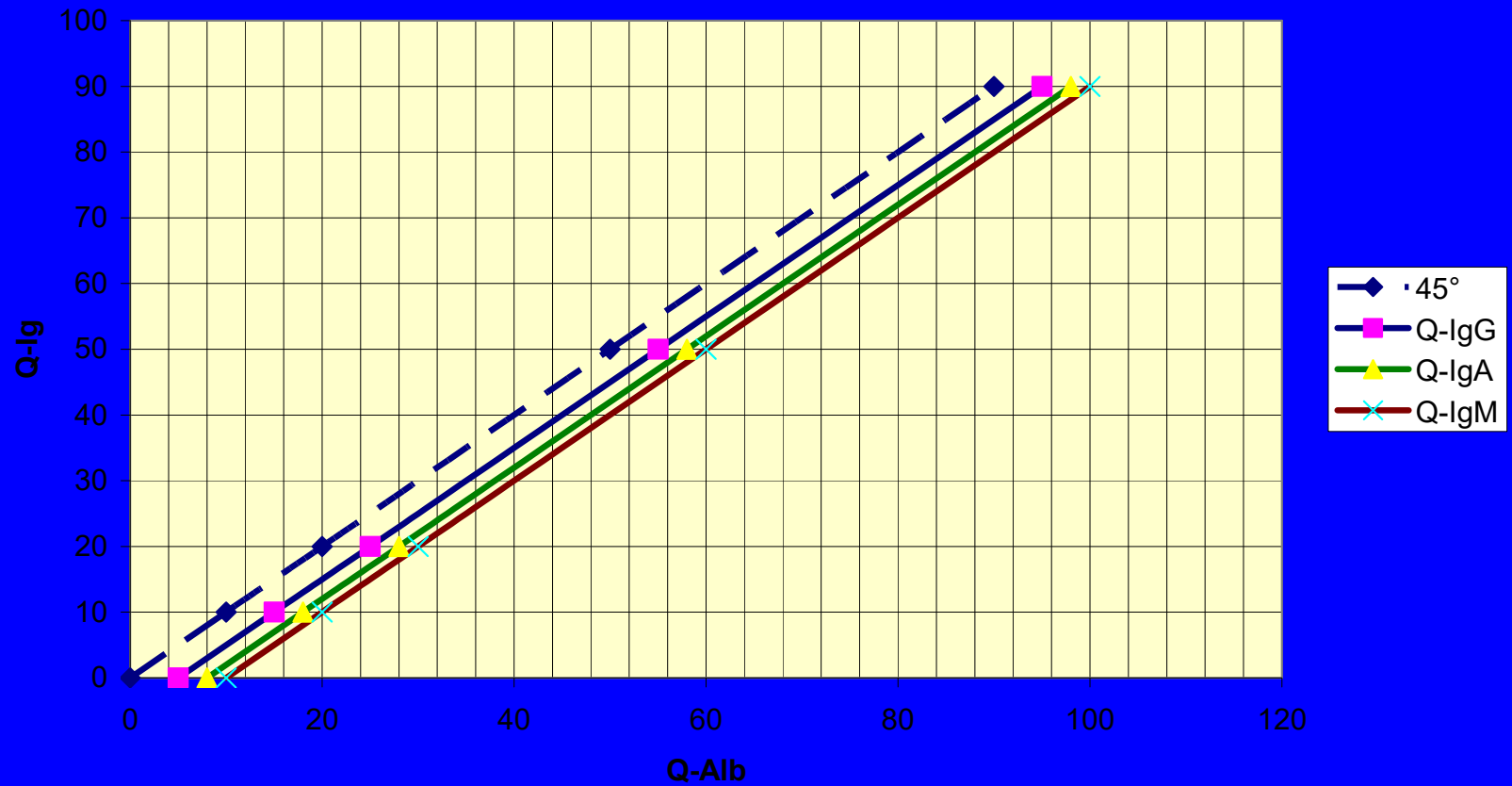
# Koncepce hemato-likvorové bariéry a výpočty intrathekální syntézy imunoglobulinů

prof. Hansotto Reiber (nar. 1940) [www.horeiber.de](http://www.horeiber.de)

