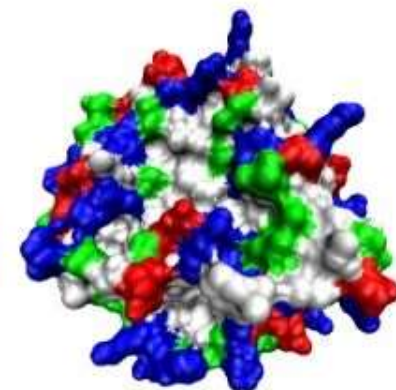
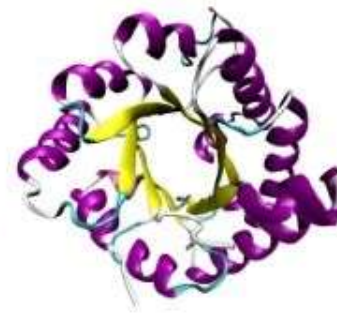
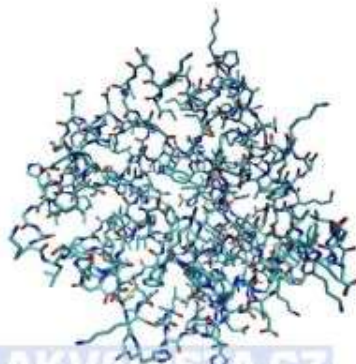
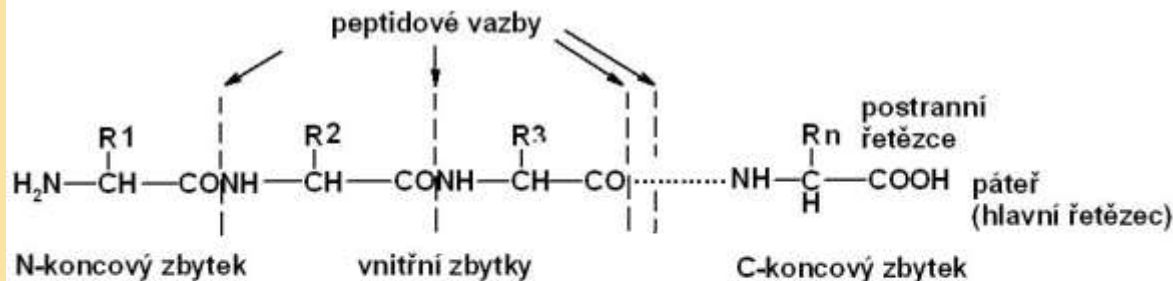
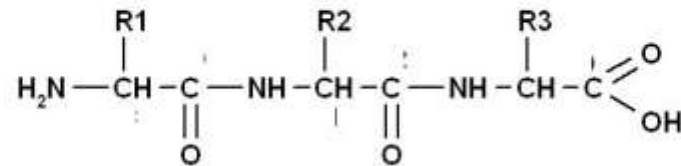


# **Bílkoviny**

# Funkce bílkovin

- Enzymy
- Strukturální
  - kolagen, keratin
- Kontraktilní
  - aktin, myosin
- Protilátky
  - imunoglobuliny
- Transportní
  - albumin, transferin,...
- Proteohormony
  - inzulín

## Peptidová vazba



# Bílkoviny

Analyzovaný materiál: sérum, plasma, moč, likvor

- Mezi základní biochemická vyšetření patří stanovení **celkové bílkoviny**.
- Hlavní skupiny bílkovin tvoří **albumin** (asi 50%) a **globuliny**
- Kromě albuminu a CRP jsou to glykoproteiny (10-25% obsah sacharidů)

## – Albumin

- tvořen převážně v játrech
- udržuje stabilní onkotický tlak (podílí se na něm ze 75%)
- významné transportní funkce

## – Globuliny

- různé typy proteinů
- dělí se na alfa, beta a gamaglobuliny
- syntetizovány také v játrech, nebo jsou tvořeny imunitním systémem

# Celková bílkovina

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

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

# Celková bílkovina

- **poloha při odběru:** vstoje -> přesun tekutiny z intravazálního prostoru do intersticia -> zakoncentrování proteinů v krvi – konc. se zvyšuje o 10 – 15 % => pacient by měl 15 min. před odběrem sedět. U ležících pacientů hodnoty o cca 10 % nižší
- **zvýšená svalová aktivita** -> zvýšení koncentrace až o 12 %
- **expozice vysoké teplotě** -> zvětšení plazmatického objemu a snížení glomerulární filtrace -> celkové proteiny mohou poklesnout až o 10 %
- **dehydratace** vede ke zvýšeným koncentracím
- **není nutný odběr nalačno**
- **delší stažení paže (nad 3 min)** při odběru -> falešné zvýšení až o 10 %
- nižší hodnoty - děti, v graviditě (vlivem hemodiluce)
- v séru jsou hodnoty CB nižší, v plazmě jsou koncentrace vyšší - odpovídá koncentraci fibrinogenu: o 2,5 g/l - 4,6 g/l

