

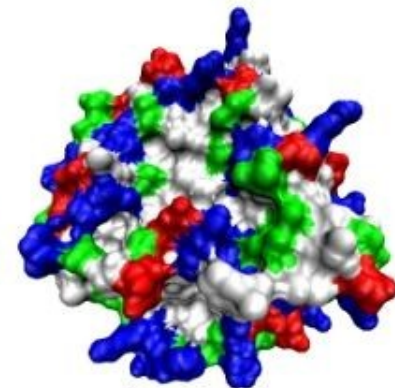
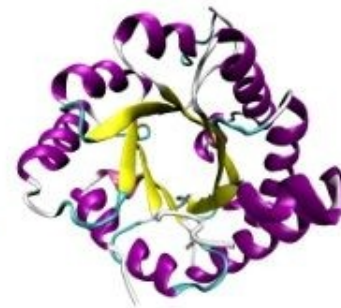
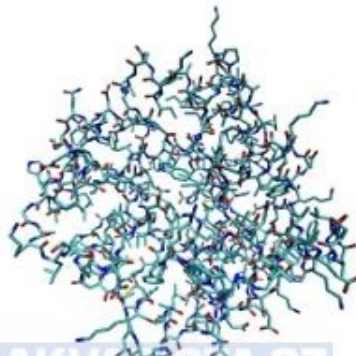
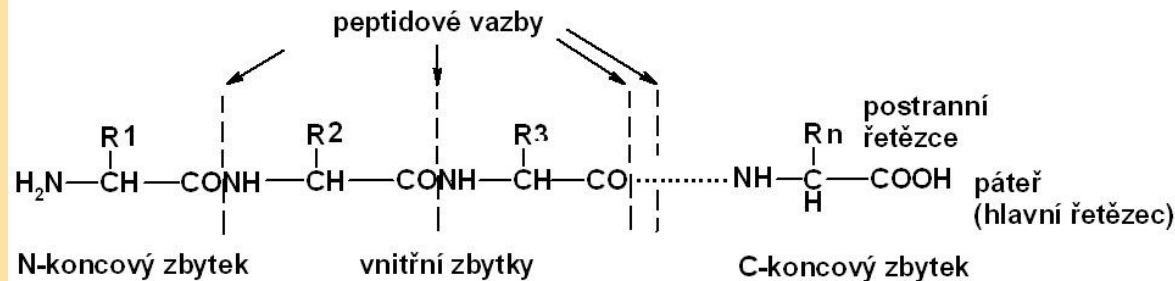
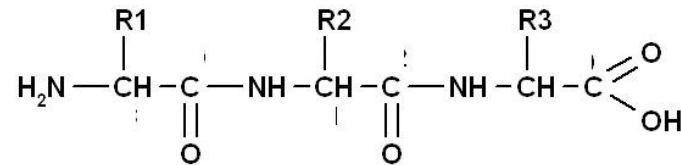
Bílkoviny

Mgr. Michaela Pospíšilová

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

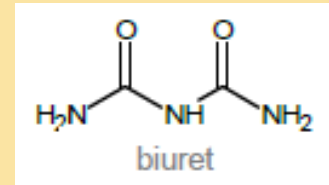
Celková bílkovina - stanovení

- 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

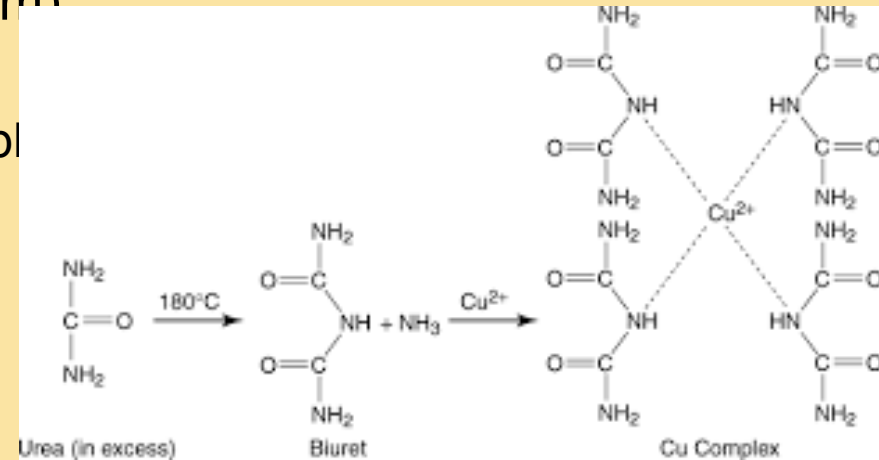
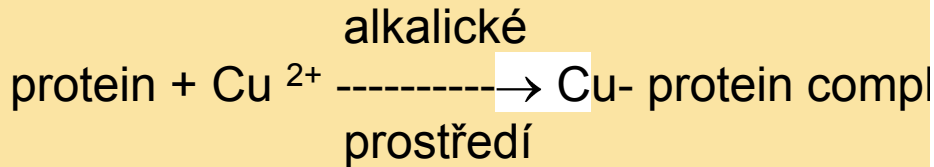
Metody stanovení:

- 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):

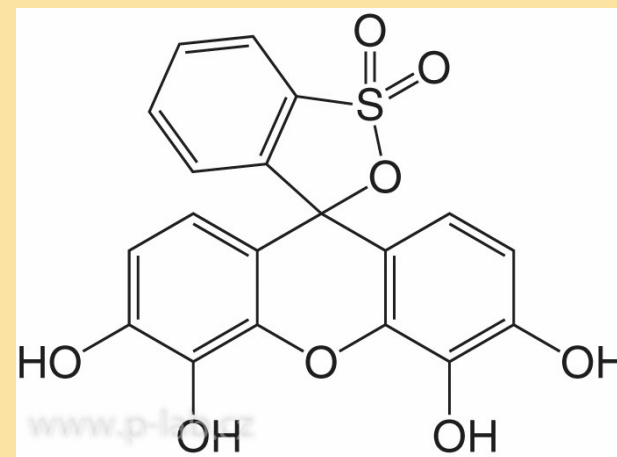
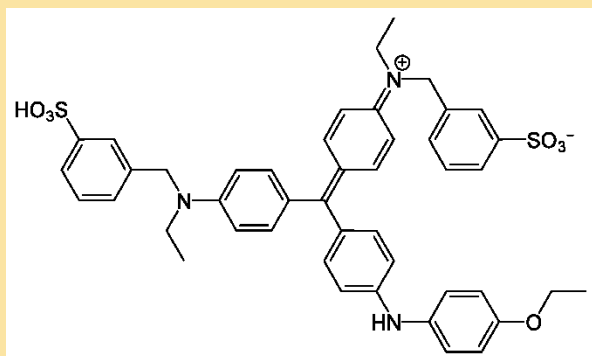


- Komplex vhodný k fotometrickému stanovení při 540 – 550 nm
- Detekční limit: kolem 2 g/l
- Biuretová reagensie dále obsahuje:
 - **tartarát sodno-draselný** - ke komplexaci měďnatých iontů a zabránění vysrážení hydroxidu měďnatého
 - **jodid draselný** - antioxidant - zabraňuje autoredukci mědi
- Aminokyseliny 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

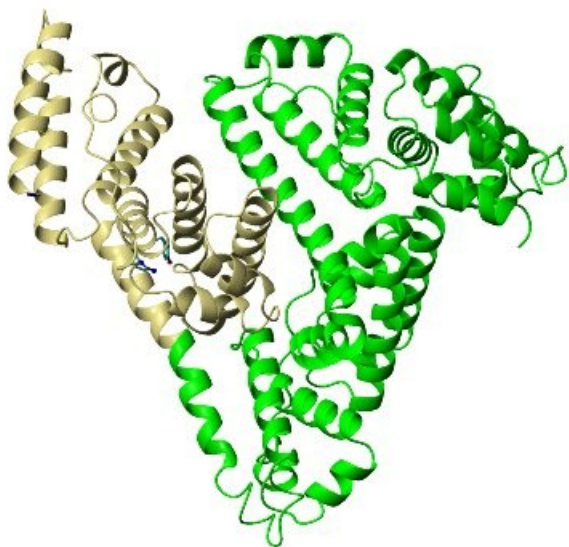
Albumin

- *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 hematolikvorovou bariéru => slouží k hodnocení funkčního stavu hematolikvorové bariéry)