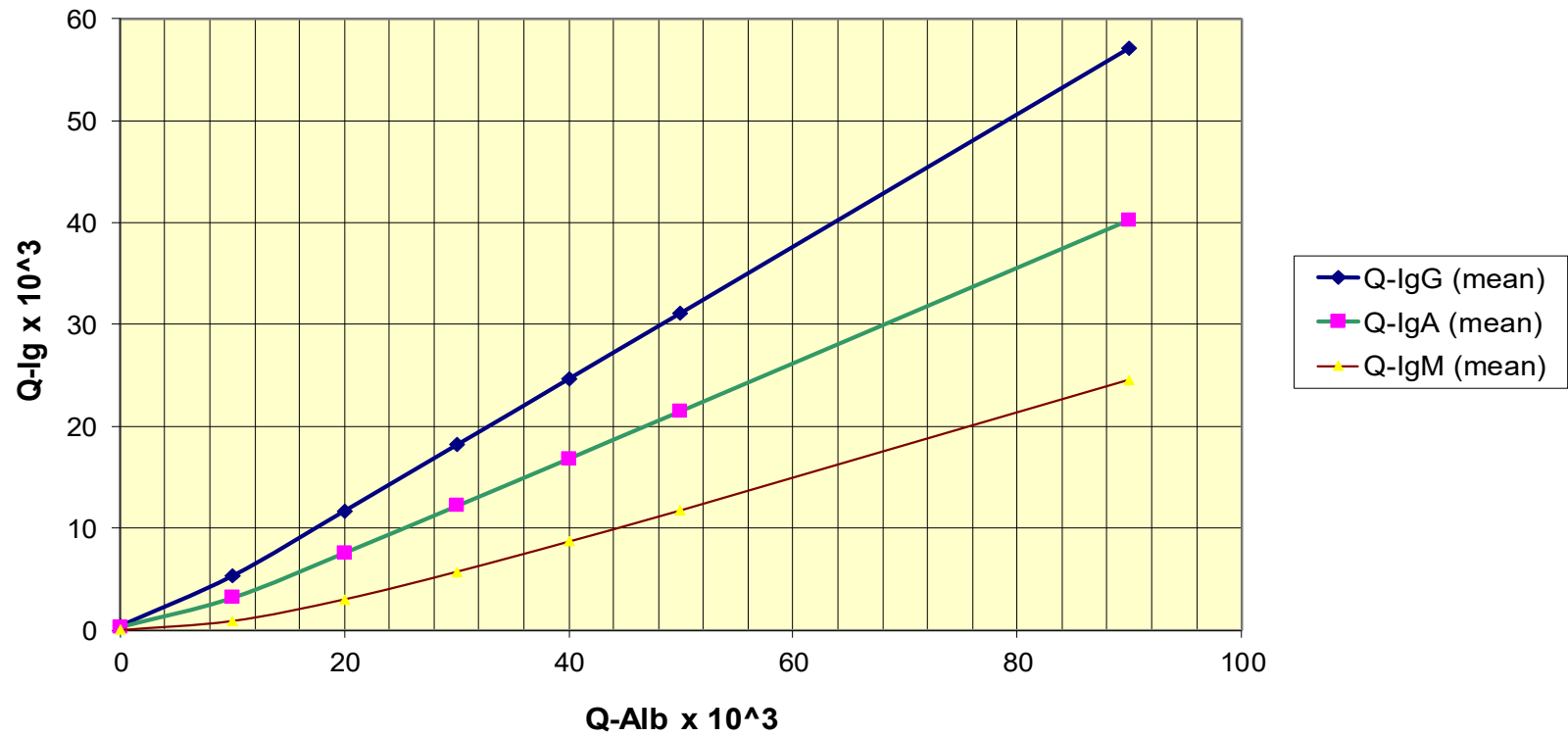


- H. Reiber, K. Felgenhauer: Protein transfer at the blood-CSF barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta* 1987, 163:319-328 – historický průlom
- Patologická změna „průtoku likvoru“ (CSF flow rate) postačuje ke kvantitativnímu vysvětlení dynamiky plazmatických proteinů v likvoru (žádné zvýšení propustnosti kapilár – „no leakage“)

