

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

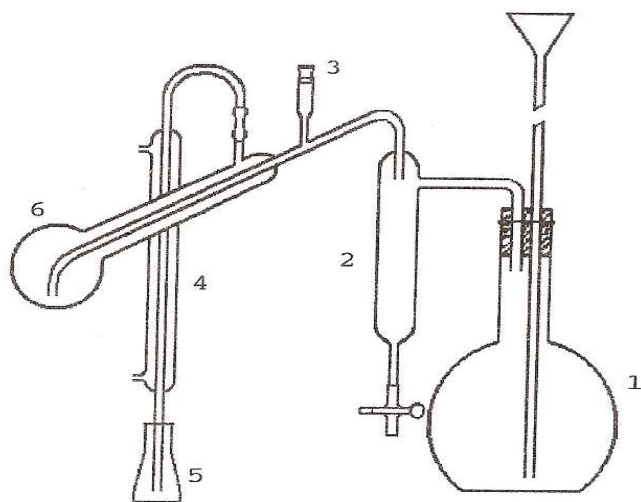
- Referenční meze: 60 – 85 g/l
 - Snížení: ztráty bílkovin, zejm. albuminu
 - Zvýšení: dehydratace, paraproteinémie
- **Stanovení:**
 - 1) Kjeldahlova metoda (dovedávna referenční)
 - 2) Biuretová metoda (dnes referenční)
- Stanovení nízkých koncentrací (moč, likvor):*
1. Vazba barviva (Coomassie Brilliant Blue, pyrogallová 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:
$$\text{organický N} + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{vedlejší produkty matrice}$$
- 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:
$$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{NaOH} \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{Na}_2\text{SO}_4 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{NaOH}$$
 - 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:
$$\text{NH}_3 + \text{H}_3\text{BO}_3 \rightarrow \text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3 + \text{H}_3\text{BO}_3$$
- 3) **Titrace**: při destilaci amoniaku do kyseliny borité následuje jediný titrační krok – titrace silnou kyselinou (zprav. H_2SO_4) za použití acidobazického indikátoru se změnou pH mezi 4 a 6 (smíšený indikátor bromkrezolové zeleně s methylčervení):
$$2\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 2\text{H}_3\text{BO}_3$$

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)

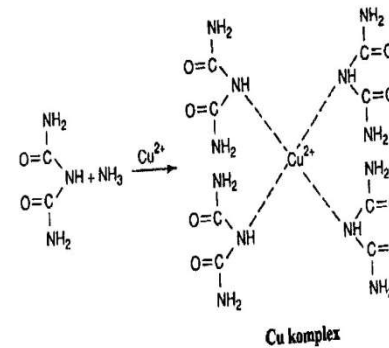
Faktory 0.14007 a 6.25 slouží k přepočtu titračního činidla na N (mg), resp. TP (g/L)

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

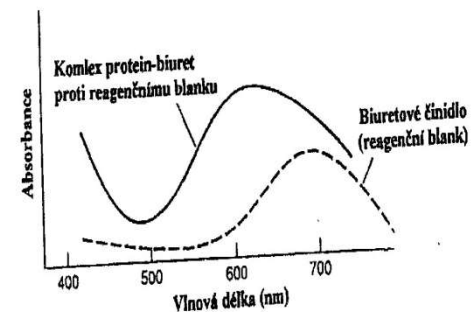
Biuretová reakce

(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 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 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:

CuSO_4 , vínan draselno-sodný (komplexuje Cu^{2+} , který by jinak v alkalickém prostředí vypadl jako $\text{Cu}(\text{OH})_2$), jodid draselný (antioxidant-zabraňuje autoredukci Cu^{2+}), NaOH

Zpravidla end-point stanovení, čas ≥ 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 amoniou 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.**

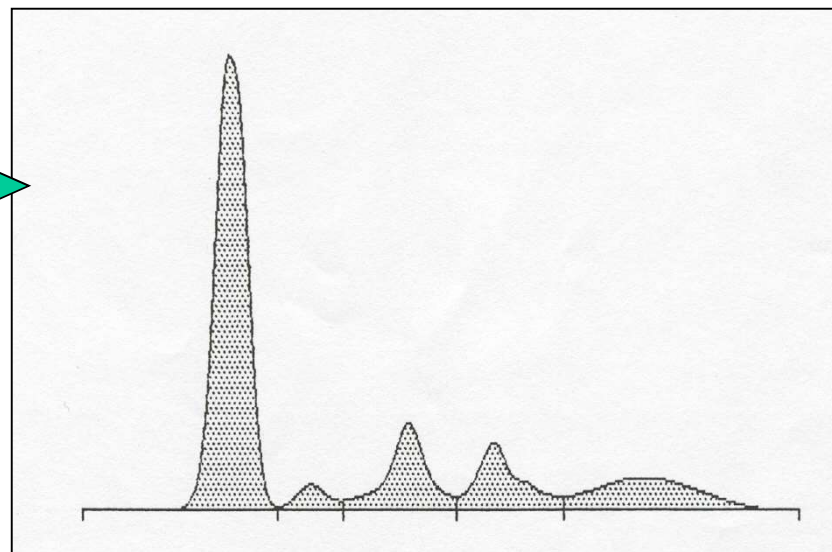
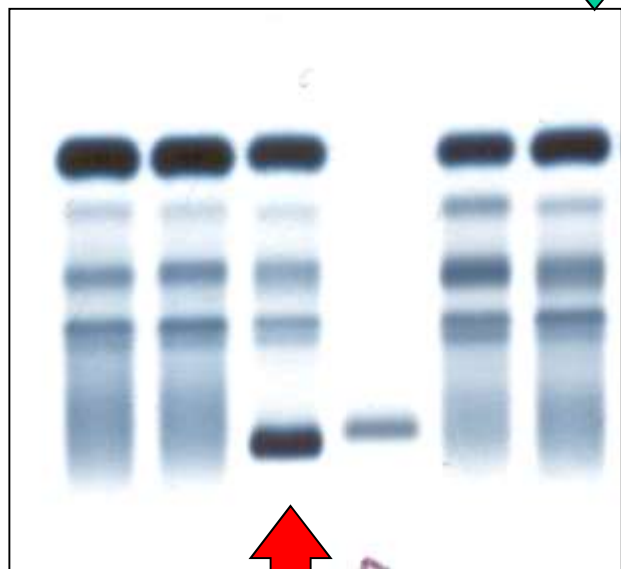
- ☞ Bílkoviny jsou rozděleny podle svých elektroforetických pohyblivostí do skupin (frakcí), které vytvářejí charakteristický obrazec.
- ☞ Změny v tomto obrazci souvisí s různými druhy onemocnění nebo s různými patologickými stavy.

Bílkoviny se dělí na 5 – 6 hlavních frakcí:

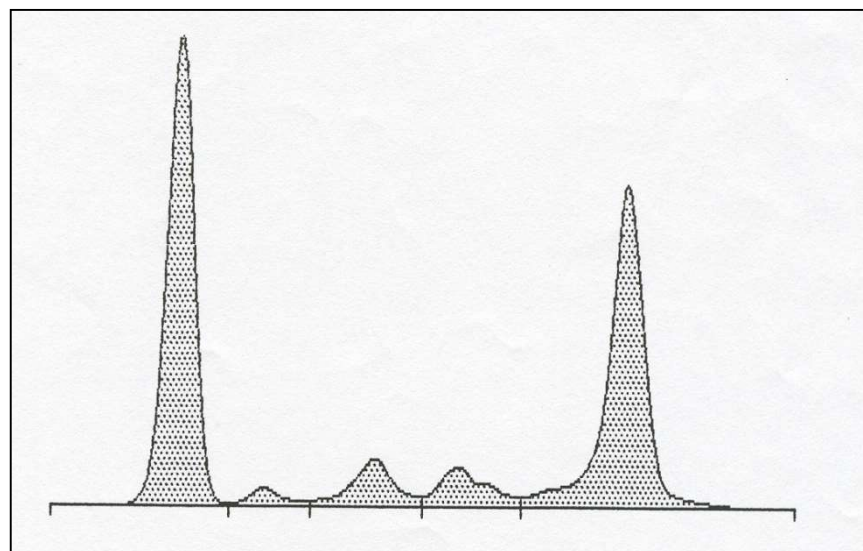
✦	Albumin	56 – 66 %
✦	α 1 globuliny	2 – 3 %
✦	α 2 globuliny	8 – 12 %
✦	β globuliny (β 1, β 2)	7 – 10 %
✦	γ globuliny	10 – 18 %

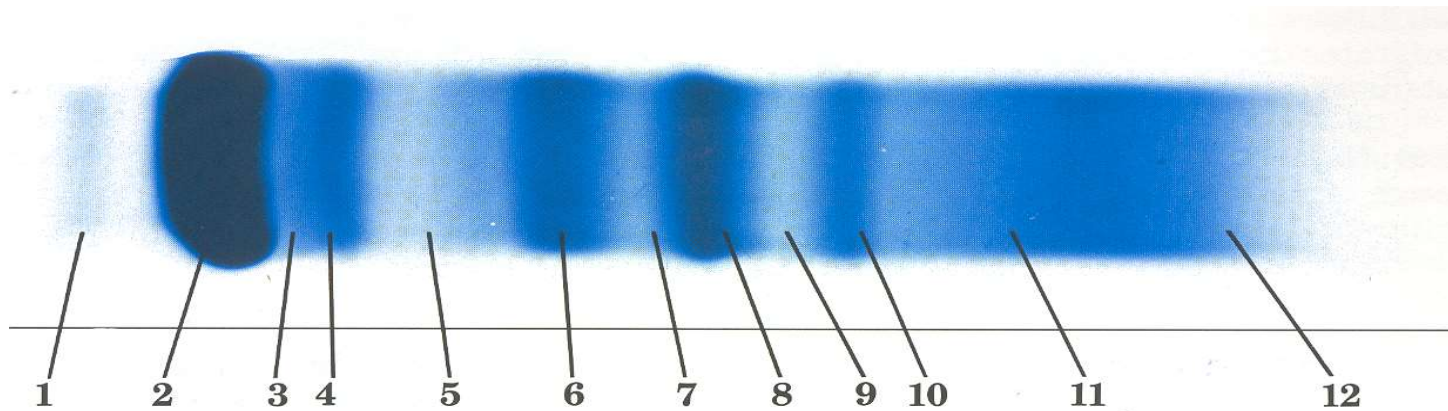
Denzitometrické vyhodnocení

Normální nález



„M“ gradient





1.	prealbumin
2.	albumin
3.	α -lipoprotein, α -fetoprotein
4.	A1AT, orosomukoid
5.	α_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

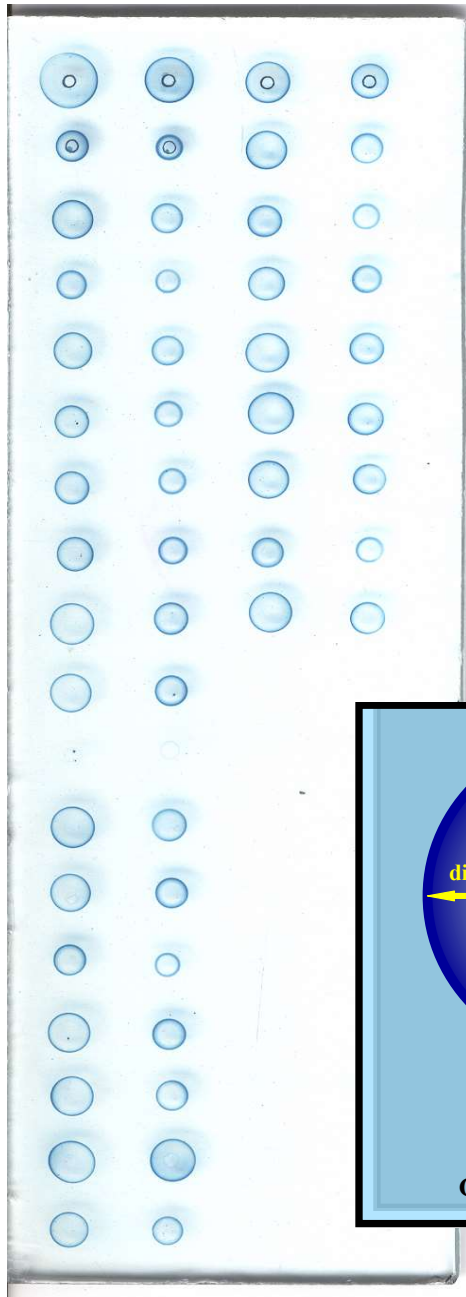
Stanovení jednotlivých plazmatických bílkovin

- 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)

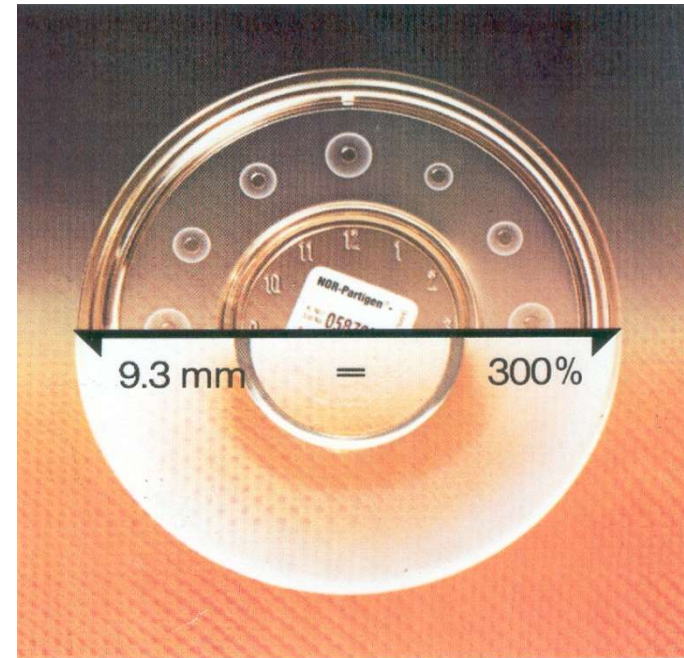
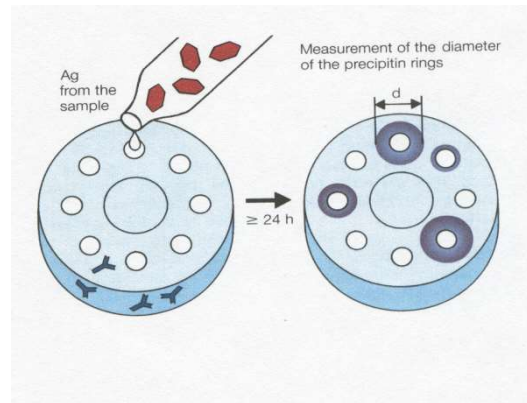
Kvantitativní stanovení: pro koncentrace nad 5 - 10 mg/L