Albumin - stanovení

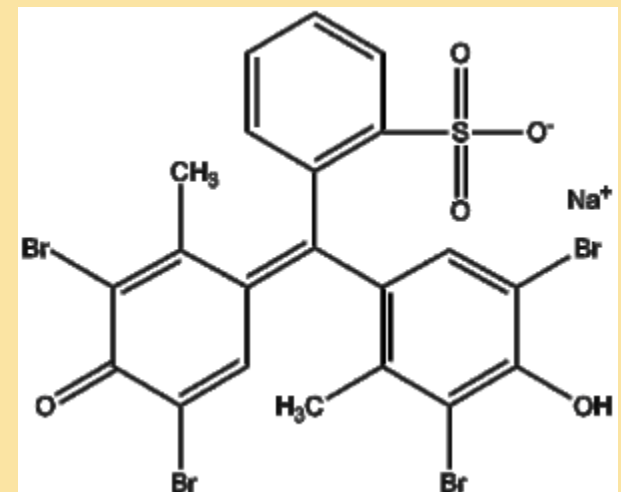
- Sérum:
 - Stanovení s bromkresolovou zelení (BCG)
 - Stanovení s bromkresolovým purpurem (BCP)
- Moč:
 - Imunoturbidimetrie
 - Immunonefelometrie
- Likvor:
 - Immunonefelometrie

Albumin v séru

- Ve slabě kyselém prostředí se albumin chová jako kation
- Stanovení založeno na reakci s aniontovým barvivem většinou se skupinou – SO_3H
- 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

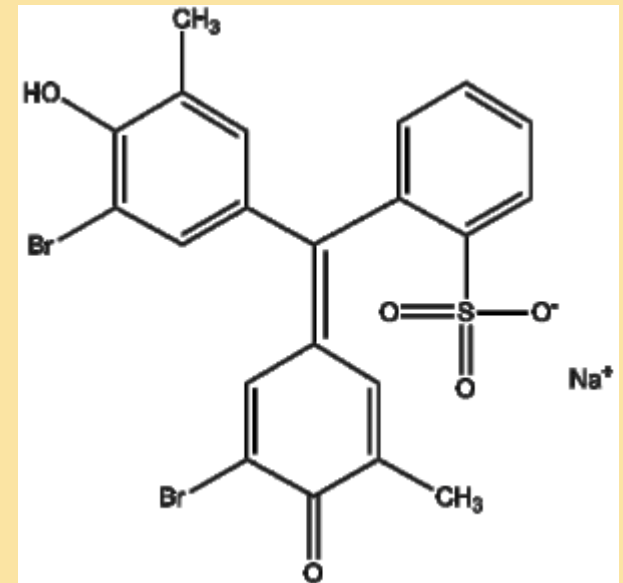
Stanovení albuminu s bromkresolovou zelení (BCG) v séru a plasmě

- 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 imunoturbidimetry (imunonefelometry)
- v **likvoru** pouze imunonefelometry (dostatečná citlivost, hodnoty v mg/l)

Referenční meze v S/P pro dospělé:

Referenční meze v CSF pro dospělé:

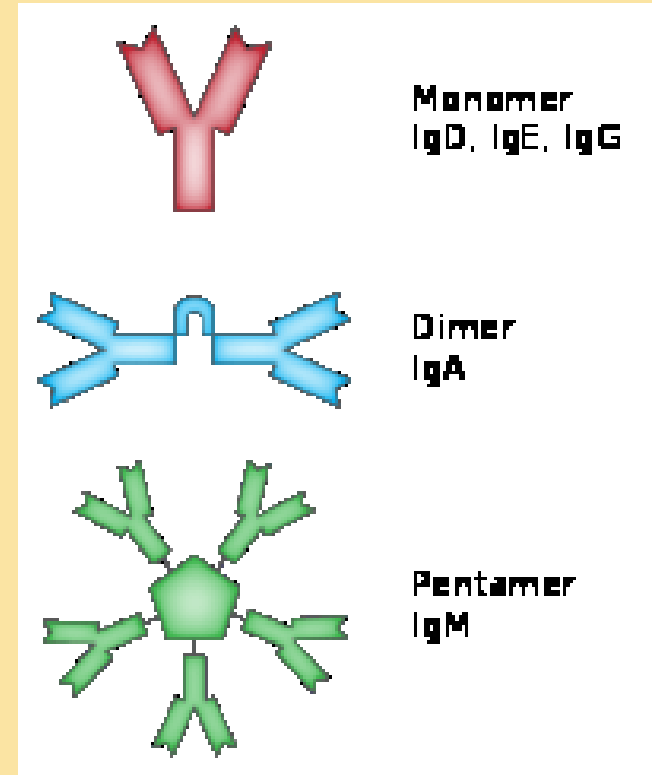
IgG – 7 - 16 g/l
IgA – 0,7 - 4,0 g/l
IgM – 0,4 - 2,3 g/l