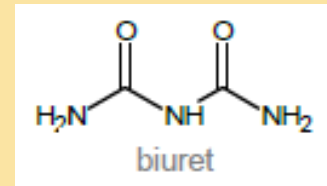
# Celková bílkovina - stanovení

- Sérum:
  - Reakce s biuretovým činidlem
  - Kjeldahlova metoda
- Likvor, moč:
  - Fotometrické metody
  - Turbidimetrické metody
  - Další metody:
    - Metoda s kyselinou sulfosalicylovou
    - Metody založené na schopnosti proteinů vázat barvivo

# Celková bílkovina

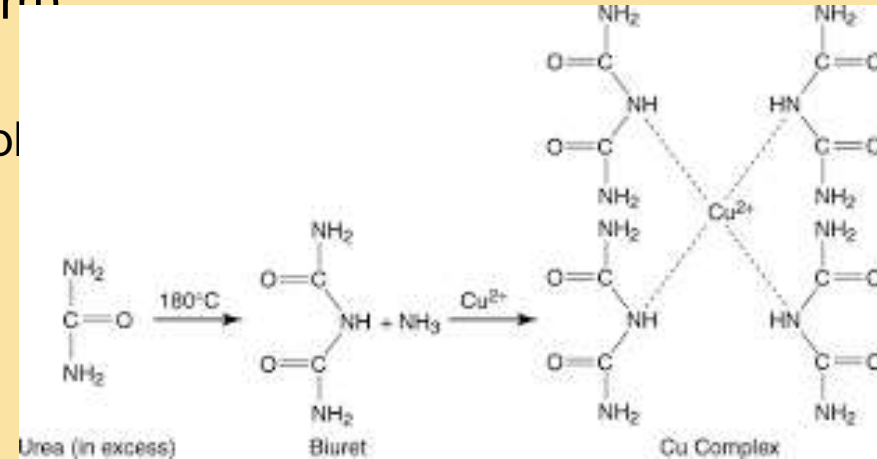
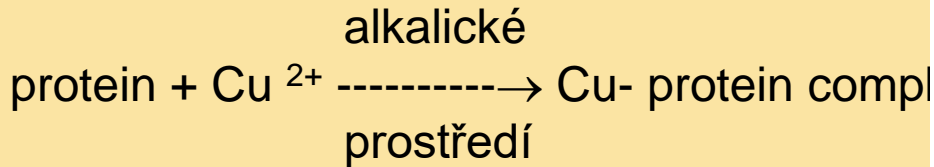
## *Metody stanovení:*

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



# Fotometrické metody

## Metoda s biuretovým činidlem (sérum):



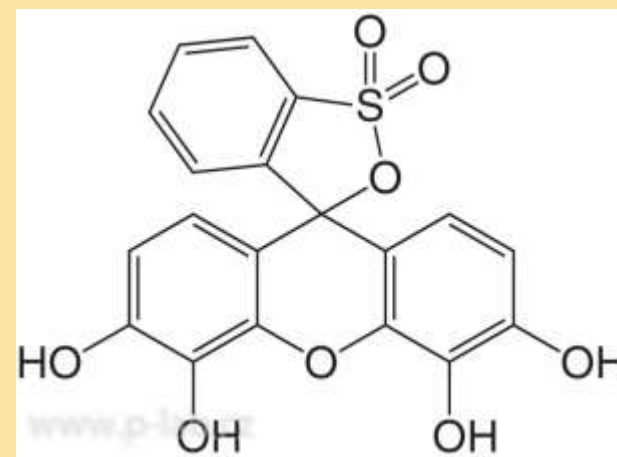
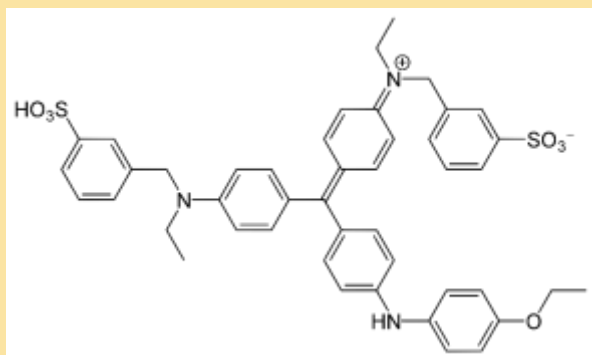
- Komplex vhodný k fotometrickému stanovení při 540 – 550 nm
- Detekční limit: kolem 2 g/l
- Biuretová reagensie dále obsahuje:
  - **tartarát sodno-draselný** - ke komplexaci měďnatých iontů a zabránění vysrážení hydroxidu měďnatého
  - **jodid draselný** - antioxidant - zabraňuje autoredukci mědi
- Aminokyseliny a dipeptidy nereagují - malé peptidy dávají růžové zbarvení, ale vzhledem k jejich nízké koncentraci v séru je jejich příspěvek nevýznamný
- Interference: Hemolýza (hemoglobin reaguje jako protein), lipémie vadí až při vysokých koncentracích



# Fotometrické metody

## Metody využívající vazbu proteinu na barvivo:

- Coomassie blue, Pyrogallová červeň
- stanovení v moči a likvoru



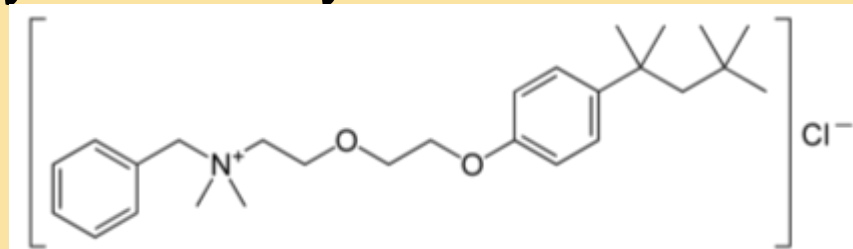
## Nevýhody:

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

# Turbidimetrické metody

## Stanovení s benzethonium chloridem (moč, likvor):

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



## Doporučená metoda

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

**Interference:** CSF – vadí hemolýza, U – přítomnost solí

**Mez detekce:** 0,04 g/l

# Turbidimetrické metody

## **Metoda využívající precipitace bílkovin s kyselinou trichloroctovou nebo sulfosalicylovou:**

- vykazuje nestabilitu nebo flokulaci precipitátu a také rozdíly v chování činidla k jednotlivým bílkovinám ve směsi
- je nezbytně nutné nepoužívat kalibrátor na bázi albuminu, ale zahrnující spektrum bílkovin tak, jak se vyskytují v moči

# Další metody

## **Metoda s kyselinou sulfosalicylovou:**

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

## **Metody založeny na schopnosti proteinů vázat**

**barvivo:** např. amidočernň, kyselou violet'

Využívají se zejména k barvení po elektroforetickém rozdělení

# Další metody

## Kjeldahlova metoda:

- Historicky nejstarší metoda ke stanovení celkové bílkoviny
- Po mineralizaci vzorku varem s kyselinou sírovou se dusík ze vzorku převede na amoniak, který zůstane vázán ve formě síranu amonného
- Alkalizací účinkem hydroxidu se ze síranu amoniak uvolní a stanoví se titračně
- V krvi jsou přítomny i dusíkaté látky nebílkovinného původu – je proto za potřebí po stanovení celkového dusíku vysrážet bílkoviny např. kys. trichloroctovou a v supernatantu stanovit také dusík
- Dusík bílkovin pak bude rozdílem mezi dusíkem celkovým a nebílkovinným
- Nedá se automatizovat, tudíž se v laboratořích klinické biochemie nepoužívá
- Má význam při definování referenčních materiálů pro biuretovu metodu

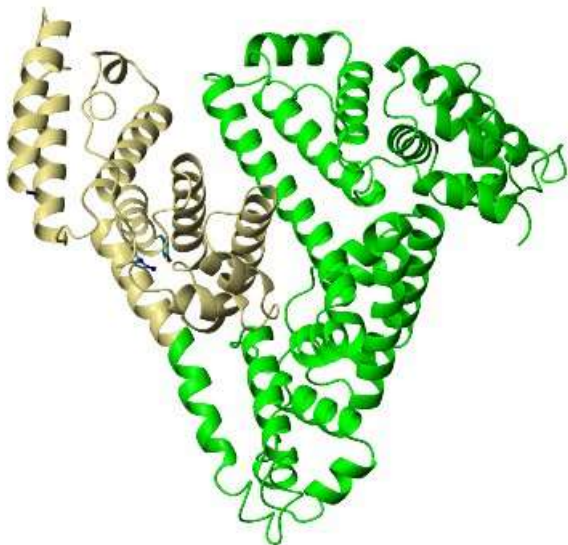
# Albumin

- *Analyzovaný materiál:* sérum, plasma, moč, likvor
- *Speciální preanalytické požadavky:* nejsou
- *Referenční metoda:* není
- *CRM:* ERM DA 470
- *Referenční rozmezí:*

S/P 34-48 g/l

moč 0-0,03 g/l

likvor 0,12-0,3 g/l



Albumin v likvoru = vždy z krve, v CNS se netvoří (syntéza v játrech, do mozku se dostává přes hematolikorovou bariéru => slouží k hodnocení funkčního stavu hematolikorové bariéry)

# Albumin - stanovení

- Sérum:
  - Stanovení s bromkresolovou zelení (BCG)
  - Stanovení s bromkresolovým purpurem (BCP)
- Moč:
  - Imunoturbidimetrie
  - Immunonefelometrie
- Likvor:
  - Immunonefelometrie

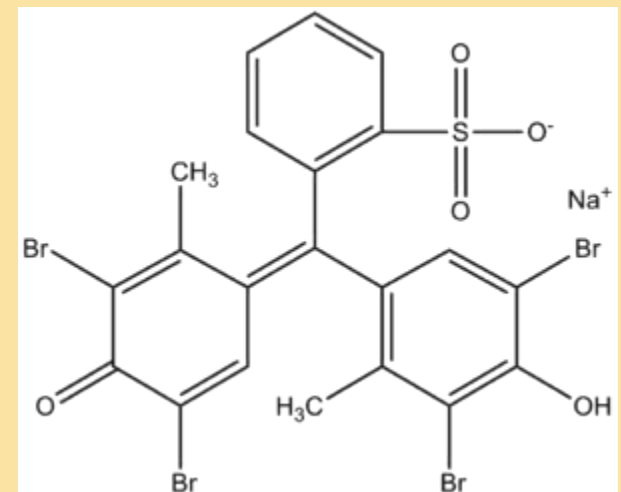
# Albumin v séru

- Ve slabě kyselém prostředí se albumin chová jako kation
- Stanovení založeno na reakci s aniontovým barvivem většinou se skupinou –  $\text{SO}_3\text{H}$
- Mez detekce: 2 g/l
- Využívají se barviva, která se specificky vážou na albumin v přítomnosti ostatních sérových bílkovin
- Značný posun absorpčního maxima komplexu albumin-barvivo proti absorpčnímu maximu samotného barviva