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

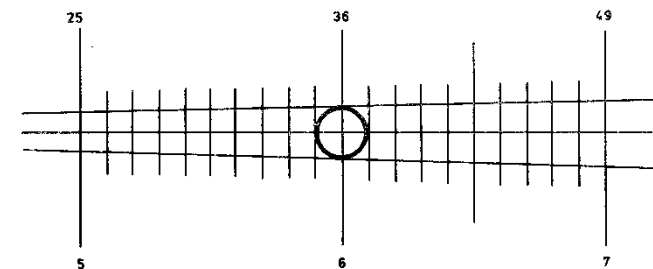
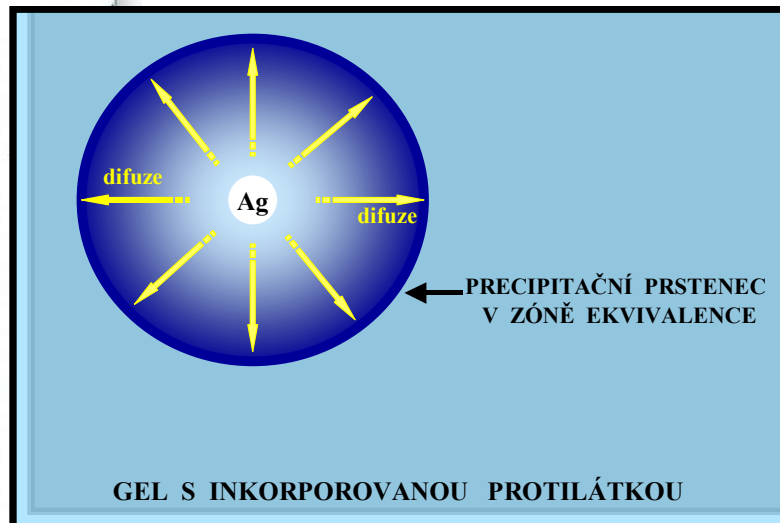
A) Imunochemická reakce v gelu



RID (Manciniová)



Kvantitativní měření

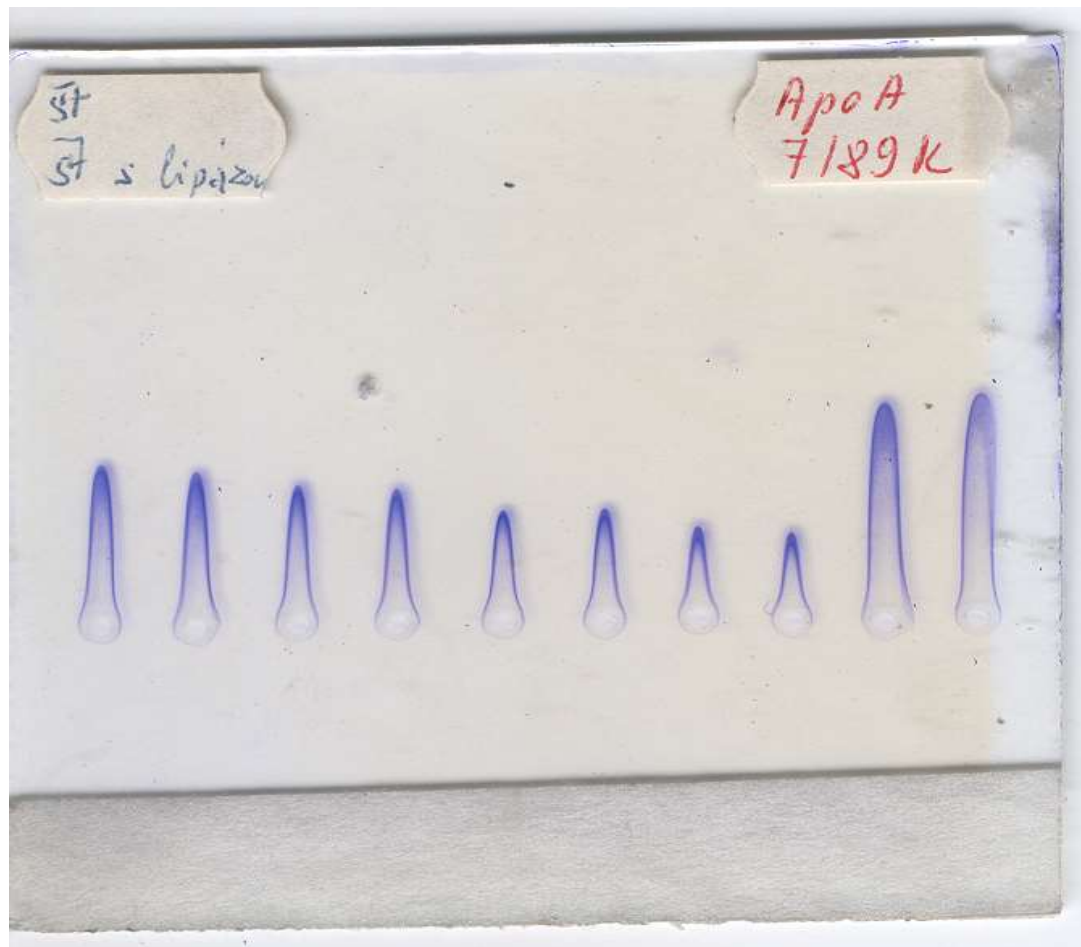


B)

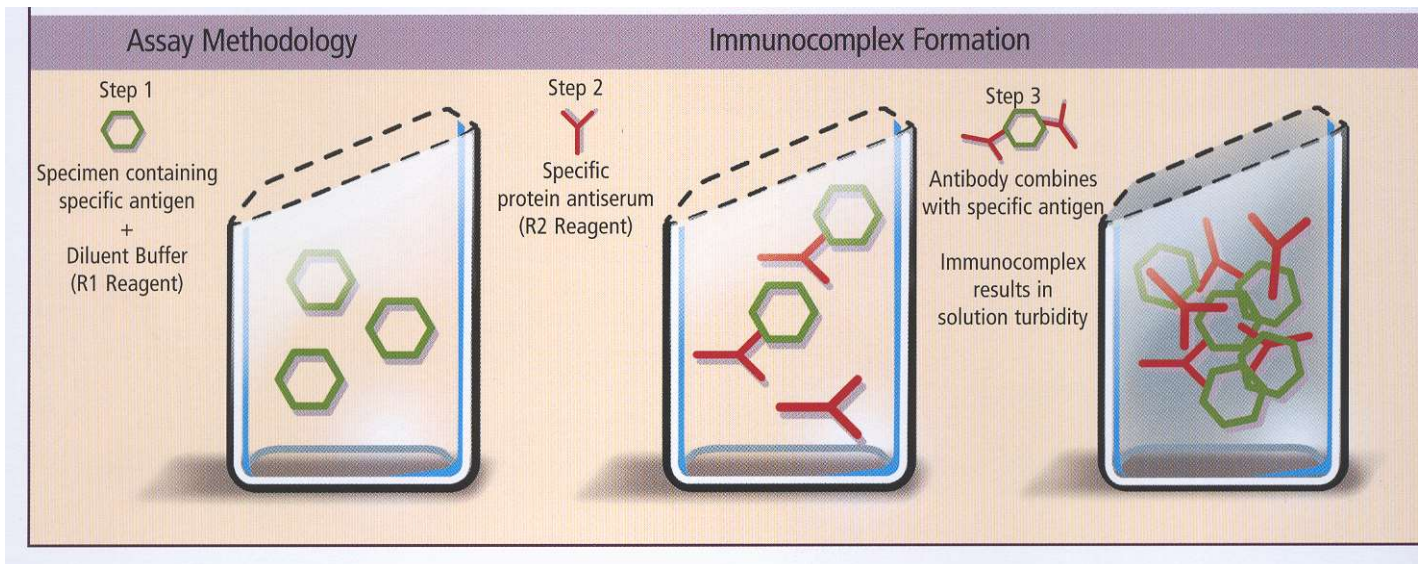
Imunochemická reakce v gelu

Kvantitativní měření

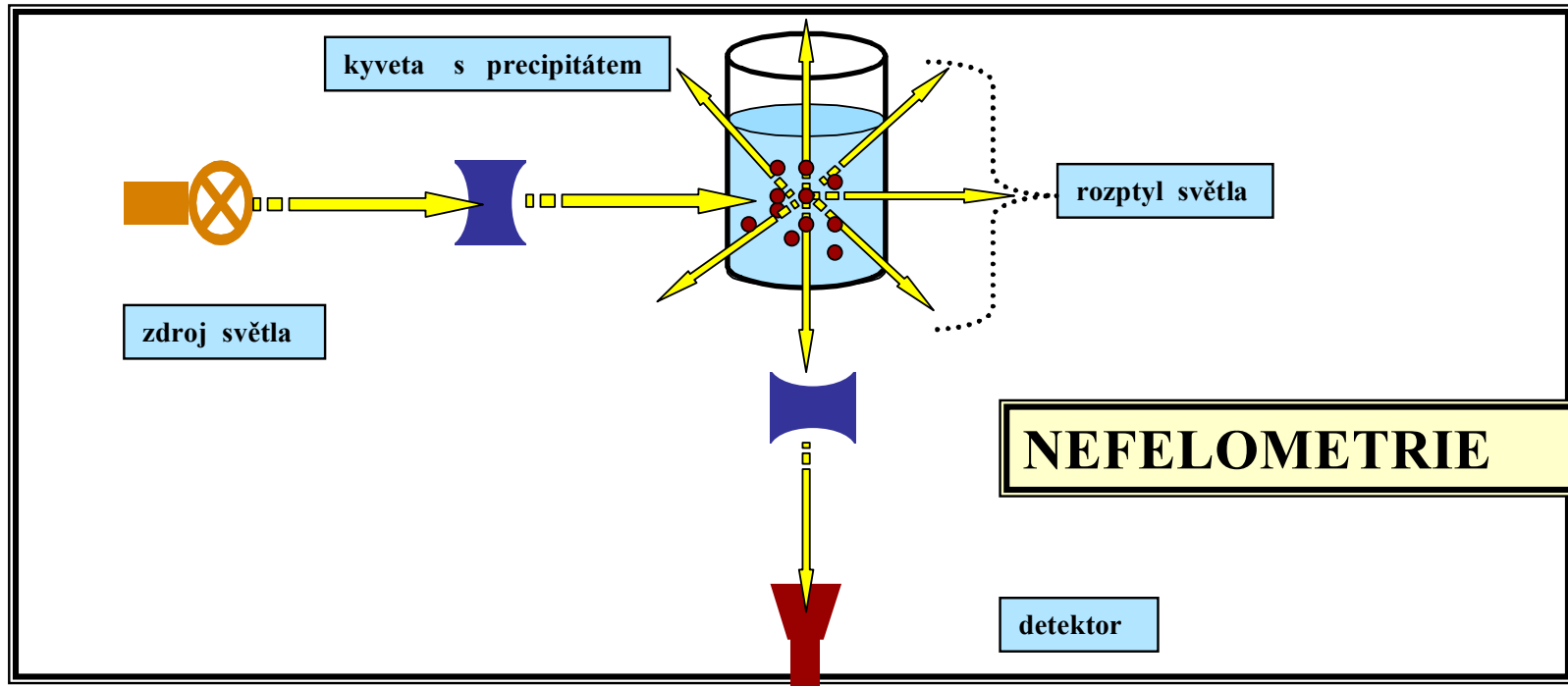
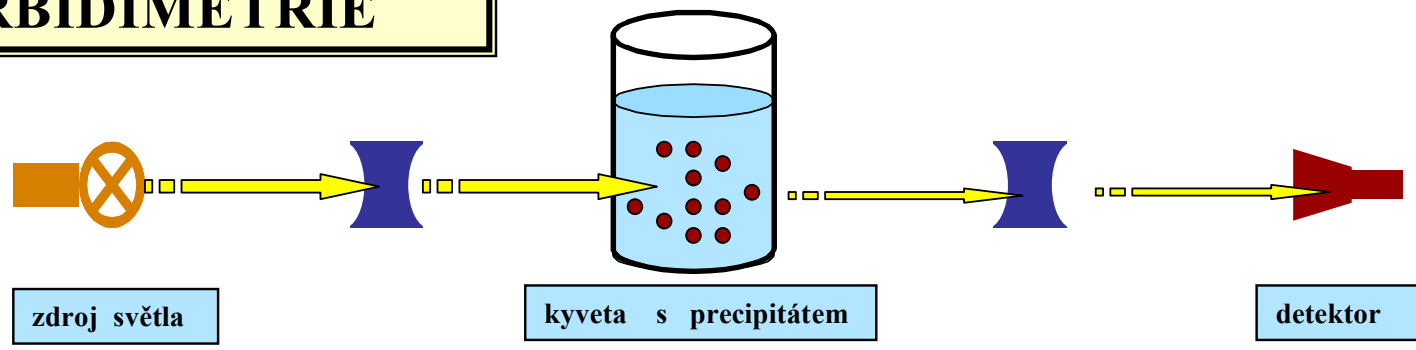
Elektroimunodifuze dle Laurella



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

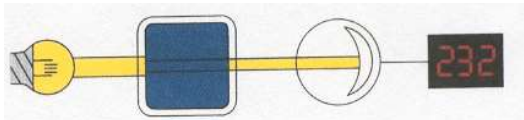


TURBIDIMETRIE

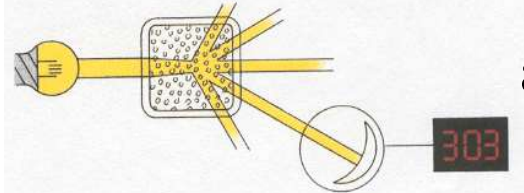
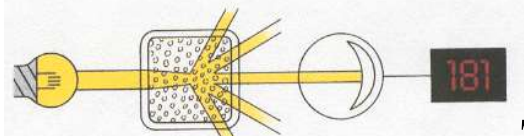