IgG – 10-40 mg/l
IgA - ≤ 1,1 mg/l
IgM - ≤ 5,0 mg/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



Imunoglobuliny D a E

Imunoglobuliny D a E v séru

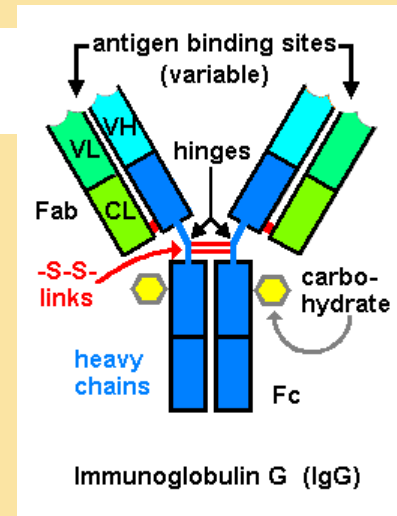
- Vyžadují ke stanovení ještě citlivější analytické metody
- Obvykle se využívají imunoanalyzátory na principu chemiluminiscence

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, λ a κ) - **imunofixace**

Volné lehké řetězce κ a λ

- 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

Další proteiny - sérum

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

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

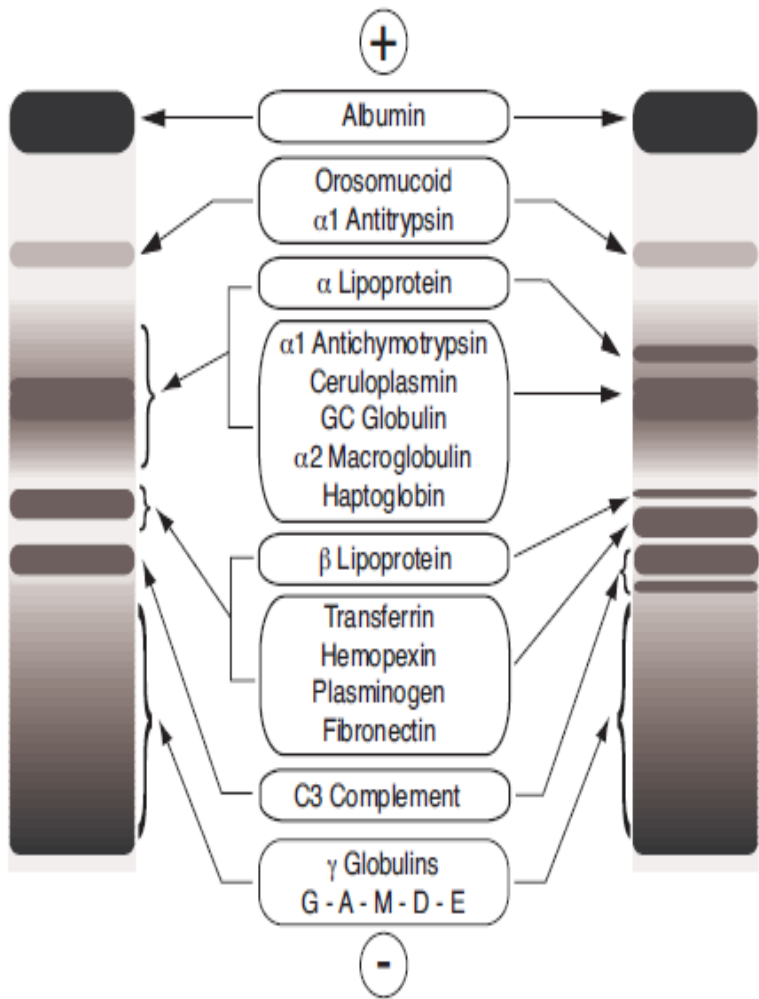
Další proteiny - moč

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

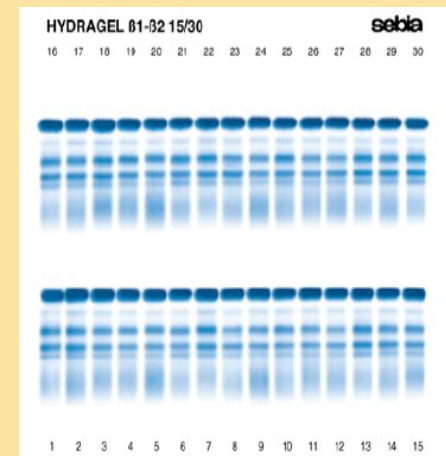
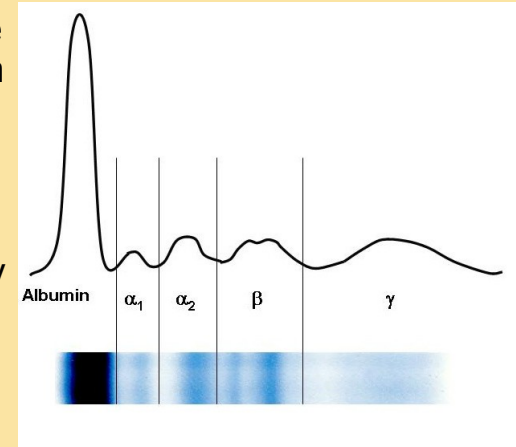
Další proteiny - CSF

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

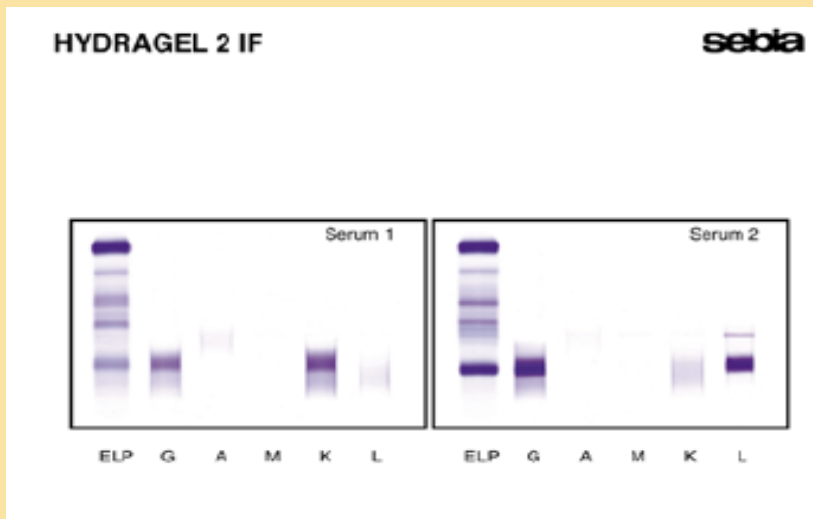
Elektroforéza bílkovin krevního séra - Gelová elektroforéza – SPE



- Každá zóna obsahuje jeden a více sérových proteinů.
- Nejvíce anodicky putuje albumin, následují α_1 -globuliny, α_2 -globuliny, β_1 -globuliny, β_2 -globuliny a gamaglobuliny.
- Šířka proteinového bandu frakce závisí na počtu proteinů, které jsou ve frakci přítomny.