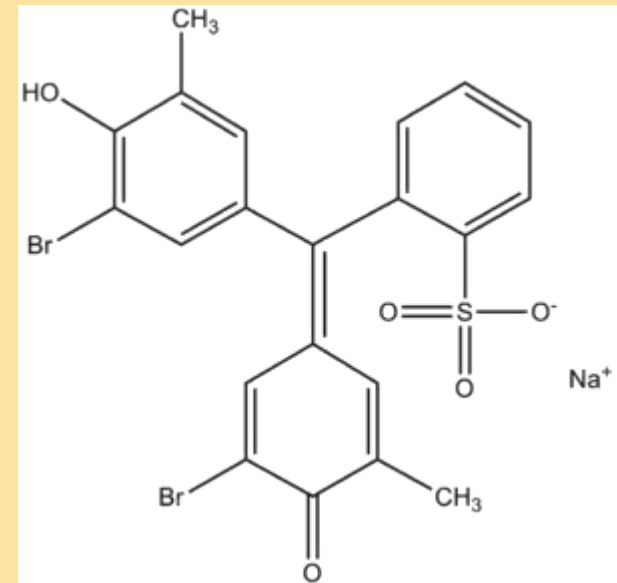
# Stanovení albuminu s bromkresolovou zelení (BCG) v séru a plasmě

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



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

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



# Albumin v moči

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

## **Imunoturbidimetrie nebo imunonefelometrie**

- Se specifickou protilátkou proti lidskému albuminu tvoří albumin precipitát imunokomplexu
- Vzniklý zákal se měří imunoturbidimetricky nebo imunonefelometricky
- Reakčním prostředím je pufr s obsahem polyethylenglykolu (PEG; podporuje tvorbu suspenze)

**Mez detekce:** 2-10 mg/l

# Albumin v moči

## Mikroalbuminurie

- Albumin v moči – důležitý marker poukazující na generalizovanou cévní hyperpermeabilitu
- Fyziologická albuminurie je  $< 20 \mu\text{g}/\text{min}$
- Denně – až 30 mg albuminu vylučováno močí
- Běžné proužky na stanovení proteinurie – až od 150 mg/l
- 30-150 mg/l = mikroalbuminurie
- Vyšetřování buď v jednorázové ranní moči, pak výsledek vyjádřen v přepočtu na kreatinin
- Nebo ve sbírané moči za časovou jednotku (doporučený odběr přes noc, nemocný v klidu, délka sběrného období min. 6 hod, s přesností na minuty)

# Stanovení dalších proteinů

- Další proteiny přítomné v séru v nízkých koncentracích se převážně stanovují **imunoturbidimetry** nebo **imunonefelometry** (mg/l)
- Pro stanovení v séru a moči postačuje imunoturbidimetrie, pro stanovení v likvoru je pro svou citlivost vhodná imunonefelometrie
- **Chemiluminiscence** ( $\mu\text{g/l} = \text{ng/ml}$ )
- ELISA (výzkumné parametry)

# CRP v séru a plasmě

- C-reaktivní protein - **nejčastěji stanovovaný** velmi citlivý **protein akutní fáze**
- Jeho koncentrace se prudce zvedá při zánětu
- Není specifický
- **Imunoturbidimetrické stanovení** zesílené na částicích (**particle-enhanced**) – antigen (CRP) reaguje a protilátkou proti CRP, která je navázaná na latexových mikročásticích. Vzniklý komplex – precipitát se stanoví turbidimetricky
- Mez stanovitelnosti kolem 1 mg/l

# Imunoglobuliny v séru (plazmě) a likvoru

**Imunoglobuliny G, A a M v séru či plasmě** - stanovují se  
imunoturbidimetricky (imunonefelometricky)

**v likvoru** pouze imunonefelometricky  
(dostatečná citlivost, hodnoty v mg/l)

IgG – 7 - 16 g/l

IgA – 0,7 - 4,0 g/l (Referenční meze v S/P pro dospělé)

IgM – 0,4 - 2,3 g/l

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

# Imunoglobuliny

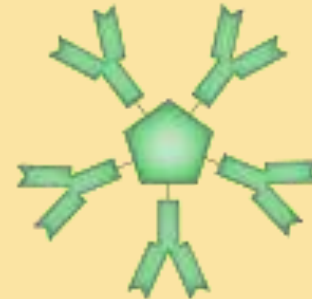
- Analýza jednotlivých polyklonálních imunoglobulinů zahrnuje stanovení koncentrace směsi proteinů různé velikosti s podobnou konstantní částí a různou variabilní částí
- Protilátky a referenční kalibrátory jsou postaveny proti normálním lidským sérum složeným ze směsi imunoglobulinových podtříd
- Stanovení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