NEFELOMETRIE

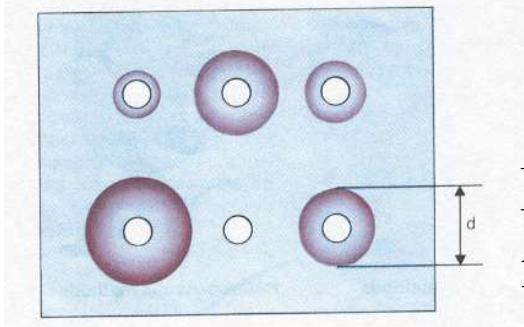
Měřicí techniky



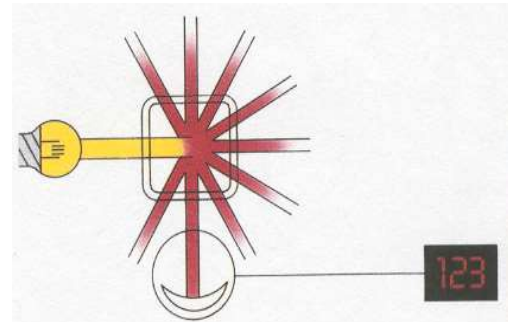
fotometrie



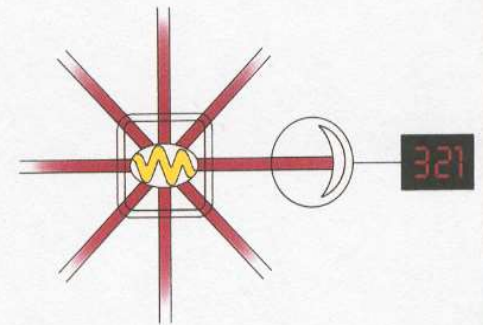
Turbidimetrie
a nefelometrie



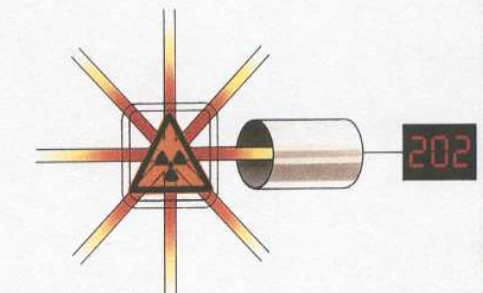
Radiální
imunodifuze



fluorescence



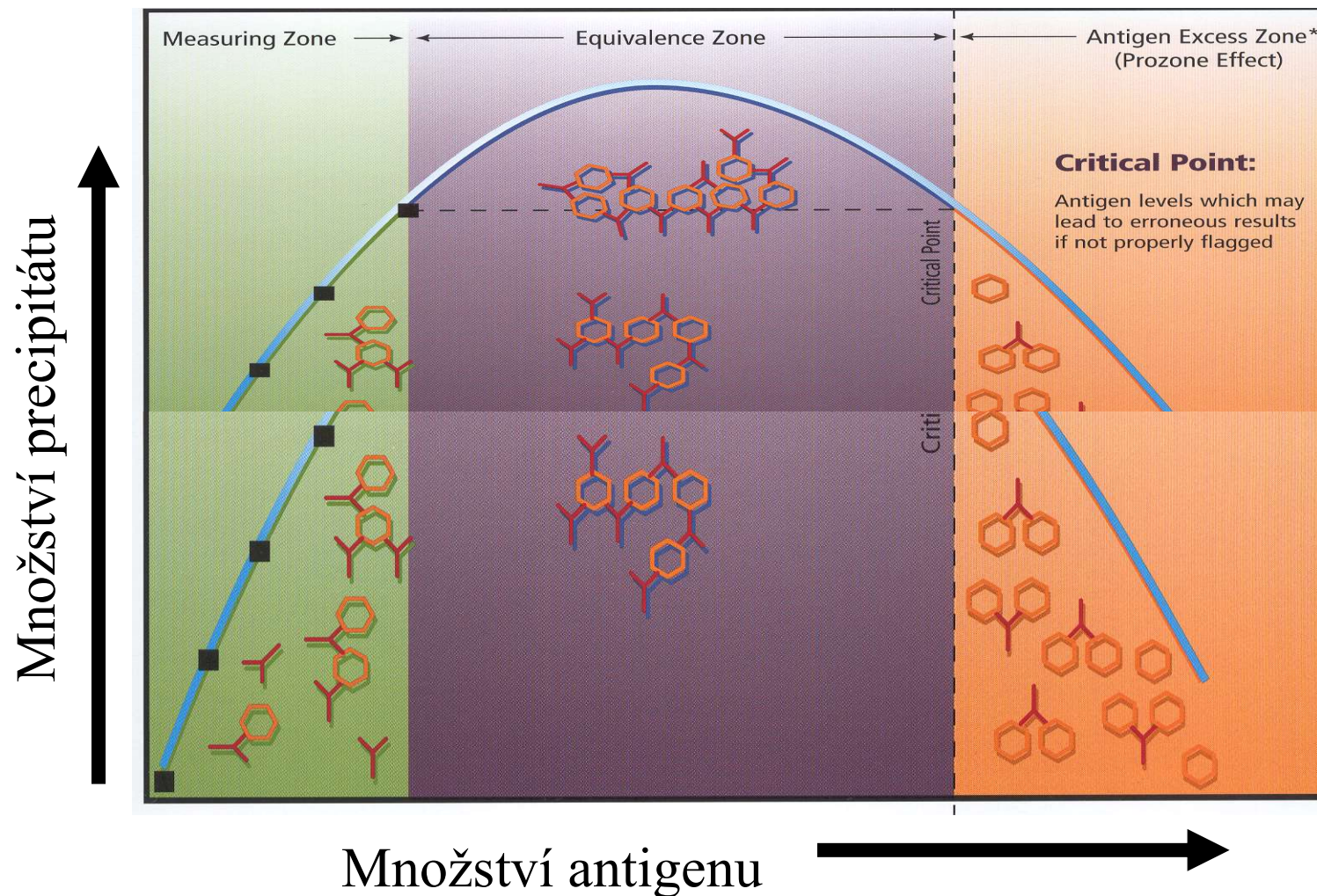
luminiscence



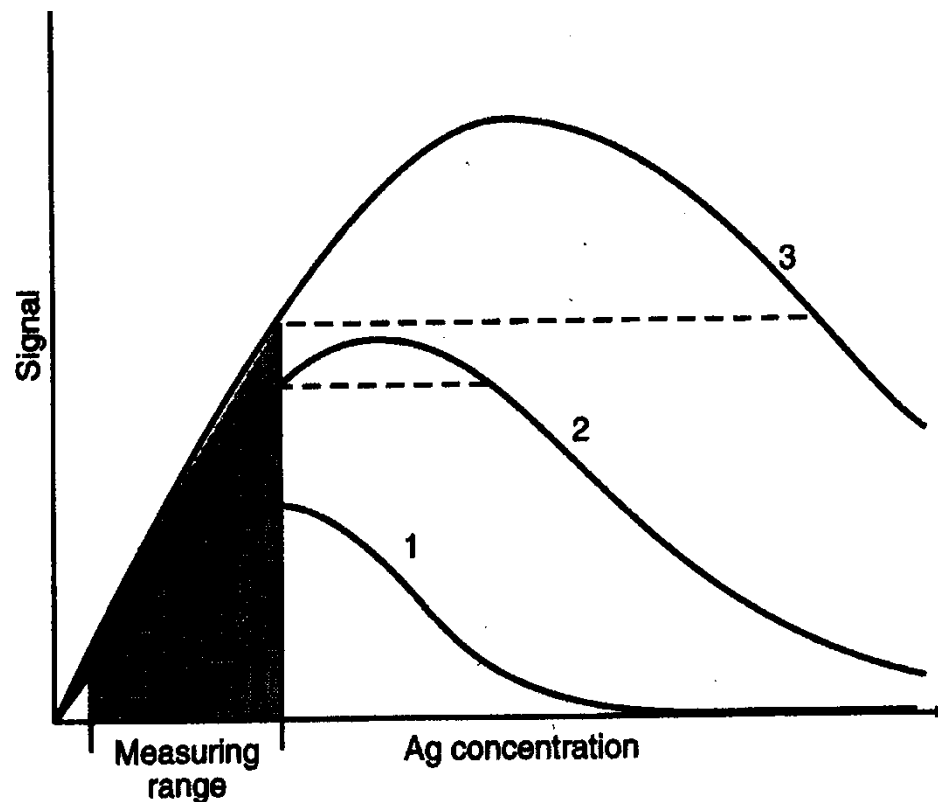
radioaktivita

Heidelbergerova-Kendallova křivka

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

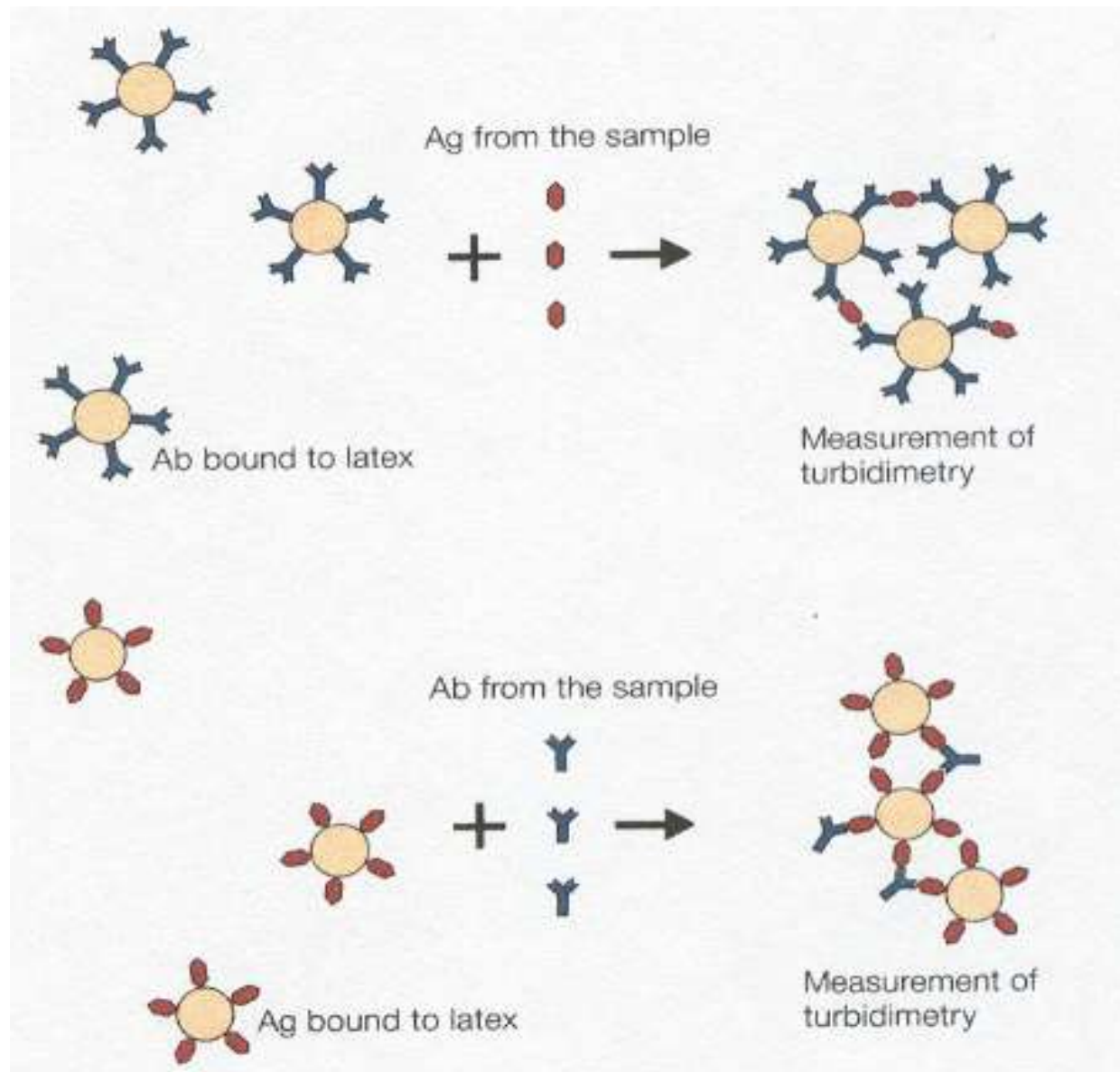


Vliv koncentrace protilátky na zónu „bezpečí“



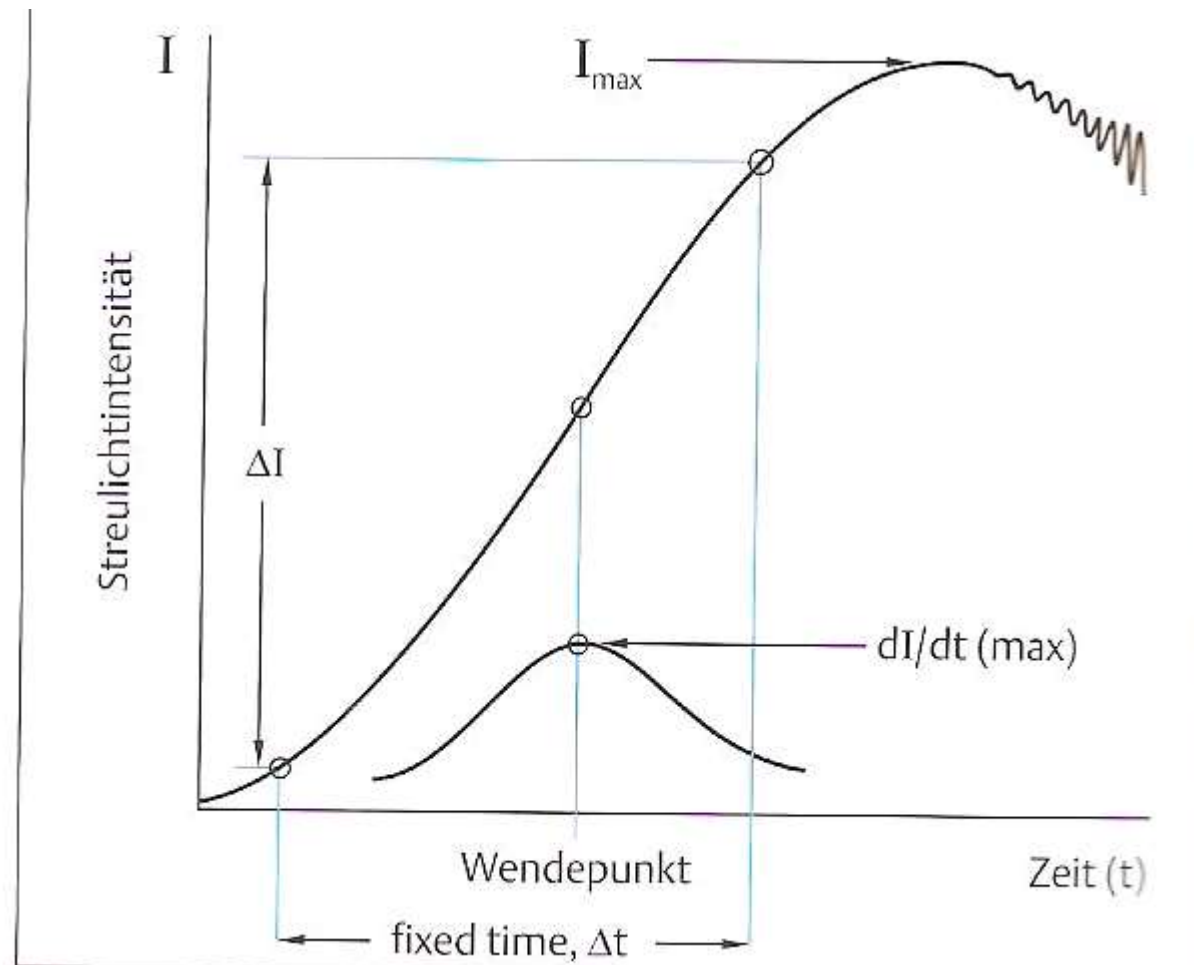
*Figure 19. Dose-response curves illustrating the effect of increasing antibody concentration on the security range (dotted line).
1: Low, 2: Medium, 3: High antibody concentration.*

