Datum:	Jméno: Skupina:

CVIČENÍ 7: Vyšetření bílkovin v krevním séru

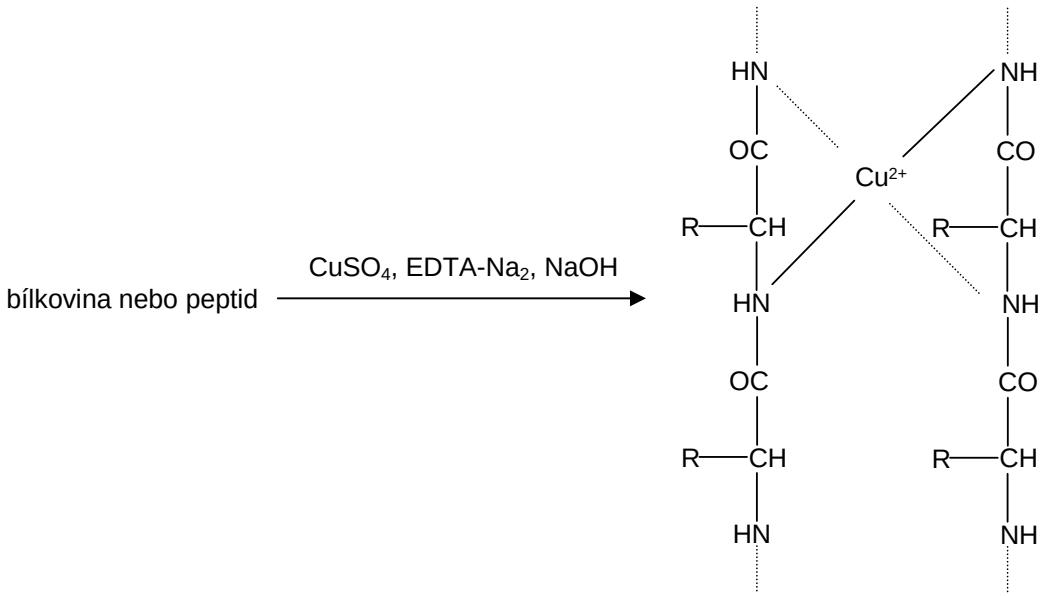
Úvod

Plazmatických bílkovin je několik desítek a s výjimkou imunoglobulinů je většina syntetizována v játrech.
Klasifikace plazmatických bílkovin dle funkce:

- bílkoviny s transportní funkcí
- bílkoviny bránící infekci
- bílkoviny zapojené do srážení krve a fibrinolýzy
- enzymy a jejich inhibitory
- bílkoviny chránící před účinkem volných radikálů
- další bílkoviny

Všechny bílkoviny v plazmě kromě toho udržují koloidně-osmotický tlak, acidobazickou rovnováhu a představují pohotovou proteinovou rezervu.

7.1 Stanovení celkových proteinů v séru biuretovou reakcí*



červenofialový komplex

Provedení (viz skripta)

Výpočet hmotnostní koncentrace proteinů v krevním séru: $\rho_x = \frac{A_x}{A_{STD}} * \rho_{STD}$

* biuretová reakce = reakce peptidů a bílkovin (látek se 2 a více peptidovými vazbami) s ionty Cu^{2+} v alkalickém prostředí za vzniku červenofialového komplexu

A_x.....absorbance vzorku při 545 nm (bezrozměrné číslo)
A_{STD}..... absorbance standardu při 545 nm (bezrozměrné číslo)
ρ_x..... hmotnostní koncentrace proteinů ve vzorku (g l^{-1})
ρ_{STD}..... hmotnostní koncentrace proteinů v kalibračním roztoku (g l^{-1})

Výsledky:

Hodnocení vypočtených výsledků (viz pravidla níže):

Hodnocení

Porovnání výsledků s referenčním intervalem koncentrace celkových proteinů v krevním séru 65 - 85 g l^{-1}.
Hypoproteinemie - porucha proteosyntézy u jaterních chorob, podvýživa, těžké akutní infekční choroby, rozsáhlá nádorová onemocnění, nadměrné ztráty albuminu exsudátem nebo močí; relativní pokles při zředění plazmy (objemné infuze, zástava vylučovací činnosti ledvin)
Hyperproteinemie - méně časté, nejčastěji způsobena dehydratací (dlouhodobé žíznění, vysilující průjmy, zvracení), další příčinou je zvýšená syntéza imunoglobulinů (chronické záněty, gamapatie)
Pro detailnější vyšetření se stanovení celkových proteinů doplňuje podrobnou analýzou jednotlivých frakcí proteinů (viz úloha 7.3).