Monomer  
IgD, IgE, IgG



Dimer  
IgA



Pentamer  
IgM



# Imunoglobuliny D a E

## Imunoglobuliny D a E v séru

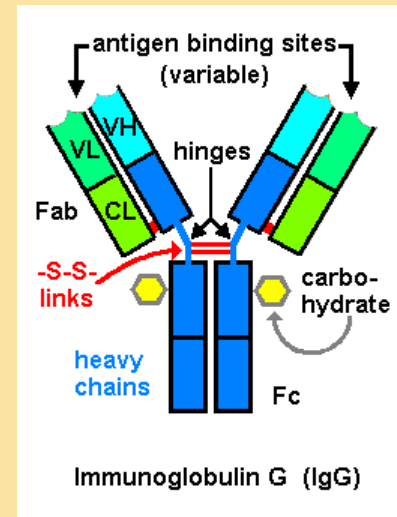
- Vyžadují ke stanovení ještě citlivější analytické metody
- Obvykle se využívají imunoanalyzátory na principu chemiluminiscence

# Imunoglobuliny

- Zjišťování nadměrné tvorby antigenně strukturálně i funkčně homogenního Ig nebo jeho fragmentu -> monoklonální imunoglobulin (mlg; produkován jedním klonem proliferujících plazmatických buněk)
- **Stanovení monoklonálních imunoglobulinů –** problematické
- Monoklonální imunoglobuliny mají pouze některé z determinant, s kterými protilátky v antiséru reagují
- Dochází k rychlé tvorbě precipitátu, pro vysoké koncentrace monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů) jsou výsledky získané zejména po naředění nadhodnoceny
- Pro absolutní koncentraci paraproteinů - **elektroforéza a denzitometrie**
- Pro rozlišení jednotlivých tříd mlg (IgG, IgA, IgM, IgD a IgE,  $\lambda$  a  $\kappa$ ) - **imunofixace**

# Volné lehké řetězce $\kappa$ a $\lambda$

- Immunoglobulinové molekuly:
  - dva těžké řetězce ( $\alpha, \delta, \epsilon, \gamma, \mu$ , které určují Ig třídu)
  - dva identické lehké řetězce
  - každý lehký řetězec je kovalentně navázán na těžký řetězec
  - těžké řetězce jsou kovalentně spojeny v stěžejní část



Stanovení volných lehkých řetězců (FLC, free light chains):

- používají se protilátky namířené proti antigenním strukturám dostupným jen na lehkých řetězcích (nikoli na lehkých řetězcích navázaných na těžké řetězce, tj. kompletní molekuly Ig)
- U zdravých jedinců je koncentrace volných lehkých řetězců minimální
- Absolutní hodnota FLC souvisí s glomerulární filtrací, vychýlení z normálního poměru koncentrace volných lehkých řetězců signalizuje patologickou klonální tvorbu jednoho typu
- V séru je poměr volných kappa ku lambda 0,625 zatímco poměr vázaných volných lehkých řetězců je 2 (volné kappa převážně monomery, volné lambda jako dimery)
- Ke stanovení se používá **imunonefelometrická** případně **imunoturbidimetrická** metoda

# Heavylite, Binding Site

- použití specifických HLC polyklonálních protilátek, obsahujících unikátní junkční epitopy mezi konstantními doménami těžkých řetězců (HC) a lehkých řetězců (LC) molekuly imunoglobulinu.
- tyto HLC protilátky umožní separativní rozpoznání a kvantifikaci  $\kappa$  a  $\lambda$  lehkých řetězců v rámci jednotlivých tříd MIg: **IgG  $\kappa$** , **IgG  $\lambda$** , **IgA  $\kappa$** , **IgA  $\lambda$** , **IgM  $\kappa$**  a **IgM  $\lambda$** .
- **Stanovení poměru molekul IgG  $\kappa$  / IgG  $\lambda$**   
**IgM  $\kappa$  / IgM  $\lambda$**   
**IgA  $\kappa$  / IgA  $\lambda$**
- **Prediktivní marker při posuzování vývoje monoklonální gamapatie nejasného významu (benigní)**

# Další proteiny - sérum

<b>transferin</b>	2,0 - 3,6 g/l	imunoturbidimetrie	↑ = nedostatek železa v organismu ( ↓ = přebytek železa v organismu porucha proteosyntézy v játrech, akutní zátěž organismu
<b>prealbumin</b>	0,2 - 0,4 g/l	imunoturbidimetrie	↓ porucha proteosyntézy v játrech u těžkých hepatopatií nebo proteinové malnutrice
<b>haptoglobin</b>	2,0 - 3,6 g/l	imunoturbidimetrie	↑ = akutní stavy ↓ = poruchy proteosyntézy v játrech, intravaskulární hemolýza
<b>orosomukoid</b>	0,25 - 4,0 g/l	imunoturbidimetrie	↑ = akutní stavy ↓ = porucha proteosyntézy v játrech
<b>Alfa2- makroglobulin</b>	2 – 3,5 g/l	imunoturbidimetrie	↑ = nefrotický syndrom, chronické hepatopatie, v dětském věku ↓ = akutní pankreatitida