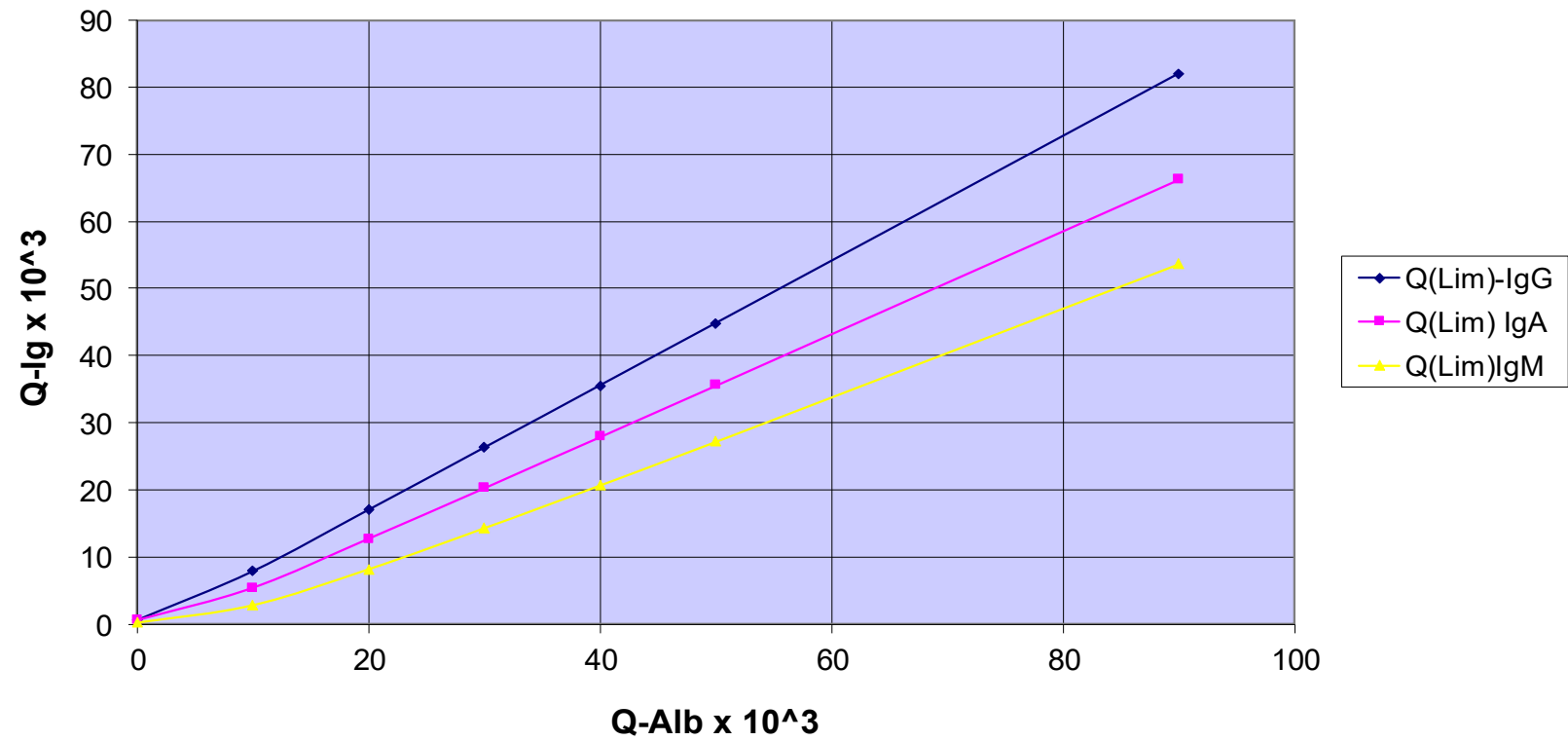
### Q-Ig jako funkce Q-Alb - "leakage" model



Hyperbolická závislost Q-Ig na Q-Alb



Závislost Q(Lim)-Ig na Q-Alb



# Hemato-encefalická a hemato-likvorová bariéra

(Reiber H, Peter JB, *J Neurol Sci* 2001; 184: 101-22)

## Hemato-encefalická bariéra (Blood-brain barrier)

- refers to the morphological basis for restriction of protein diffusion from blood into the brain tissue, in particular by the brain capillary walls