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

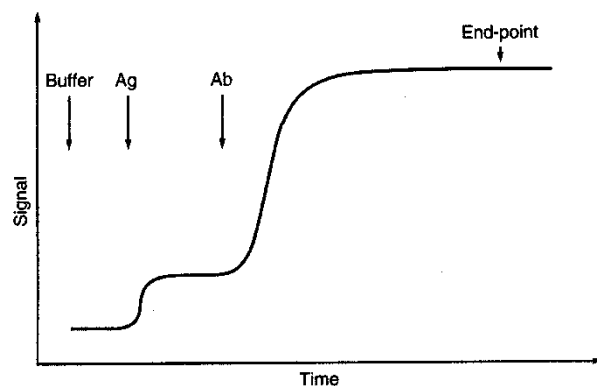


Figure 3. Signal development as a function of time. The addition of buffer, antigen (Ag), and antibody (Ab) to the reaction cuvette is indicated by arrows.

fixní čas

Rate nefelometrie

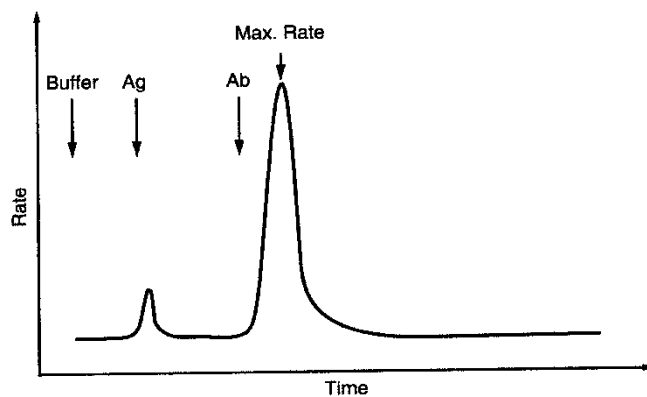
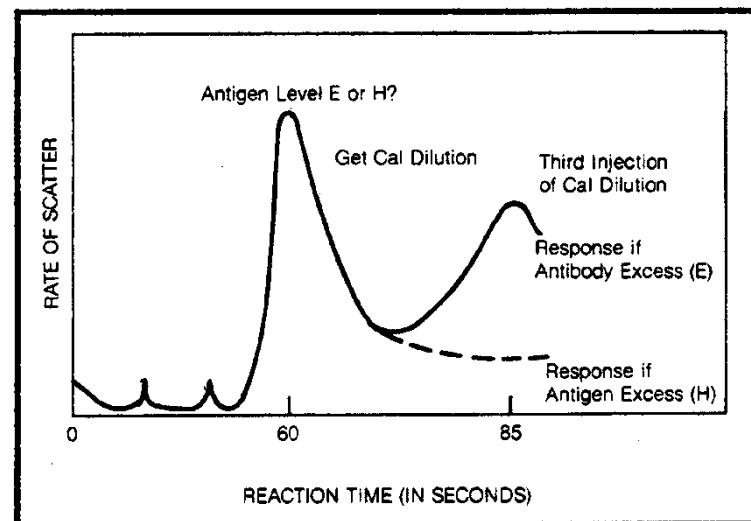
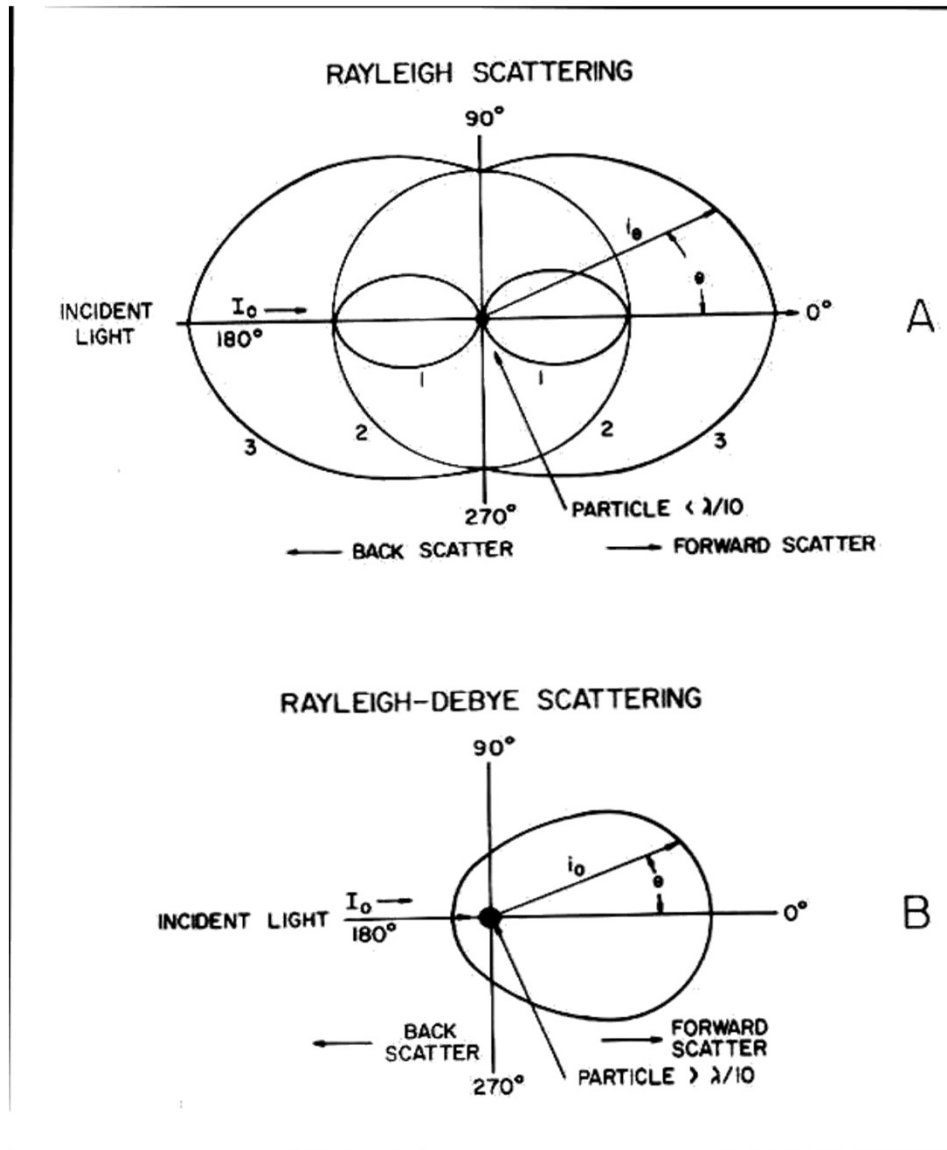


Figure 4. Reaction velocity (rate) as a function of time. The addition of buffer, antigen (Ag), and antibody (Ab) to the reaction cuvette is indicated by arrows.



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

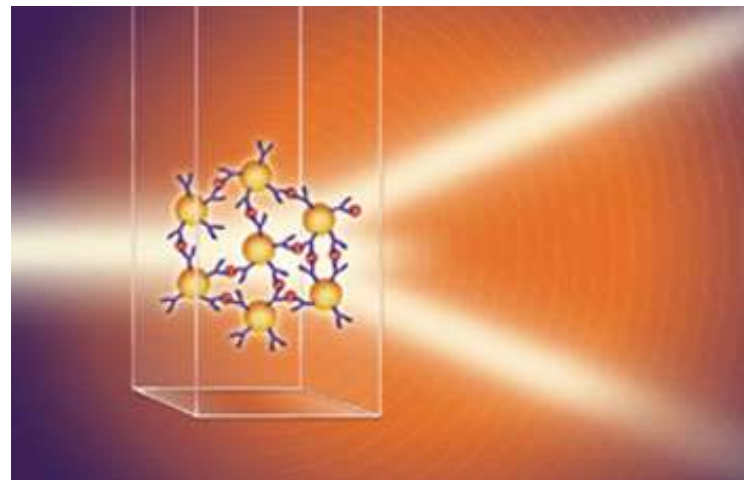
I_0 – intenzita původního paprsku

a – koeficient polarizovatelnosti

Θ – úhel pozorování

λ – vlnová délka

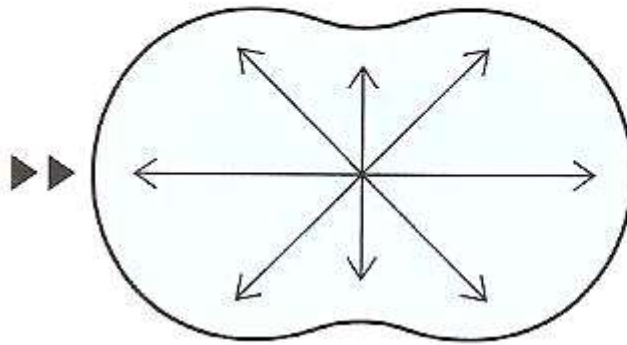
r – vzdálenost od detektoru



Nefelometrie: rozptyl světla na částicích

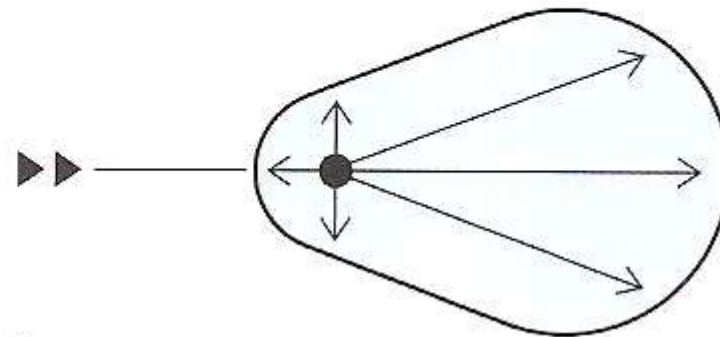
(obr. z H. Reiber: Methodische Grundlagen der Analytik. In: Wildemann, Oschmann, Reiber (Eds.): Neurologische Labordiagnostik. Thieme, Stuttgart, 2006: p. 20.)

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



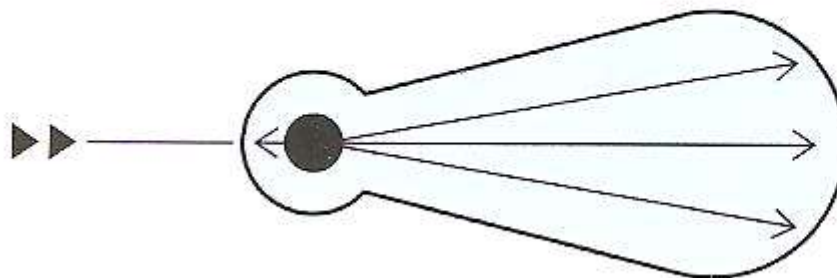
a

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



b

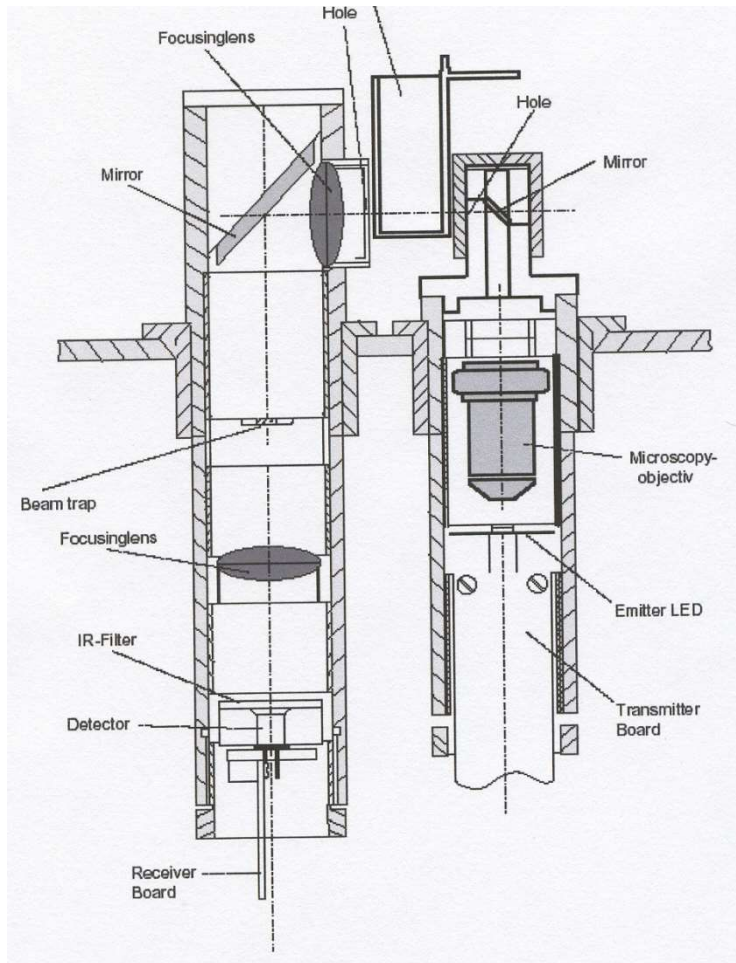
Mie-Streuung
($d > \lambda$)



c

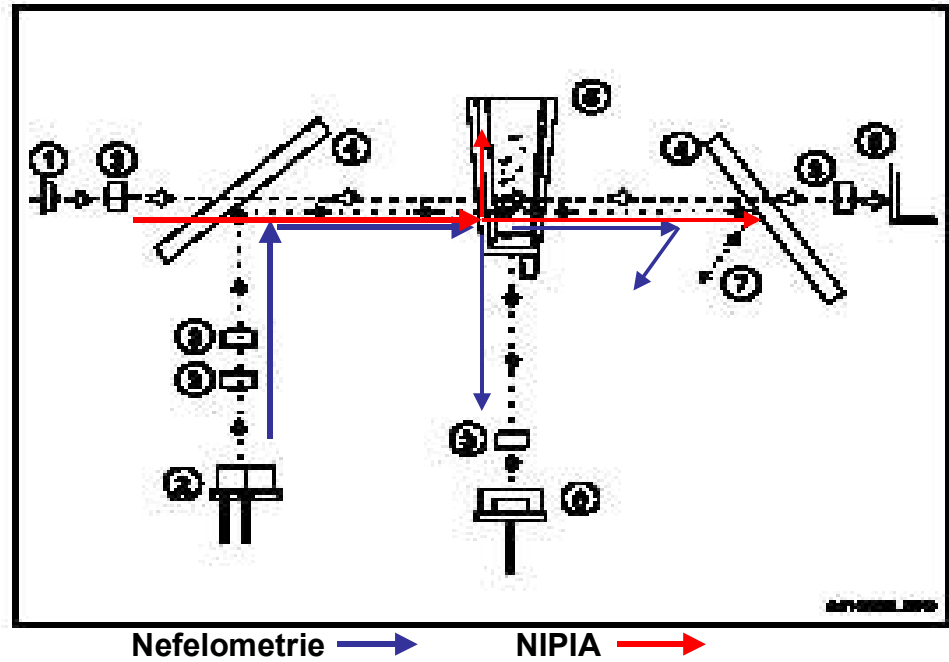
- ▶▶ = einfallender Lichtstrahl
- = Richtung und Intensität des Streulichts
- d = Partikeldurchmesser
- λ = Wellenlänge