<b>alfa 1-antitrypsin</b>	0,9 - 2,0 g/l	imunoturbidimetrie	↑= akutní záněty a akutní závažné stavy, těhotenství ↓= těžké hepatopatie, dědičný defekt tvorby API
<b>ceruloplasmin</b>	0,22 - 0,6 g/l	imunonefelometrie	↑= postupný nárůst v těhotenství ↓= genetická porucha způsobující nedostatečnou tvorbu ceruloplasminu, (Wilsonova choroba)
<b>C3</b>	0,9 - 1,8 g/l	imunoturbidimetrie	↑ = akutní zátěž ↓= tvorba imunokomplexů (např. autoimunitní choroby)
<b>C4</b>	0,1 - 0,4 g/l	imunoturbidimetrie	
<b>Cystatin C</b>	0,63–1,44 mg/l	imunoturbidimetrie	↑fce ledvin
<b>CRP</b>	0,0 – 5,0 mg/l	imunoturbidimetrie	↑= akutní zánět, akutní stavy
<b>prokalcitonin</b>	0,0 – 0,5 ug/l	chemiluminiscence	↑ sepse

# Další proteiny - moč

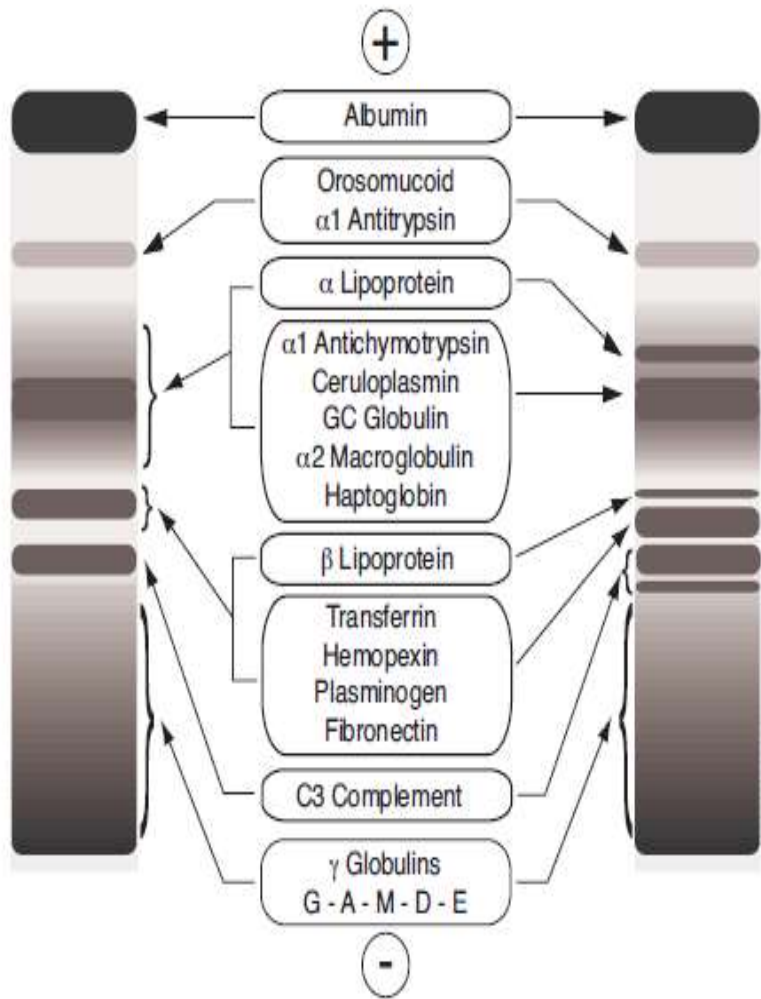
<b>transferin</b>	0,2 – 1,2 mg/l	imunonefelometrie	pro hodnocení proteinurie
<b>Alfa2- makroglobulin</b>	< 7 mg/g kreatininu	imunonefelometrie	
<b>Alfa 1 - mikroglobulon</b>	2 – 12 mg/l	imunonefelometrie	
<b>kvalitativní analýza</b>		elektroforéza	

# Další proteiny - CSF

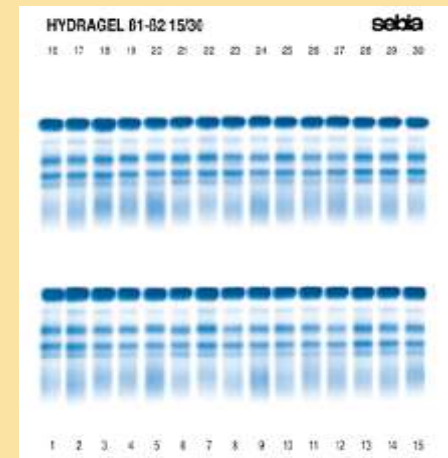
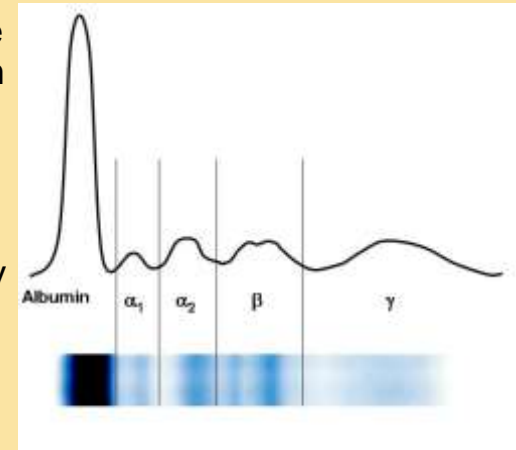
<b>transferin</b>	7-22 mg/l	imunonefelometrie	Zánětlivý marker
<b>prealbumin</b>	12- 27 mg/l	imunonefelometrie	
<b>t -protein</b>		ELISA	diagnostika demence x Alzheimerovi choroby
<b>Beta -amyloid</b>		ELISA	
<b>S-100</b>		chemiluminiscence	Tumormarker
<b>CEA</b>		chemiluminiscence	
<b>B2- mikroglobulin</b>		imunoturbidimetrie	
<b>Volné lehké řetězce kappa</b>		imunoturbidimetrie, imunonefelometrie	