## Hemato-likvorová bariéra (Blood-CSF barrier) (pro bílkoviny)

- a functional term that includes all processes that influence the final protein concentration in lumbar CSF, including blood-brain barrier, protein diffusion into the CSF along its flow path and, in particular, the CSF flow rate
- Evaluated by **albumin quotient**,  $Q_{Alb} = \frac{\text{Albumin}_{\text{CSF}}}{\text{Albumin}_{\text{Serum}}}$
- Referenční rozmezí  $Q_{Alb}$  závisí na věku:
- $Q_{Alb} \cdot 10^3 \leq 5 + \frac{\text{age (in years)}}{15}$

(Reiber H, Peter JB, *J Neurol Sci* 2001; 184: 101-22)

- $Q_{Alb} \cdot 10^3 \leq 8 + \frac{\text{age (in years)}}{25}$

(Hegen H. et al. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54: 285-92)



# Detekce intrathekální syntézy imunoglobulinů: „quantity versus quality“

- **Výpočet intrathekální (i.th.) syntézy:**
  - vychází ze změřených koncentrací *albuminu* (produkovan pouze játry  $\Rightarrow$  veškerý albumin v likvoru je krevního původu) a *Ig* v likvoru a séru
  - srovnání s referenční populací – statistický princip
- **Oligoklonální Ig:**
  - též vychází ze změřených koncentrací Ig v likvoru a séru (na gel jsou aplikována stejná množství Ig ve vzorcích likvoru a párového séra)
  - srovnání obrazu v likvoru a párovém séru téhož pacienta  $\Rightarrow$  zákonitě lepší výsledky!
  - bezvýhradně akceptováno pouze pro IgG

- *Co potřebujeme vědět pro výpočet intrathekální syntézy Ig:*

- Koncentrace albuminu v likvoru a séru
- Koncentrace IgG (IgM, IgA, volných lehkých řetězců) v likvoru a séru
- Albuminový kvocient:

$$Q_{Alb} = [Alb]_{CSF} / [Alb]_{Serum}$$

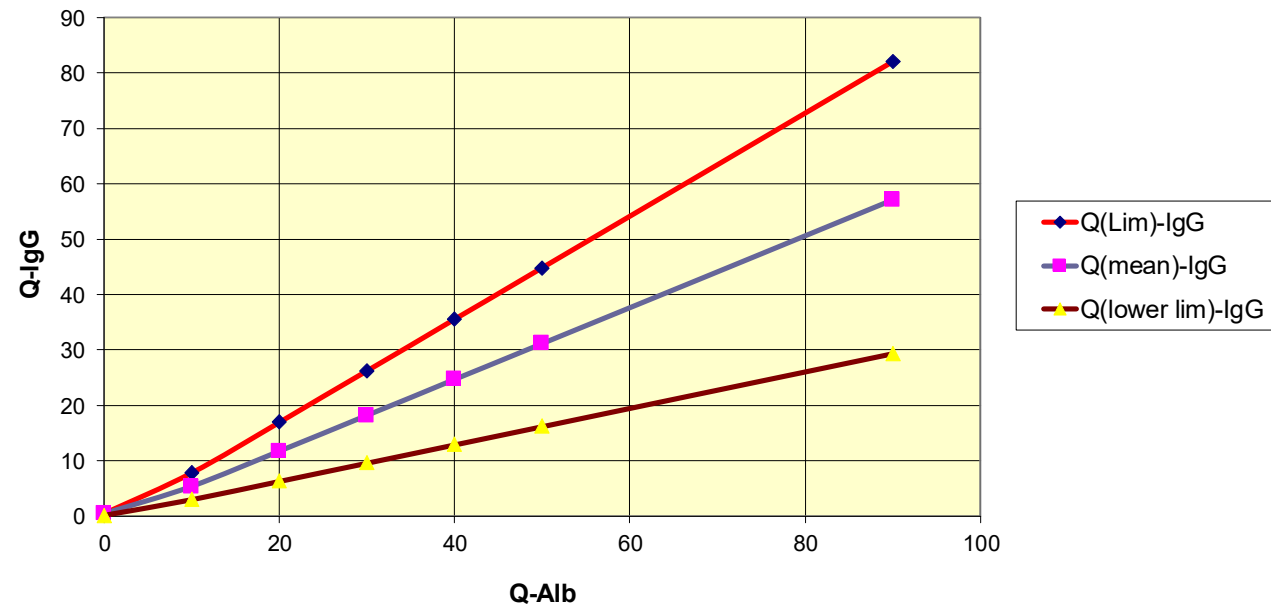
- Ig kvocient (např. IgG – podobně pro IgM, IgA, ...)