Nefelometr BN 100



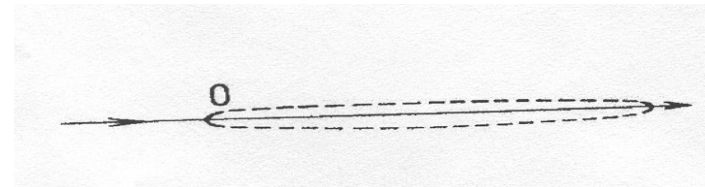
840 nm

Nefelometr Image 680 nm



NIPIA režim

(near infra-red particle immunoassay)



940nm

Shrnutí:

Turbidimetrie

- snížení intenzity paprsku světla po průchodu mikroheterogenním prostředím roztoku (180°)
- 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°
- často měření v úhlu 90° , 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: $A = \varepsilon * c * l$, 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**

Protein	Certifikovaná hodnota	nejistota
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

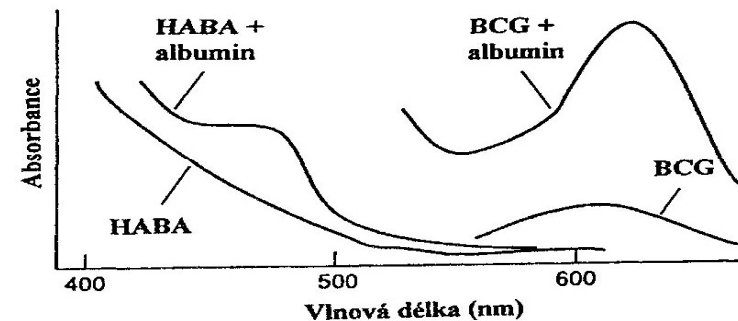
Albumin – transportní funkce

- Látky ve vodě nerozpustné:
 - nekonjugovaný bilirubin
 - Mastné kyseliny
 - Hormony
 - Léky (!)
- Látky hydrofilní (adsorpcí):
 - Ca^{++}
 - 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 (α_1 a α_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)



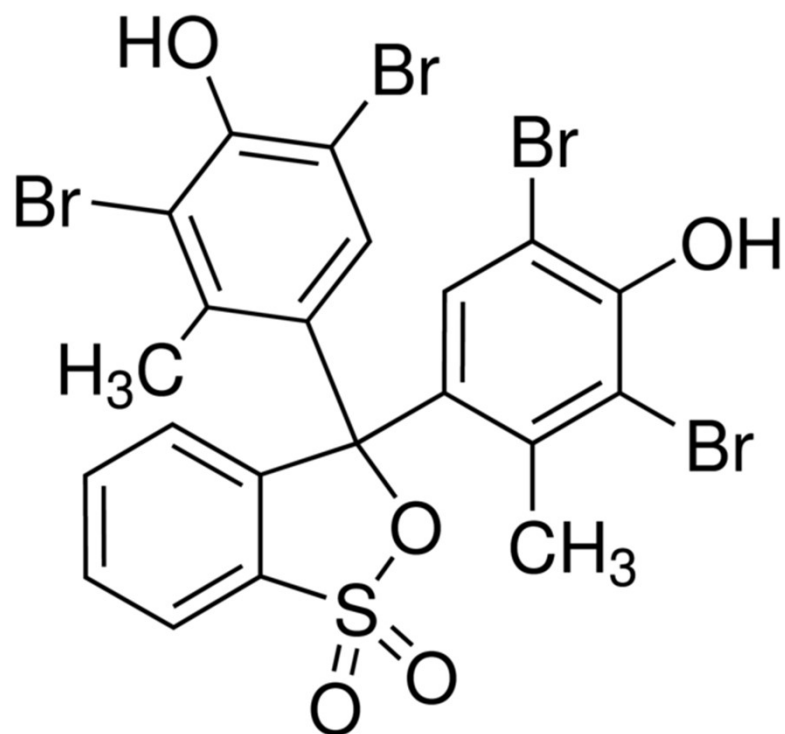
Obr. 6-4 Spektra BCG, HABA a jejich komplexů s albuminem

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

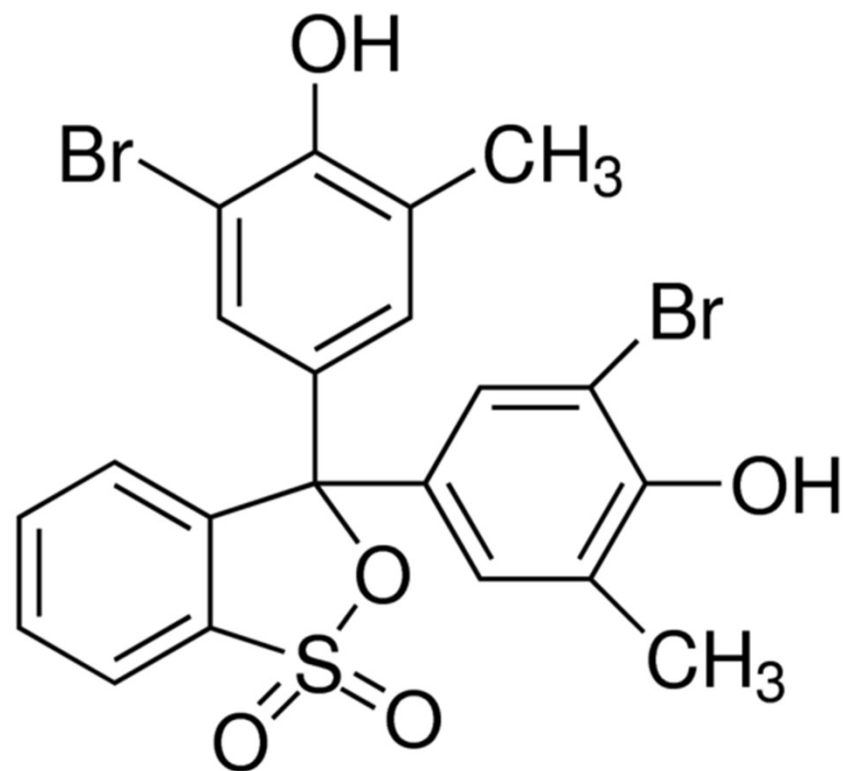


Figure 1 Average and range for albumin values, as tested by bromocresol green (BCG) and bromocresol purple (BCP) ...

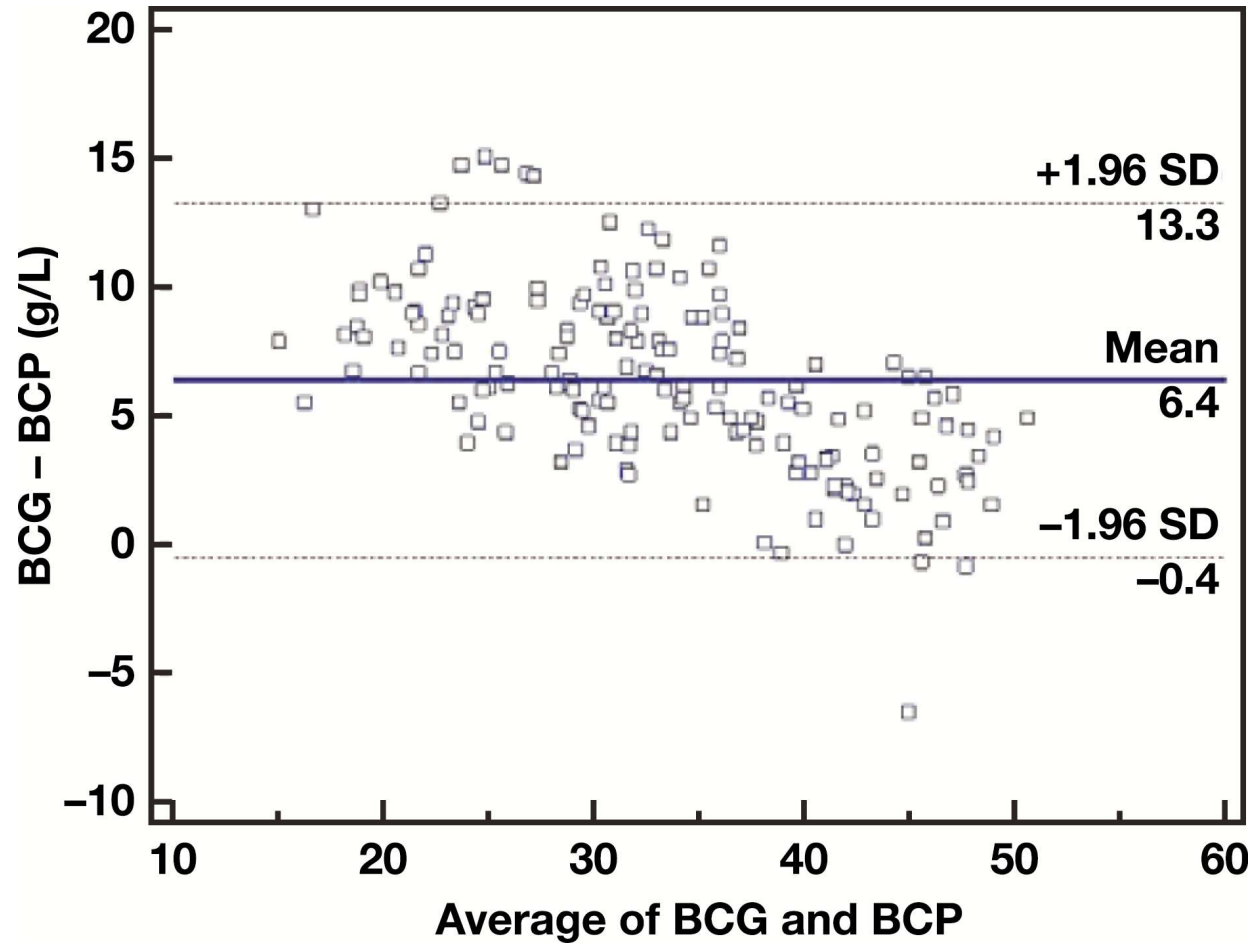
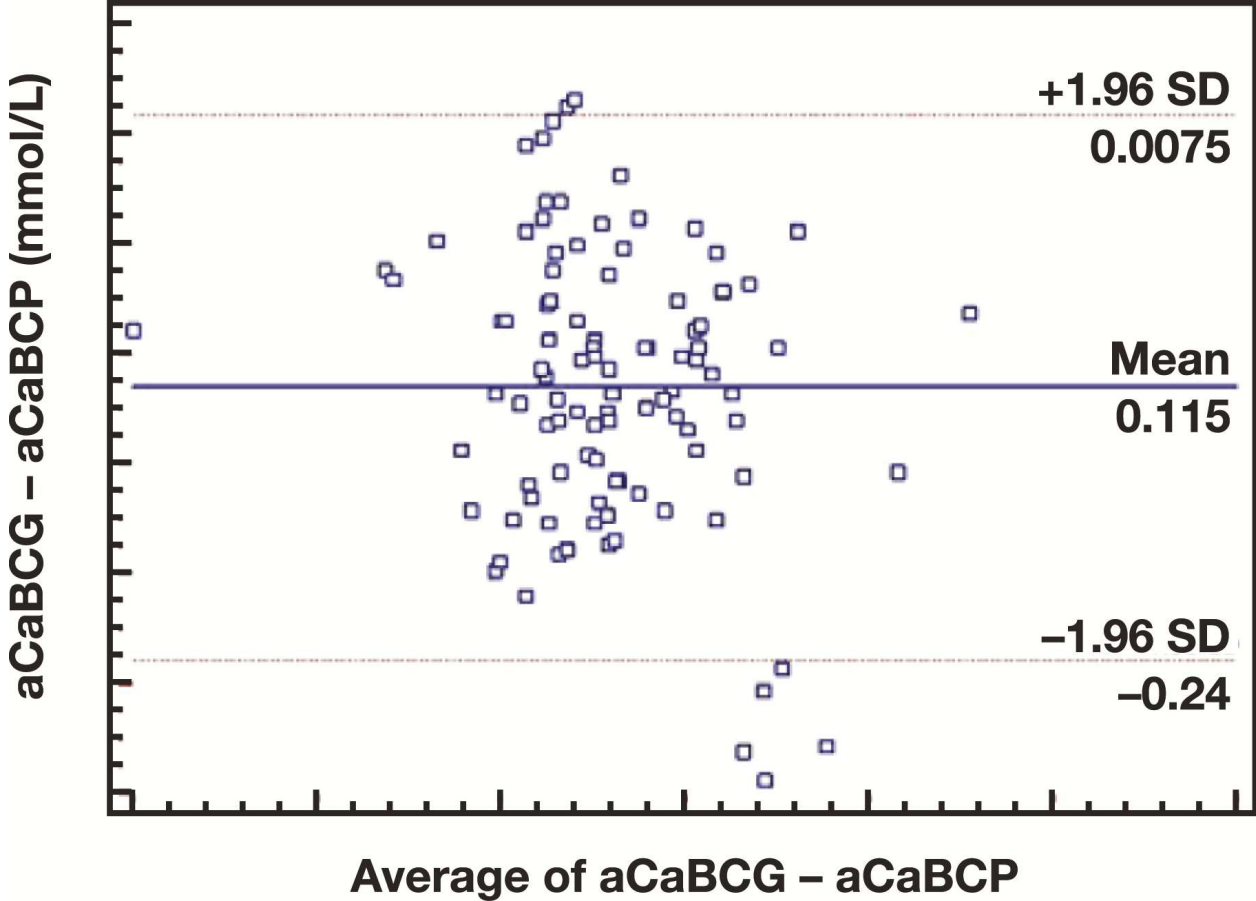


Figure 6 Bland–Altman analysis for adjusted calcium (aCa) in mmol/L calculated according to the 2 methods available ...