# Elektroforéza bílkovin krevního séra - Gelová elektroforéza – SPE



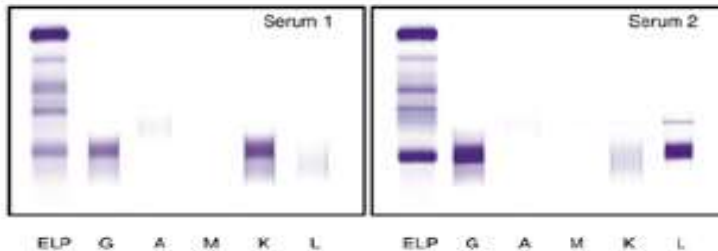
- Každá zóna obsahuje jeden a více sérových proteinů.
- Nejvíce anodicky putuje albumin, následují  $\alpha_1$ -globuliny,  $\alpha_2$ -globuliny,  $\beta_1$ -globuliny,  $\beta_2$ -globuliny a gamaglobuliny.
- Šířka proteinového bandu frakce závisí na počtu proteinů, které jsou ve frakci přítomny.



# Gelová elektroforéza – SPE + imunofixace

HYDRAGEL 2 IF

sebia



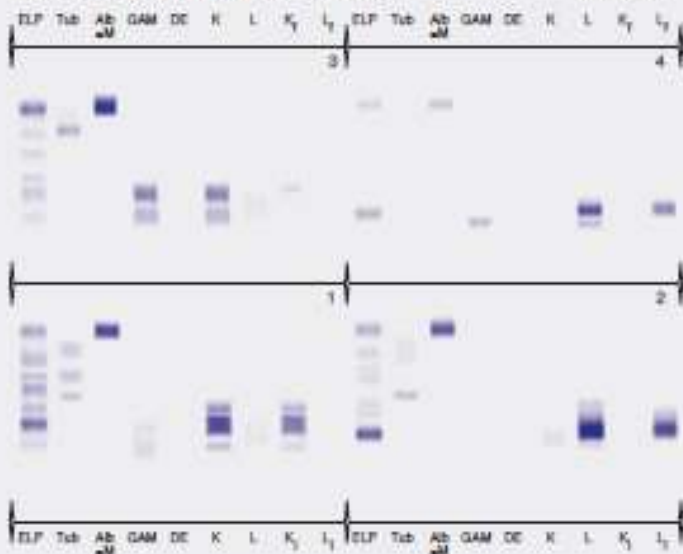
Provádí se ve čtyřech krocích:

1. Separace proteinů elektroforézou na agarózovém gelu.
2. Imunofixace (imunoprecipitace) proteinů rozdělených elektroforézou – příslušné migrační stopy jsou překryty jednotlivými antiséry. Antiséra difundují do gelu a precipitují přítomné antigeny. Proteiny v referenční stopě jsou fixovány fixačním roztokem.
3. Neprecipitované, rozpustné proteiny jsou z gelu odstraněny odsátím a promytím. Komplex antigen-protilátka zůstává v gelové matrix.
4. Precipitované proteiny jsou vizualizovány obarvením.

- Elektroforetické dělení vzorku probíhá simultánně v šesti stopách. Po elektroforéze – první stopa (ELP) slouží jako referenční. Zbývajících 5 stop je použito k nanesení specifických antisér – proti těžkým řetězcům (G, A, M) a anti-kappa a anti-lambda volným a vázaným lehkým řetězcům.
- Imunofixační proužky jsou porovnány s odpovídajícími frakcemi referenčního vzorku – odpovídající proužek by měl mít stejnou migrační pozici.

HYDRAGEL URINE PROFIL(E) 2/4

sebia



- **Elektroforeogram bílkovin moče je podobný rozdělení bílkovin v séru** - intenzita frakcí závisí na filtrační schopnosti ledvin.
- K analýze používáme **zahuštěné nebo nezahuštěné vzorky moče**.
- Poskytuje kvalitativní pohled na proteinurii, užitečné informace při diagnostikování selhání ledvin, identifikace hlavních bílkovin v moči pomáhá přesně určit typ poškození ledvin (tubulární, glomerulární nebo smíšený)
- Dále pomáhá při identifikaci monoklonálních gamapatií (Bence Jonesovy bílkoviny)

# Elektroforéza/izoelektrofokuzace mozkomíšního moku

## Izoelektrická fokuzace:

metoda zahrnuje izoelektrofokusaci na agarózovém gelu, následovanou immunofixací s anti-Ig G antisérem.