$$Q_{IgG} = [IgG]_{CSF} / [IgG]_{Serum}$$

*V nepřítomnosti intrathekální syntézy platí následující nerovnost:  $Q_{Alb} > Q_{IgG} > Q_{IgA} > Q_{IgM}$  obrácení některé z těchto nerovností svědčí pro ith. syntézu – i v případě krevní příměsi*

# Výpočet intrathekální syntézy Ig – Reiberova hyperbolická funkce

Závislost Q-IgG na Q-Alb - parametry Reiberovy hyperbolické funkce  
pro Q-mean, Q-lim (+3SD) a Q-lower lim (-3SD)

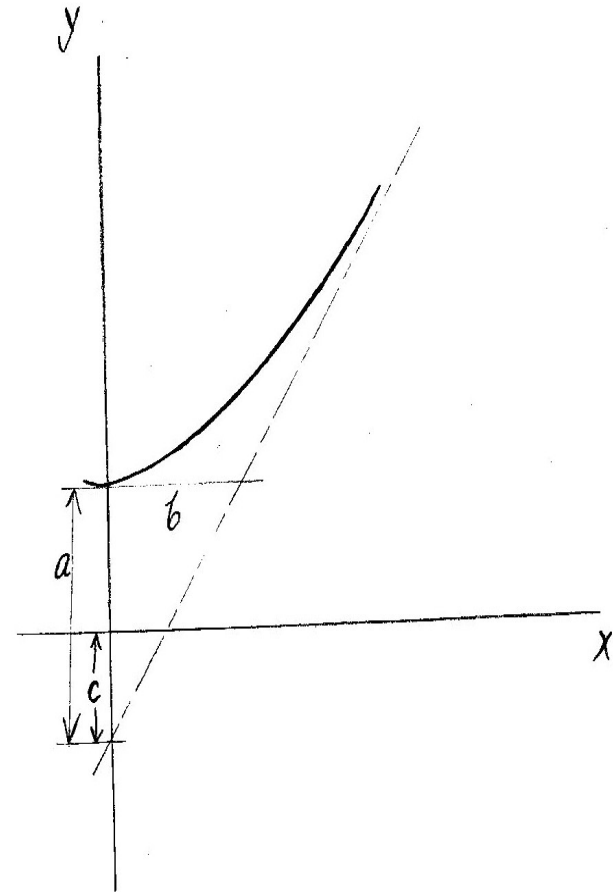


$$Q_{Ig} = \frac{a}{b} \sqrt{(Q_{Alb})^2 + b^2} - c$$

$$Q_{LimIgG} = 0.93 \sqrt{(Q_{Alb})^2 + 6 * 10^{-6}} - 1.7 * 10^{-3}$$

# Význam jednotlivých symbolů

- Na obr. je 1 ze 4 větví kompletní hyperbolické funkce:  
 $y = a/b * (x^2 + b^2)^{0,5} - c$
- $a/b$ : směrnice asymptoty
- $c$ : transformace y-ové souřadnice (průsečík asymptoty s osou y není identický s průsečíkem os x a y)



# Alternativní vztahy

$$Ig\ index = \frac{Q_{Ig}}{Q_{Alb}}$$

**Extendovaný Ig index** (Öhman *et al.* 1989, 1993):

$$ext.\ Ig\ index = \frac{Q_{Ig}}{Q_{Alb}^a}$$

**IgG: a = 1,12** (E-IgG index ≤ 1,24)

**IgA: a = 1,15** (E-IgA index ≤ 1,0)

**IgM: a = 1,9** (E-IgM index ≤ 15)

Auer M *et al.* Quantitation of intrathecal immunoglobulin synthesis – a **new** empirical formula. *Eur J Neurol* 2016, 23: 713-721.