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 α 1- a α 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, α_1 -inhibitor proteinas = α_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 % Cu^{2+} v séru je vázáno na ceruloplazmin
- Funkce: a) transport mědi, b) jako ferroxidasa – oxiduje Fe^{2+} na Fe^{3+} (nutný krok pro zabudování 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 (α) a dva těžké řetězce (β) 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 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: vrožený 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 β - a γ - globulinů)

Gama-globuliny: IMUNOGLOBULINY

- **IgG, IgA, IgM, IgD, IgE**
- **Těžké řetězce gamma, alfa, mí, delta, epsilon ($\gamma, \alpha, \mu, \delta, \epsilon$)**
- **Lehké řetězce kappa (κ), lambda (λ)**
- **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)
IgG	21	Sérum, intersticiální tekutina	Oponizace; neutralizace; aktivace komplementu; přestup placentou; sekundární protilátková reakce	7-16
IgA	6	Sérum, slzy, sliny, povrch sliznic, kolostrum, mateřské mléko	Ochrana sliznic, oponizace	0,8-4,0
IgM	6	Sérum, membrána B lymfocytů	Aktivace komplementu; primární protilátková reakce; receptor pro Ag na B lymfocytech	0,5-2,4
IgD	3	Sérum, membrána B lymfocytů	Receptor pro Ag na B lymfocytech	0,1
IgE	2	Sérum, intersticiální tekutina	Ochrana proti parazitům	0,0003

Imunoglobuliny

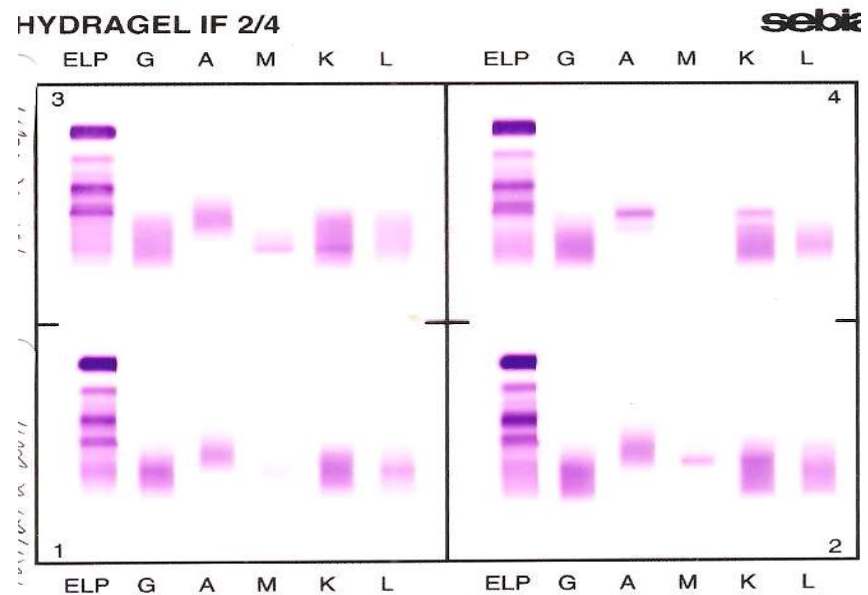
- **Snížené koncentrace: hypoimmunoglobulinémie**
 - primární (hereditární) defekty
 - sekundárně: těžký nefrotický syndrom, snížená syntéza při nádorových onemocněních, těžké infekce, cytostatická léčba; zvýšené odbourávání (hyperthyreosa, myotonická dystrofie, některá autoimunitní onemocnění)
 - **Zvýšené 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.

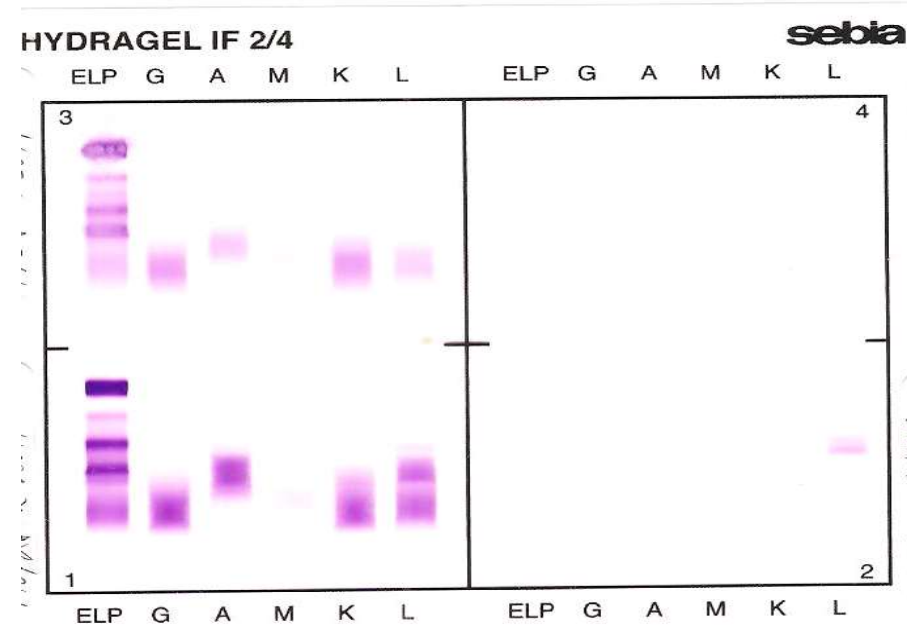
Paraproteiny - typizace

- 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

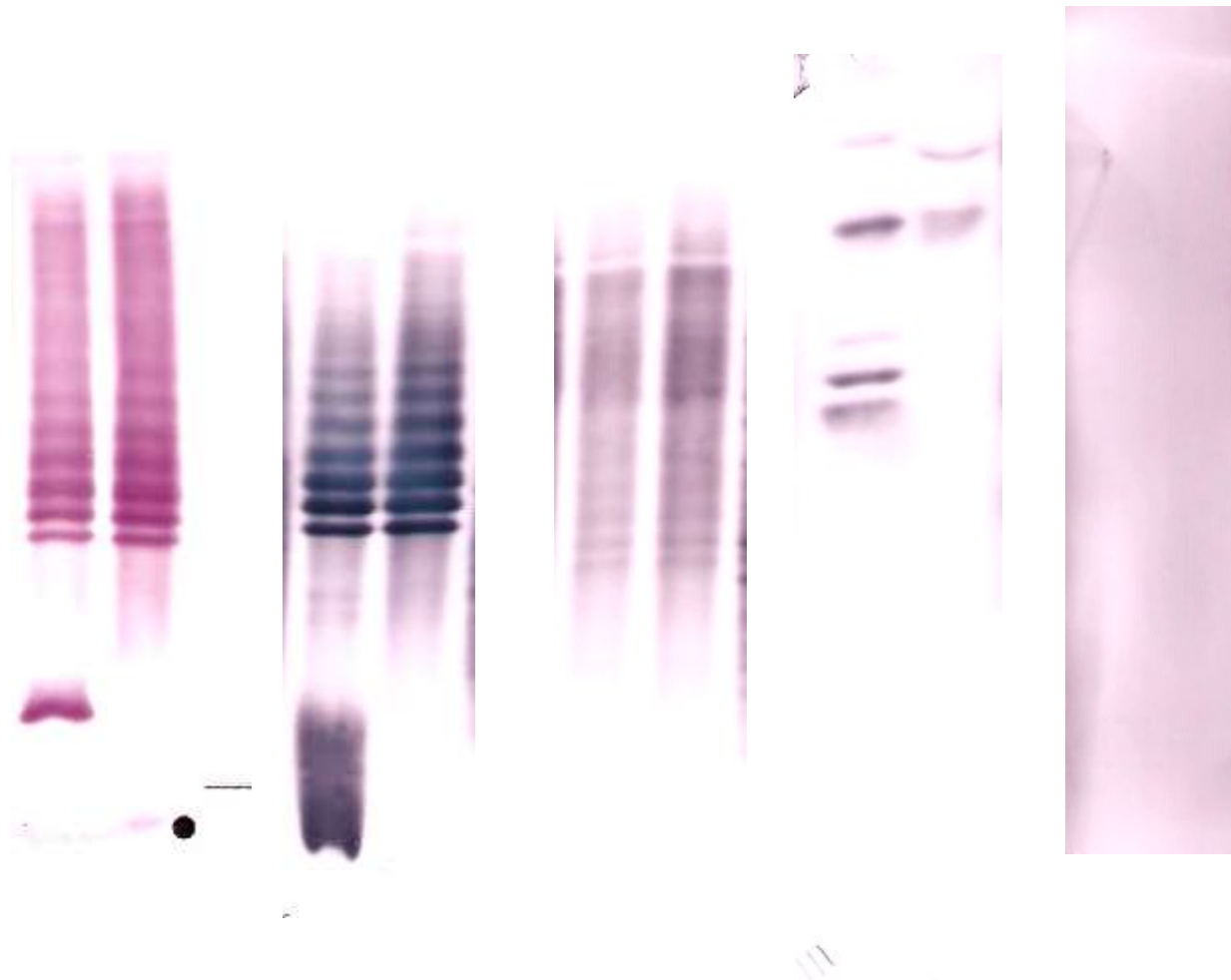
- **Referenční meze** (Freelite™):
- sérum: free kappa 3,3-19,4 mg/l, free lambda 5,7 – 26,3 mg/l; **poměr $f\kappa/f\lambda$** 0,26 – 1,65
- Moč: free kappa $5,4 \pm 4,95$ mg/l, free lambda $3,17 \pm 3,3$ mg/l; průměrný poměr $f\kappa/f\lambda$ 0,46-4,0 (první ranní moč)
- **Klinický význam** stanovení 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 κ , IgG λ , free κ , free λ (IEF/AIB)

9 9'



Reaktanty akutní fáze

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

CRP, SAA, AAG, α_1 -
antitrypsin, α_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 Ca^{2+})
- Patří mezi tzv. pentraxiny
- Referenční meze: < 5 mg/l
- U bakteriálních zánětů zvýšení až na stovky 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 autoprotištěk 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 µg/l
 - Hodnoty u těžkých bakteriálních infekcí: 10-100 µg/l
- **LBP = lipopolysacharid vázající protein**
 - Tvorba v játrech vlivem IL-1β 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 – sekce Doporučení

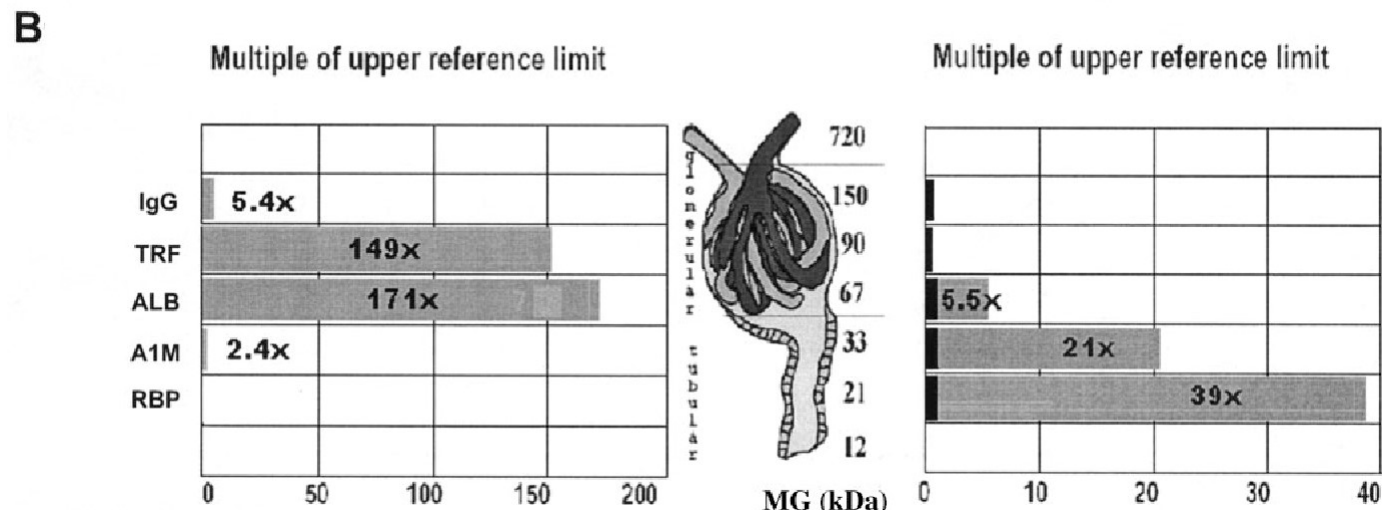
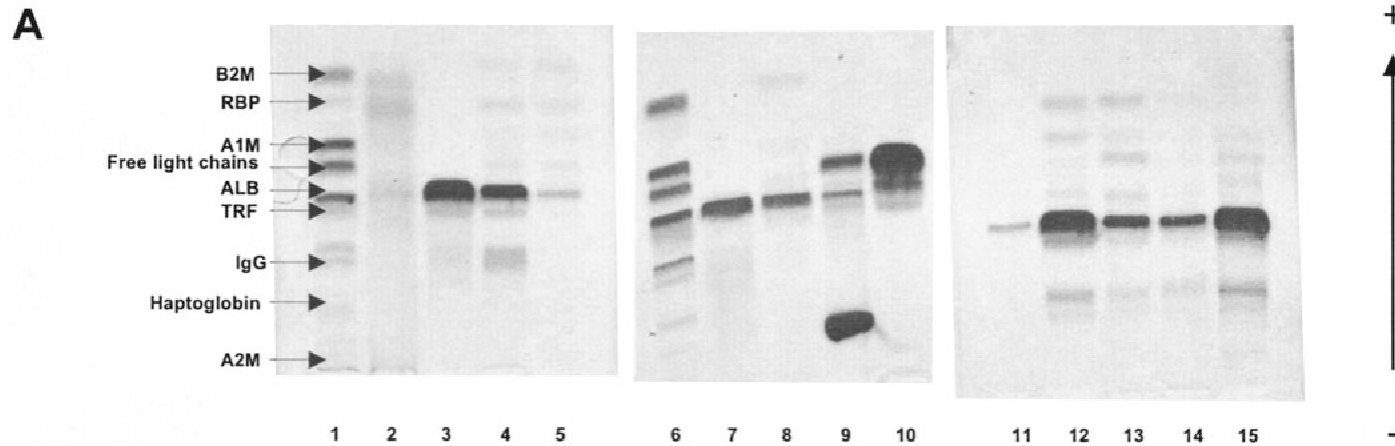
Proteinurie	příčina	charakteristika
funkční (při těžší práci/cvičení, ortostatická)	Hemodynamická/glomerulární	PU <1 g/24 h, přechodná
prerenální	Zvýšená plazmatická koncentrace nízkomolekulárních bílkovin, jejichž filtrace překročí resorpční kapacitu proximálního tubulu	Např. volné lehké řetězce u monoklonálních 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)
α_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)
α_2 -makroglobulin	725	Postrenální PU; krvácení, exsudace; kvocient α_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	
BTP (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)
Prealbumin	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.)