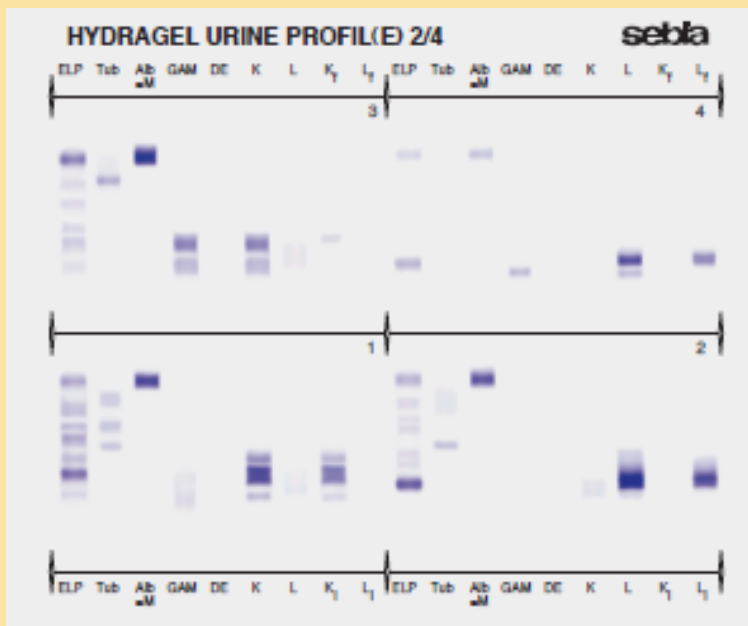
Gelová elektroforéza – SPE + imunofixace



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.



- **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

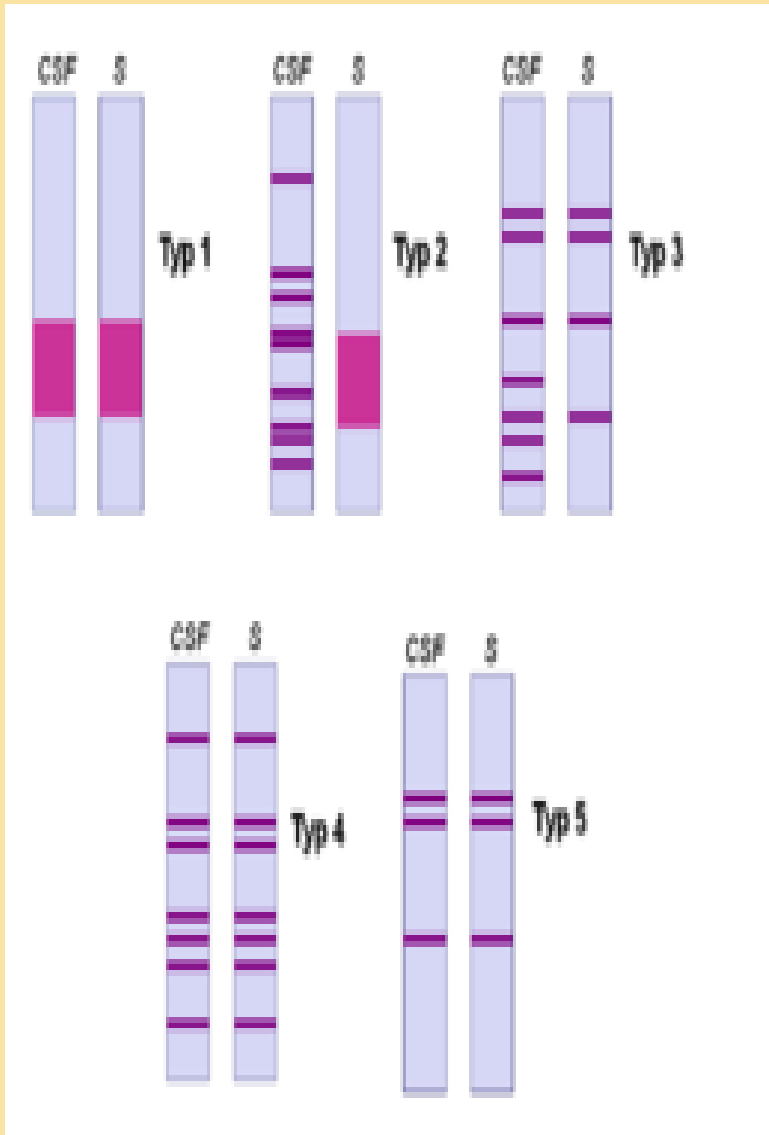
Test se provádí ve dvou stupních:

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)