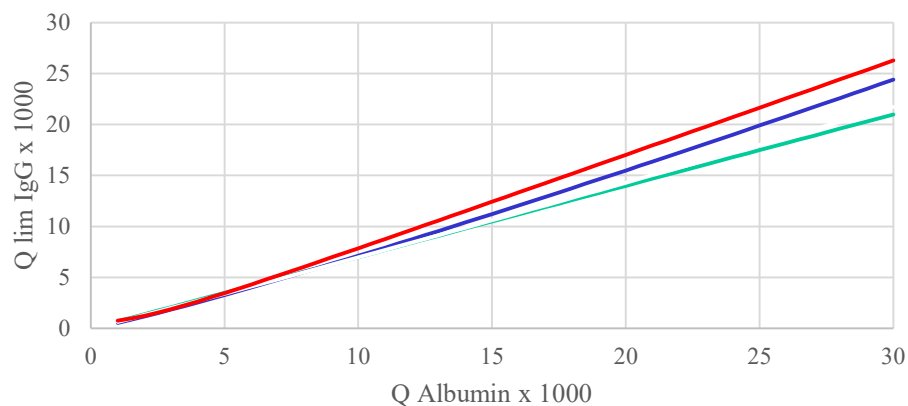
$$Q_{lim\ Ig} = a \cdot Q_{Alb}^b$$

	<i>a</i>	<i>b</i>
IgG*	0,882	1,035
IgA*	0,819	1,076
IgM*	1,845	1,340
fKLC**	0,9358	0,6687
fKLC***	3.1276	0.8001
fLLC***	2.1138	0.8650

(\*Auer *et al.* 2016; \*\* Presslauer *et al.* 2014; \*\*\* Hegen *et al.* 2018)

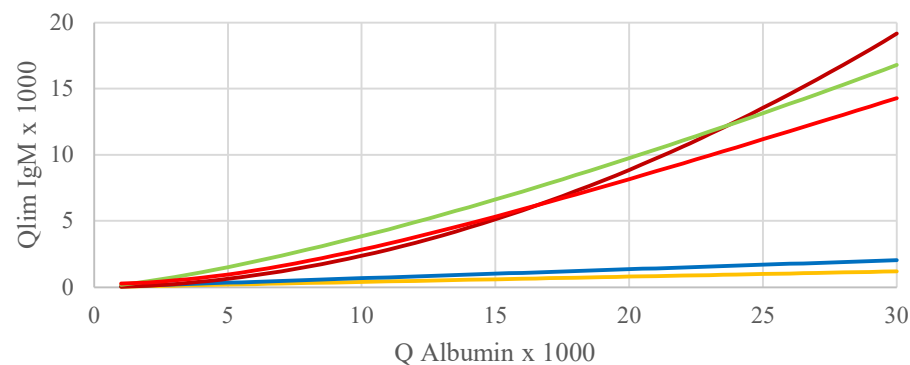
# $Q_{lim}$ IgG, IgM a IgA jako funkce Q Alb - aneb jak odhadujeme intrathekální syntézu pomocí různých výpočtových vztahů

## Q lim IgG jako funkce Q Alb



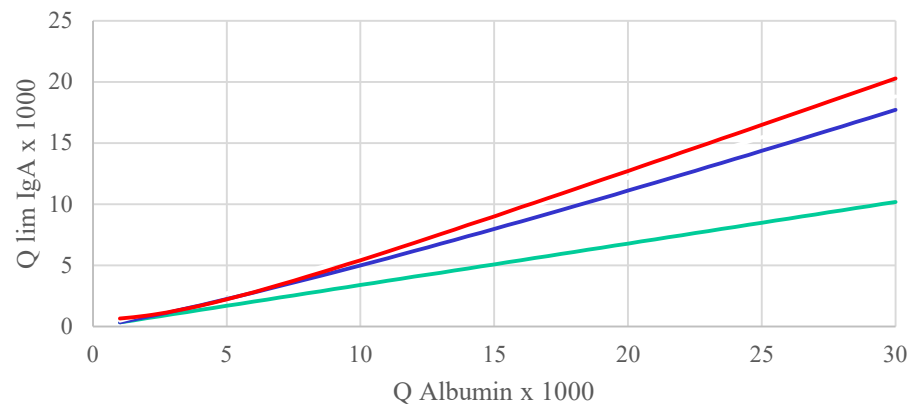
— IgG index 0.7 — Qlim IgG(Ö) — Qlim IgG(H) — Qlim IgG(R.)

## Q lim IgM jako funkce Q Alb



— IgM index 0.04 — IgM index 0.068 — Qlim IgM(Ö)  
— Qlim IgM(H) — Qlim IgM(R.)