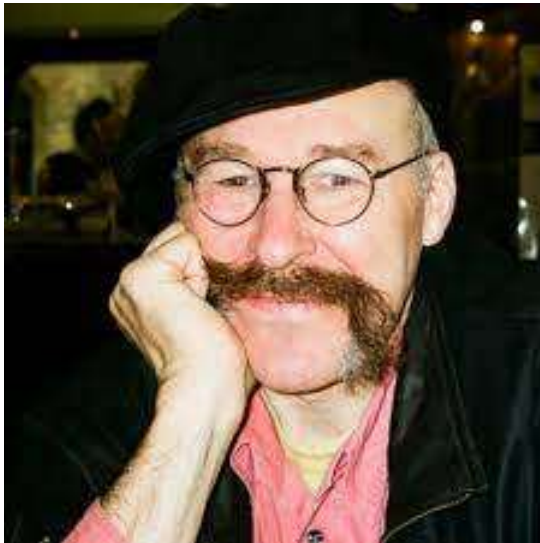
Koncentrace bílkovin v likvoru závisí i na místě odběru:

- 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

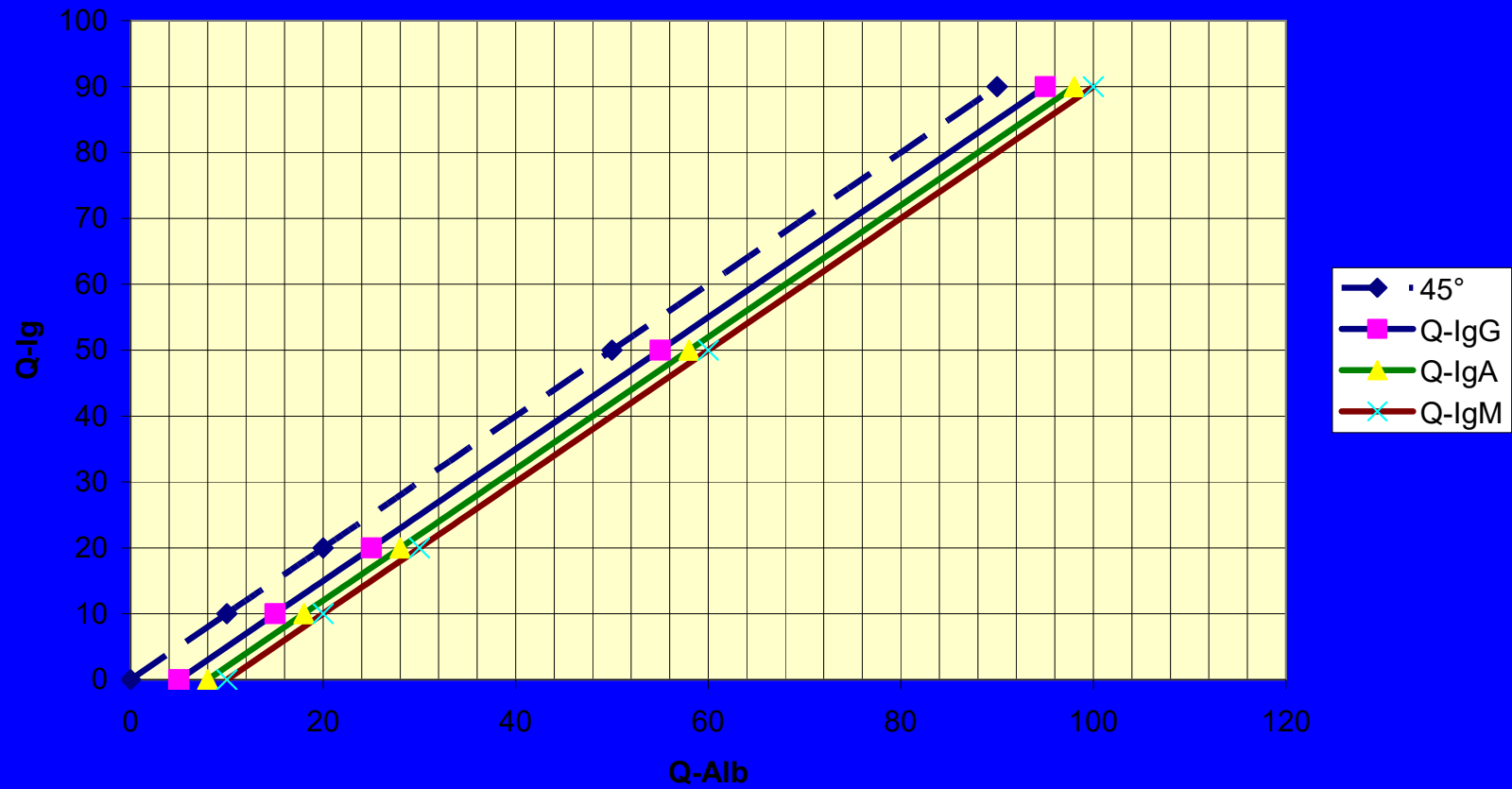
Koncepce hemato-likvorové bariéry a výpočty intrathekální syntézy imunoglobulinů

prof. Hansotto Reiber (nar. 1940) www.horeiber.de

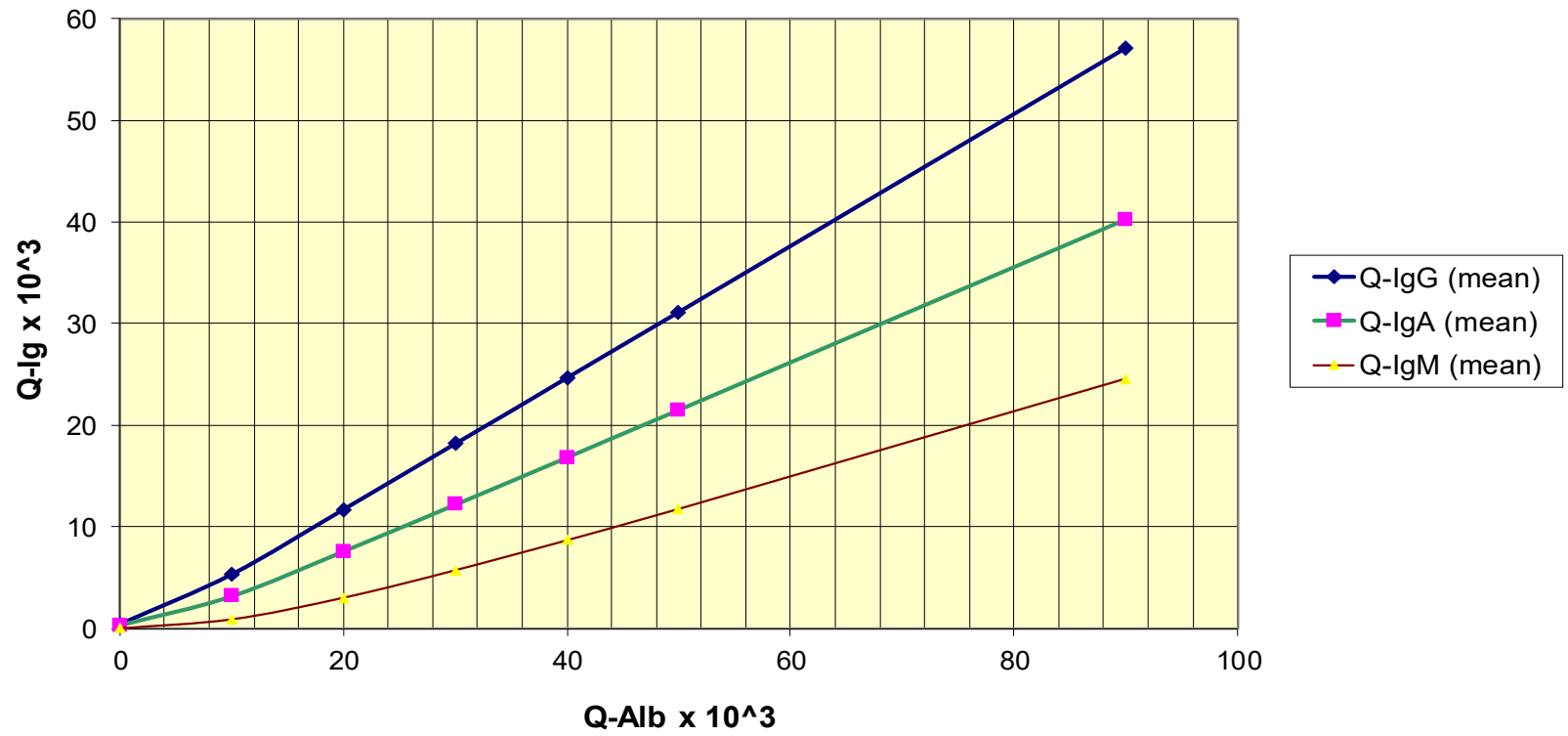


- H. Reiber, K. Felgenhauer: Protein transfer at the blood-CSF barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta* 1987, 163:319-328 – historický průlom
- Patologická změna „průtoku likvoru“ (CSF flow rate) postačuje ke kvantitativnímu vysvětlení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

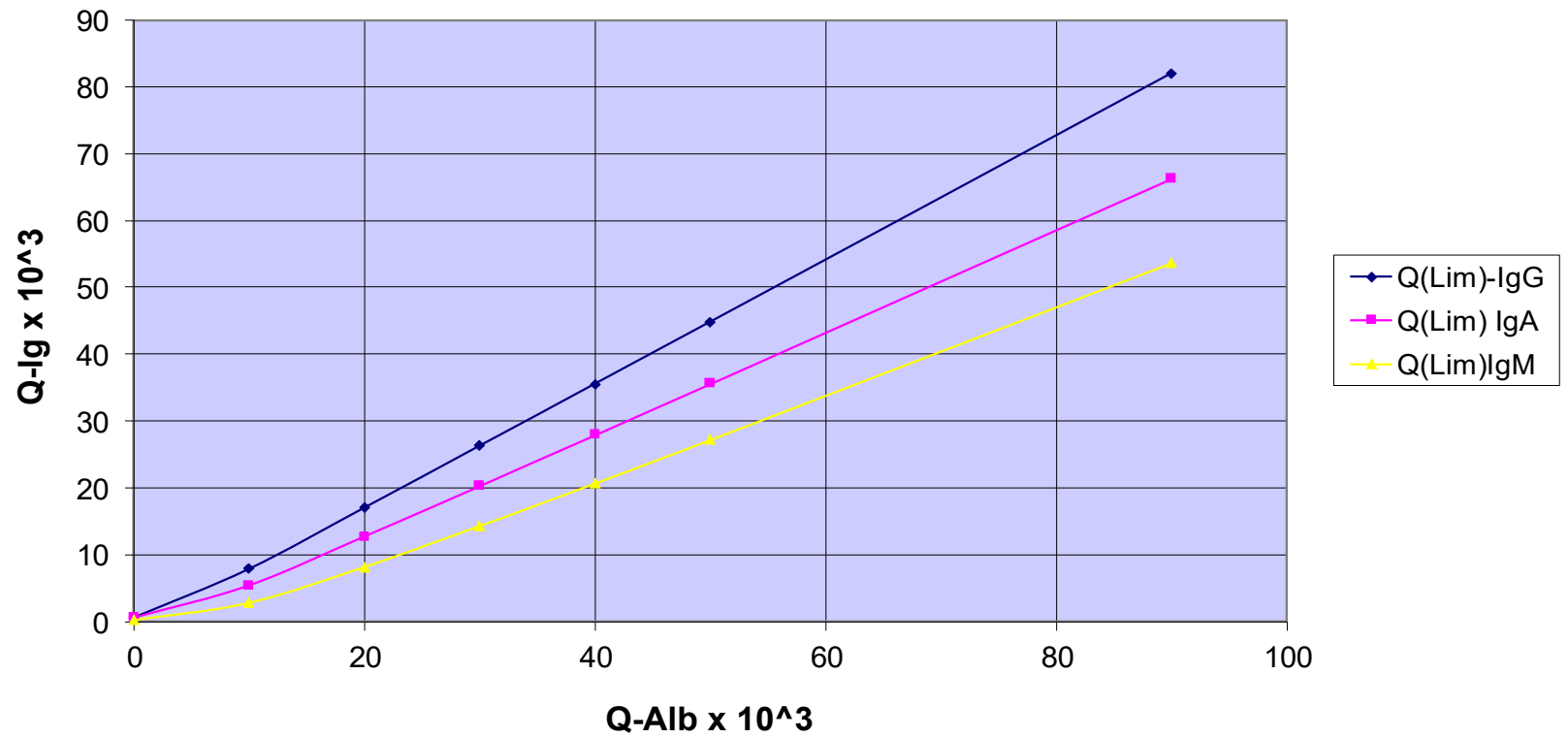
Q-Ig jako funkce Q-Alb - "leakage" model