Vzorky CSF a séra od téhož pacienta jsou pak vizuálně porovnány.

Citlivost metody dovoluje analýzu CSF bez předchozího zahušťování

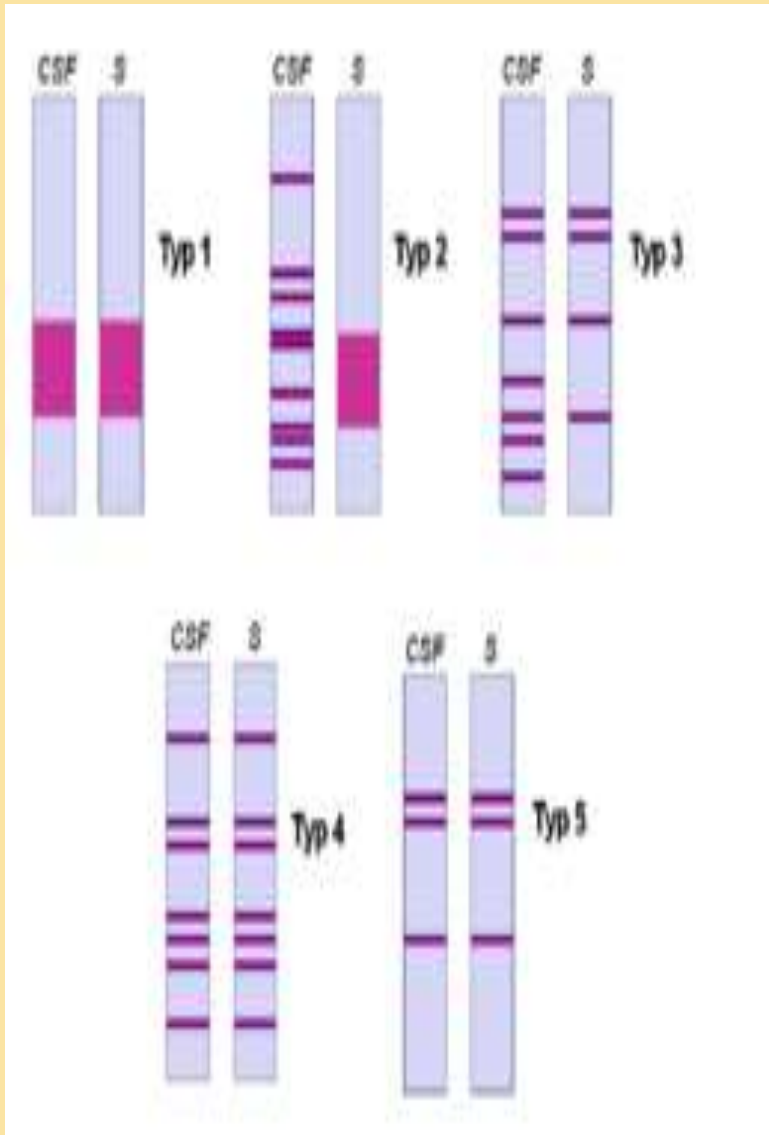
## Test se provádí ve dvou stupních:

1. Izoelektrofokusace na agarózovém gelu k rozdělení proteinů ve vzorcích CSF a séra.
2. Immunofixace s anti-IgG antisérem značeným enzymem (peroxidázou) určeným k detekci IgG oligoklonálních proužků
3. Srovnává se přítomnost či nepřítomnost identických pruhů IgG v séru a moku; počet a lokalizace proužků nemá diferenciálně diagnostický význam.

K potvrzení intratékální syntézy Ig je nutno analyzovat sérum a mozkomíšní mok paralelně ve stejných koncentracích, aby byl demonstrován rozdíl v distribuci IgG.



- Fyziologicky mají imunoglobuliny v séru i mozkomíšním moku polyklonální charakter a vyjadřují heterogenitu individuálních protilátek produkovaných jako odpověď na nejrůznější antigeny, s nimiž se jedinec setkal.
- Intratékálně produkované protilátky se vyznačují pouze omezenou (oligoklonální) heterogenitou, což se při izoelektrické fokusaci projeví jako izolované proužky, které nejsou patrné při analýze séra.



## Základní typy :

- **Typ 1** – v séru i v moku pouze polyklonální IgG – normální nález;
- **Typ 2** – oligoklonální proužky pouze v likvoru – lokální syntéza IgG (např. u roztroušené sklerózy);
- **Typ 3** – oligoklonální proužky v likvoru a další oligoklonální proužky v likvoru i v séru – lokální syntéza IgG a produkce protilátek v organismu (např. chronická infekce CNS);
- **Typ 4** – identické oligoklonální proužky v séru i moku (tzv. „zrcadlový“ obraz proužků v séru a v likvoru – dochází k průniku protilátek z krve do likvoru) – systémová imunitní aktivace bez lokální syntézy IgG v CNS;
- **Typ 5** – identické monoklonální proužky v séru i moku v krátkém úseku pH gradientu, jde o přítomnost monoklonálního paraproteinu v likvoru sérového původu (myelom, monoklonální gamapatie)

**Děkuji za pozornost.**