## Q lim IgA jako funkce Q Alb



— IgA index 0.34 — Qlim IgA(Ö) — Qlim IgA(H) — Qlim IgA(R.)

## Vlastní výpočet intrathekální syntézy Ig

- $Ig_{loc} = (Q_{Ig} - Q_{lim\ Ig}) \cdot Ig_{serum}$  [mg/l]
- $Ig_{IF} = 1 - \left( \frac{Q_{lim\ Ig}}{Q_{Ig}} \right) \cdot 100$  (%)  
neboli:  $Ig_{IF} = \frac{Ig_{loc}}{Ig_{CSF}} \cdot 100$  (%)
- Podle intrathekální frakce  $IgX_{IF}$  posuzujeme dominanci intrathekální Ig syntézy v jednotlivých třídách (např. ith. IgM = 80%, ith. IgG = 25%:  $IgM_{IF} > IgG_{IF}$ )
- Pro sledování průběhu onemocnění u konkrétního pacienta je naopak preferován  $Ig_{loc}$

# Typy intrathekální protilátkové odpovědi

(DGLN, Editor Dr. M. Wick: Ausgewählte Methoden der Liquordiagnostik und Klinischen Neurochemie; 4. vydání, Mnichov 2020: str. 24-25)

Typ reakce	Onemocnění
Žádná ith. syntéza IgG, IgA, IgM	<ul style="list-style-type: none"><li>- Časná fáze bakteriálních meningitid a virových meningoencefalitid</li><li>- Syndrom Guillain-Barré</li></ul>
Dominance IgG	<ul style="list-style-type: none"><li>- Roztroušená skleróza (IgM v 50%, IgA ve 20%)</li><li>- Neurosyfilis (IgG + IgM, někdy dominance IgM; velmi vzácně IgA)</li><li>- HIV encefalitida (jen IgG)</li><li>- Infekce pomalými viry</li><li>- Encefalitida asociovaná s protilátkami proti NMDA-receptoru</li></ul>
Dominance IgA	<ul style="list-style-type: none"><li>- Neurotuberkulóza (IgA izolovaně nebo spolu s méně výraznou ith. syntézou IgG)</li><li>- Mozkový absces</li><li>- Někdy u HSV a VZV meningoencefalitidy</li></ul>
Dominance IgM	<ul style="list-style-type: none"><li>- Lymeská neuroborrelióza (IgM &gt; IgA &gt; IgG)</li><li>- Meningoencefalitida při průušnicích (IgM + IgA + IgG)</li><li>- Klíšťová meningoencefalitida</li><li>- Někdy u lymfomů s postižením CNS (monoklonální IgM)</li><li>- Neurotrypanosomiáza (IgM + IgA + IgG, IgM v 95% případů)</li></ul>
IgG + IgA + IgM	<ul style="list-style-type: none"><li>- Oportunní infekce při imunodeficitech (CMV, toxoplazmóza, mykotické infekce)</li><li>- Neurocysticerkóza a jiné parazitózy</li></ul>

# Průkaz intrathekální syntézy Ig srovnáním elektroforetického profilu Ig v likvoru a séru (detekce oligoklonálních imunoglobulinů)

## • 1. SEPARACE

- Nativní elektroforéza
- **Izoelektrická fokusace** (doporučená separační metoda) – *elektroforetické dělení bílkovin v gradientu pH – bílkoviny se rozdělí podle svých izoelektrických bodů*