7.2 Stanovení albuminu v séru

Provedení i hodnocení, viz CVIČENÍ 5: Vybraná vyšetření u onemocnění jater II - žlučová barviva a albumin, úloha 5.4.

7.3 Elektroforéza proteinů

Provedení (viz skripta)

Dělení proteinů na agarózovém gelu.
Elektroforetický pufr (Tris-barbitalový) je zásaditý (pH = 8,6) ⇒ proteiny jsou záporně nabité a proto putují k anodě.
Detekce (barvení) roztokem amidočerně.

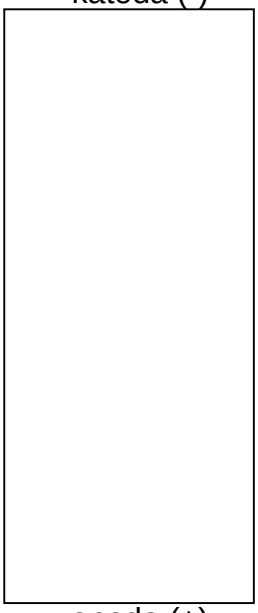
Hodnocení elektroforeogramu

Denzitometricky při 570 nm - určí se podíl integrované absorbance jednotlivých frakcí proteinů z celkové absorbance separovaného vzorku. Vizuálně - orientační hodnocení.

Pořadí jednotlivých frakcí podle klesající pohyblivosti (5 základních frakcí):

proteinová frakce	charakteristika	**referenční rozmezí**	**příklady**
albumin	výrazný pás v čele	0,52-0,70	prealbumin, albumin
α_1-globuliny	nevýrazný úzký pás	0,02-0,05	α_1-glykoprotein, α_1-antitrypsin
α_2-globuliny	difúzní pás	0,05-0,10	ceruloplasmin, haptoglobin
β-globuliny	často rozděleny na β_1 a β_2	0,06-0,13	transferrin, fibrinogen
γ-globuliny	velmi široký pás	0,10-0,19	imunoglobuliny

katoda (-)



anoda (+)

Obkresli do protokolu elektroforeogram. Označ jednotlivé frakce proteinů a a vizuálně zhodnoť jejich zastoupení (označ N, ↑, ↓).

Ke studiu: charakteristické změny ve spektru sérových proteinů u některých patologických stavů
↑ **α1, α2, β-globuliny** - ranná fáze akutních zánětlivých onemocnění (↑ reaktantů akutní fáze)
↑ **γ-globuliny a** ↓ **albumin** - pozdější fáze akutních zánětlivých onemocnění, chronické záněty

Další onemocnění spojená s výraznými změnami spektra proteinů: nefrotický syndrom, některé maligní tumory, mnohočetný myelom a jiné monoklonální gamapatie.

Podrobnější dělení základních elektroforetických frakcí umožňují imunoelektroforetické metody.

7.4 Důkaz C-reaktivního proteinu v séru aglutinačním testem

Plazmatický C-reaktivní protein (CRP) má název podle vazby na polysacharidový obal pneumokoků C. Účastní se nespecifické imunitní odpovědi v počáteční fázi po penetraci antigenů do organismu a stimuluje fagocytózu. CRP je dominující bílkovina

akutní fáze s rychlou odpovědí (začíná po 6 h, max. za 48 h). Její koncentrace významně stoupá při zánětlivé reakci a při maligním nádorovém bujení. K průkazu se používá **latexový aglutinační test**.

Princip latexových aglutinačních testů:
latexové částice potažené specifickou protilátkou + antigen (protein) → aglutinát (viditelný shluk)

Vznik aglutinátu - pozitivní výsledek.
Žádná aglutinace - negativní výsledek.

Při pozitivním výsledku je možné postupným ředěním séra (titrace séra) získat i semikvantitativní výsledek.
Kromě CRP se latexovým aglutinačním testem stanovuje revmatoidní faktor a anti-streptolysin O.

Provedení (viz skripta)

Výsledek a hodnocení (viz pravidla níže):

Hodnocení

Fyziologická koncentrace CRP ≤ 6 mg l^{-1}, pokud je ≥ 6 dojde k aglutinaci.
↑ CRP - řada zánětlivých onemocnění a onemocnění spojených s rozpadem tkáně.
CRP má u zánětu nejrychlejší a největší nárůst ve srovnání s ostatními bílkovinami.