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:

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

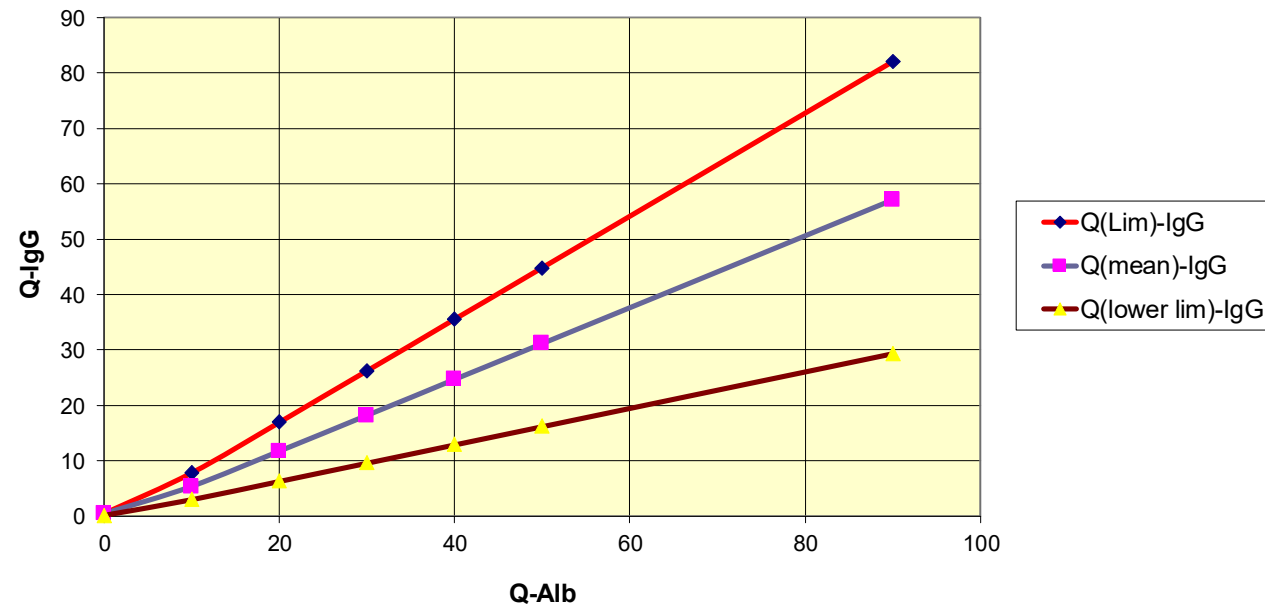
- Ig kvocient (např. IgG – podobně pro IgM, IgA, ...)

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

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)

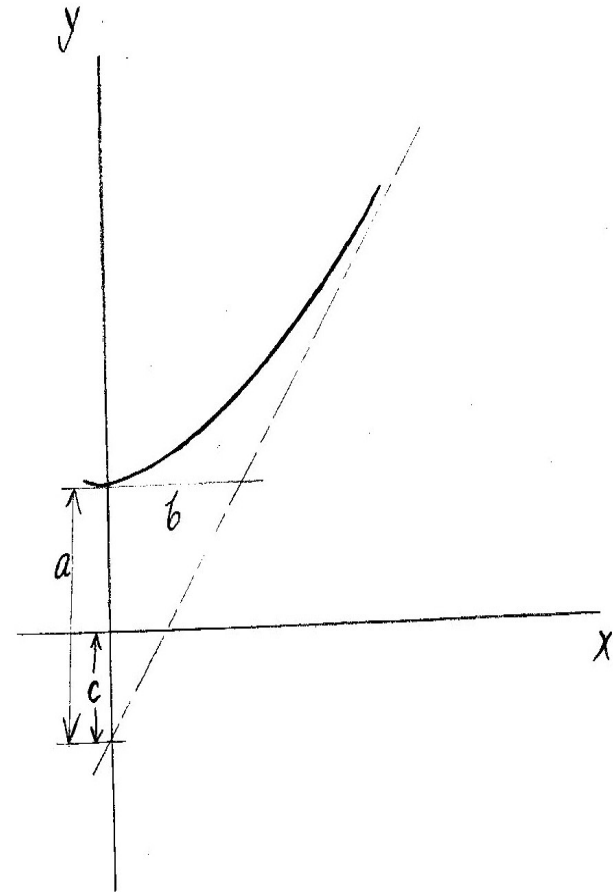


$$Q_{Ig} = \frac{a}{b} \sqrt{(Q_{Alb})^2 + b^2} - c$$

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

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.

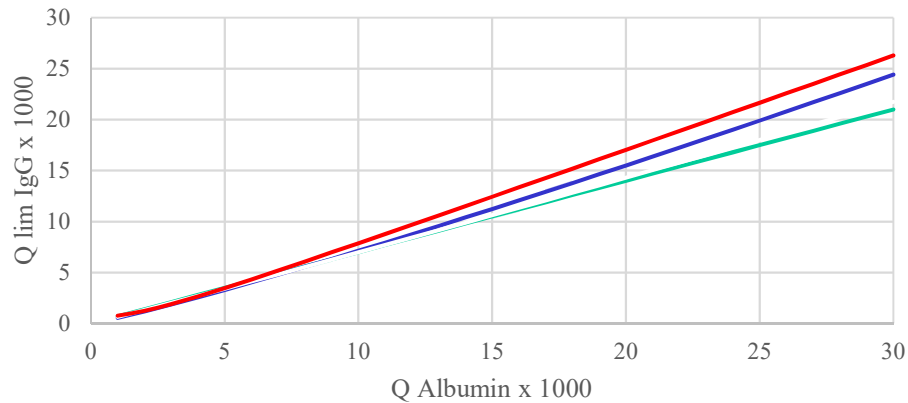
$$Q_{lim\ Ig} = a \cdot Q_{Alb}^b$$

	<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)

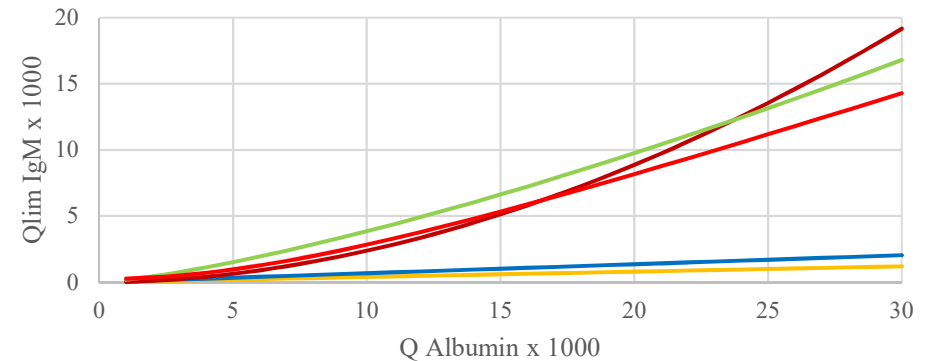
Q_{lim} IgG, IgM a IgA jako funkce Q Alb - aneb jak odhadujeme intrathekální syntézu pomocí různých výpočtových vztahů

Q_{lim} IgG jako funkce Q Alb



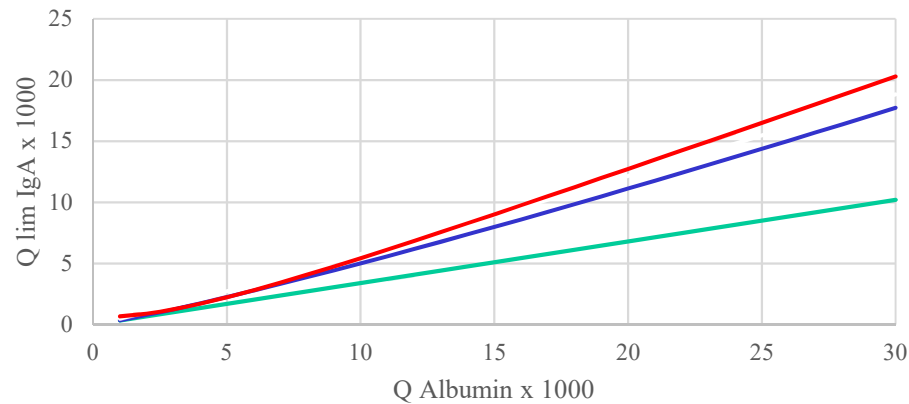
— IgG index 0.7 — Q_{lim} IgG(Ö) — Q_{lim} IgG(H) — Q_{lim} IgG(R.)

Q_{lim} IgM jako funkce Q Alb



— IgM index 0.04 — IgM index 0.068 — Q_{lim} IgM(Ö)
— Q_{lim} IgM(H) — Q_{lim} IgM(R.)

Q_{lim} IgA jako funkce Q Alb



— IgA index 0.34 — Q_{lim} IgA(Ö) — Q_{lim} IgA(H) — Q_{lim} 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">- Časná fáze bakteriálních meningitid a virových meningoencefalitid- Syndrom Guillain-Barré
Dominance IgG	<ul style="list-style-type: none">- Roztroušená skleróza (IgM v 50%, IgA ve 20%)- Neurosyfilis (IgG + IgM, někdy dominance IgM; velmi vzácně IgA)- HIV encefalitida (jen IgG)- Infekce pomalými viry- Encefalitida asociovaná s protilátkami proti NMDA-receptoru
Dominance IgA	<ul style="list-style-type: none">- Neurotuberkulóza (IgA izolovaně nebo spolu s méně výraznou ith. syntézou IgG)- Mozkový absces- Někdy u HSV a VZV meningoencefalitidy
Dominance IgM	<ul style="list-style-type: none">- Lymeská neuroborrelióza (IgM > IgA > IgG)- Meningoencefalitida při průušnicích (IgM + IgA + IgG)- Klíšťová meningoencefalitida- Někdy u lymfomů s postižením CNS (monoklonální IgM)- Neurotrypanosomiáza (IgM + IgA + IgG, IgM v 95% případů)
IgG + IgA + IgM	<ul style="list-style-type: none">- Oportunní infekce při imunodeficitech (CMV, toxoplazmóza, mykotické infekce)- Neurocysticerkóza a jiné parazitózy

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

• 1. SEPARACE

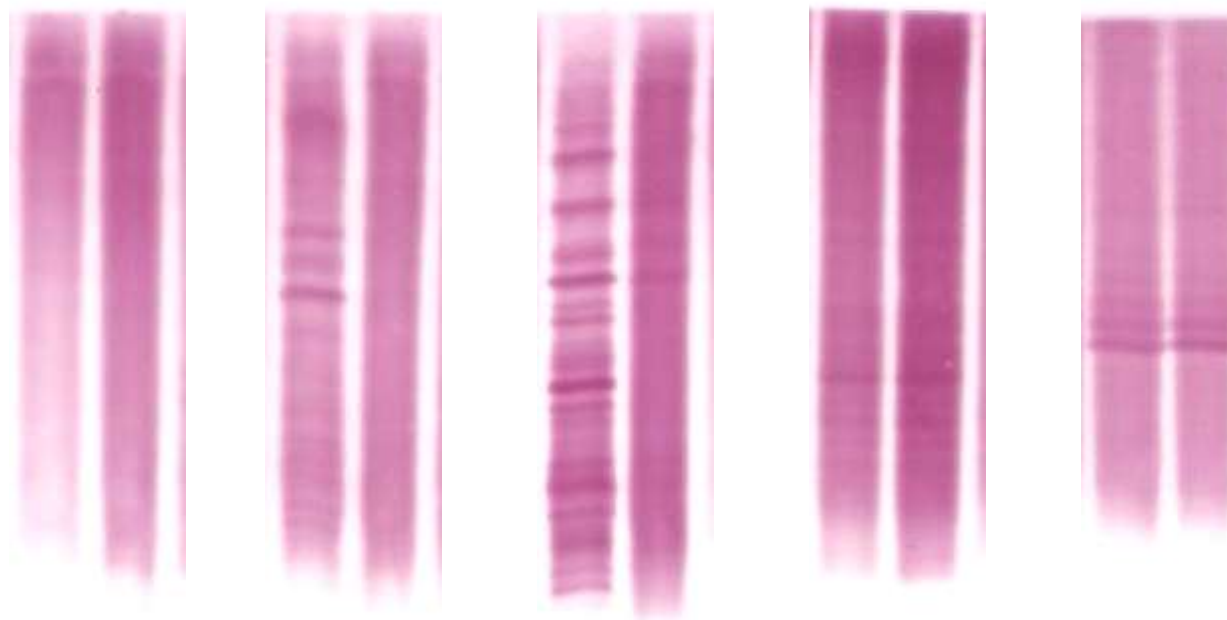
- Nativní elektroforéza
- **Izoelektrická fokusace** (doporučená separační metoda) – *elektroforetické dělení bílkovin v gradientu pH – bílkoviny se rozdělí podle svých izoelektrických bodů*

• 2. DETEKCE

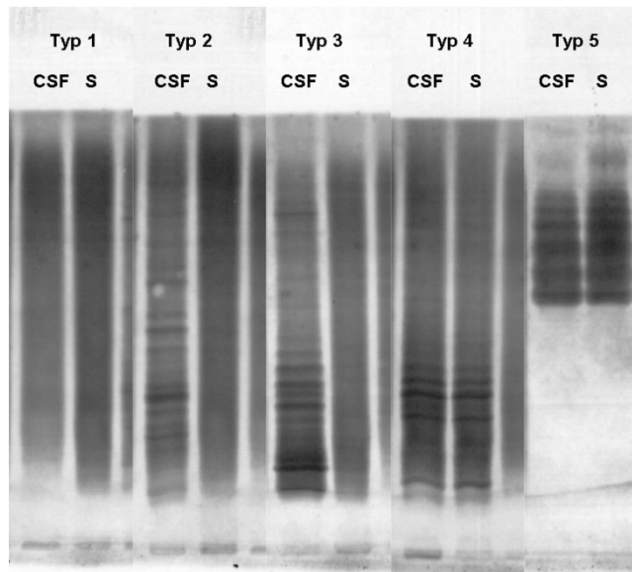
- Nespecifická detekce – barvení na bílkovinu (Coomassie blue /nutnost zahušťování CSF/, stříbření /nativní CSF/)
- Specifická detekce IgG pomocí anti-IgG protilátky (doporučeno)
 - a) fixace anti-IgG protilátkou v gelu, odmytí nezreagovaných proteinů a následně „nespecifické“ obarvení precipitátu
 - 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:** ≥ 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