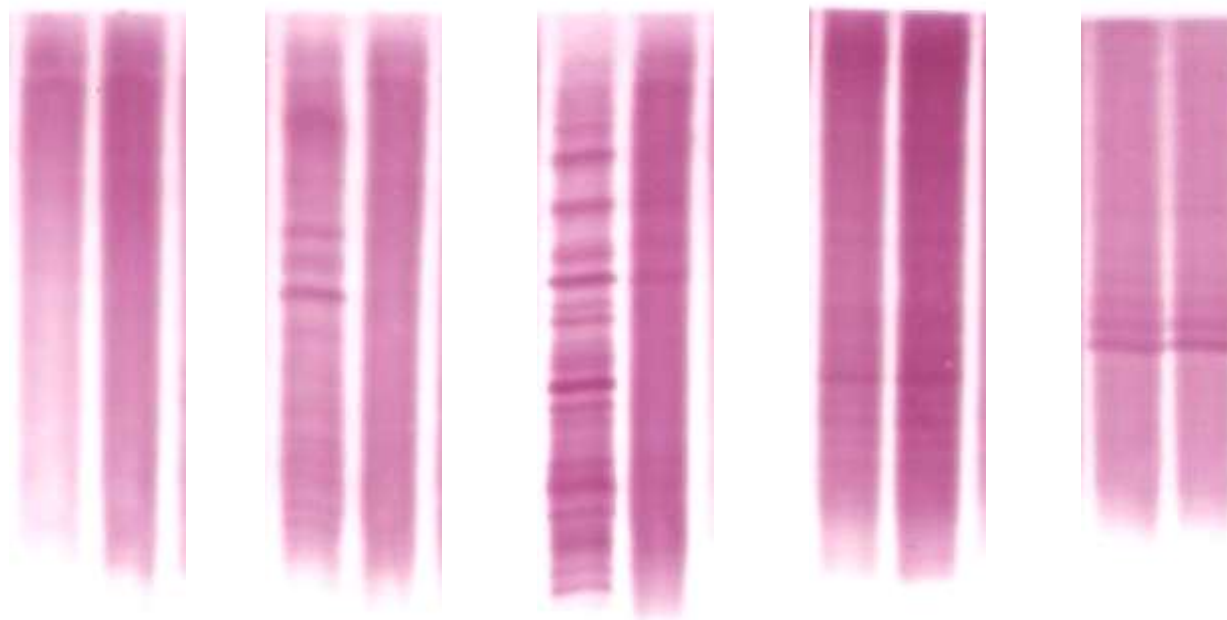
## • 2. DETEKCE

- Nespecifická detekce – barvení na bílkovinu (Coomassie blue /nutnost zahušťování CSF/, stříbření /nativní CSF/)
- Specifická detekce IgG pomocí anti-IgG protilátky (doporučeno)
  - a) fixace anti-IgG protilátkou v gelu, odmytí nezreagovaných proteinů a následně „nespecifické“ obarvení precipitátu
  - b) Fixace enzymaticky (HRP) značenou anti-IgG protilátkou v gelu, odmytí nezreagovaných proteinů a chromogenní detekce ( komerčně dostupný kit firmy *Sebia*)
  - c) („imuno“)blotting (komerčně dostupný kit firmy *Helena BioSciences*)
  - d) afinitní imunoblotting (AIB)

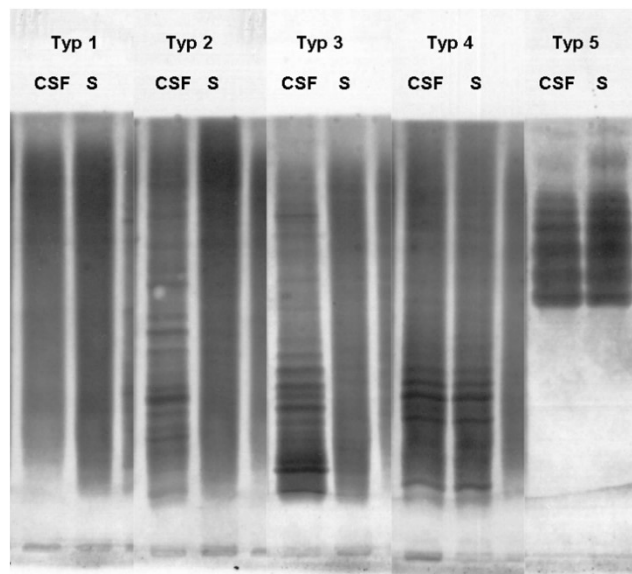


# Oligoklonální IgG - typy IEF nálezu: IEF/IF (Sebia)

typ 1 – typ 2 – typ 3 – typ 4 – typ 5  
*dvojice likvor (vlevo), sérum (vpravo)*



# Klasifikace nálezů – 5 typů



- **Typ 1:** jen „polyklonální“ IgG v likvoru i séru
- **Typ 2:**  $\geq 2$  IgG pásy v likvoru, jen „polyklonální“ IgG v séru
- **Typ 3:** IgG pásy shodné v likvoru i séru + IgG pásy přítomné pouze v likvoru
- **Typ 4:** IgG pásy shodné v likvoru i séru
- **Typ 5:** monoklonální IgG v likvoru i séru