Diferenciální diagnostika:
Výrazný, časný nárůst CRP - bakteriální zánět (↑ CRP několik h před ↑ sedimentace).
Malý nárůst CRP - virový zánět.

Praxe: rozhodnutí o nasazení antibiotické léčby, hodnocení efektivity léčby. Ke stanovení CRP se používá např. přístroj CRP QUICK Read firmy Orion Diagnostika.

7.5 Stanovení IgE v séru metodou ELISA

Imunoglobuliny třídy E (IgE) jsou vychytávány na buněčný povrch, zejména na receptory žírných buněk a cirkulujících bazofilů, proto je jejich plazmatická koncentrace normálně velmi nízká. ↑ IgE je spojeno s alergickými projevy. Pokud antigen (alergen) přemostí dvě molekuly IgE na povrchu žírné buňky, dojde k její

degranulaci, uvolnění mediátorů (např. histaminu a bradykininu) a navození anafylaktické reakce. Ke stanovení IgE je použita metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) - heterogenní enzymová imunoanalýza, kdy koncentrace antigenu se stanovuje pomocí enzymové aktivity imunokomplexu vázaného na pevnou fázi.

Princip „sendvičového uspořádání“ metody ELISA (přímá nekompetitivní ELISA)

Molekula IgE (antigenu) v testovaném vzorku (séru) se váže mezi protilátku proti IgE (anti-IgE), která je zakotvena na povrchu jamky a druhou protilátku proti IgE, která je označena křenovou peroxidázou (anti-IgE konjugát). Detekuje se peroxidázová aktivita imunokomplexu, která je úměrná koncentraci IgE ve vzorku séra. Jako chromogen peroxidázové reakce se používá tetramethylbenzidin (TMB) a jako substrát peroxid vodíku. (Rovnice chemické reakce, viz CVIČENÍ 2: Vyšetření metabolismu lipidů a cholesterolu, úloha 2.2.) Vzniká modrý produkt, jehož zbarvení se změní na žluté po zastavení enzymové reakce přídavkem kyseliny HCl. Intenzita žlutého zbarvení se hodnotí spektrofotometricky při 450 nm v destičkovém „readeru“ nebo pouze vizuálně (semikvantitativně). Koncentrace bílkoviny se odečte z kalibračního grafu, který se sestrojí z naměřených hodnot pro standardy. (U bílkovin o velmi nízkých koncentracích se jejich koncentrace vyjadřuje na základě katalytické koncentrace vzniklého imunokomplexu v kat l^{-1} nebo IU l^{-1}.)

Provedení (viz skripta)

Výsledek a hodnocení (viz pravidla níže):

Hodnocení

Referenční rozmezí IgE v séru závisí na věku a pro dospělou zdravou populaci bez alergie je u této metody do 150 kU l^{-1}.

↑ IgE - parazitární infekce, atopie* (pouze průkaz atopie nikoli hodnocení její závažnosti podle hodnoty IgE)

↓ IgE - dlouhodobá steroidní terapie, choroby β-lymfocytů (např. chronická lymfocytární leukemie)

* atopie = dědičná tendence reagovat tvorbou protilátek IgE na obecné alergeny, projevuje se sklonem k alergii (přecitlivělosti na některé antigeny vnějšího prostředí); klinické projevy: astma, rinokonjunktivitida, syndrom alergického ekzému/dermatitidy

7.6 Stanovení ferritinu v séru metodou ELISA

Ferritin je zásobní protein pro železo v buňkách (především sleziny, kostní dřeně, jater a střevní sliznice). Mr≈440000 bez iontů Fe^{3+}. Apoferritin (neobsahuje Fe^{3+}) má 24 podjednotek uspořádaných sféricky s prostorem uvnitř pro železité ionty. Ferritin obsahuje přibližně 23 % železa. V plazmě je za normálních okolností jen malé množství ferritinu a jeho koncentrace odráží tkáňové zásoby železa.

Princip je stejný jako v úloze 7.5. Rozdíly: antigenem je ferritin, protilátky jsou anti-ferritin a anti-ferritin konjugát.

Provedení (viz skripta)

Výsledek a hodnocení (viz pravidla níže):

Hodnocení

Porovnání výsledku s referenčním intervalem ferritinu v séru pro danou metodu 30 - 220 $\mu g\ l^{-1}$ (muži), 24 - 160 $\mu g\ l^{-1}$ (ženy).

↓ ferritin - ↓ zásoby železa (hyposideremie), při anémii signalizuje sideropenickou anémii (z nedostatku železa)

↑ ferritin - řada nádorových onemocnění (nespecificky), tumorový marker pro sledování účinku terapie u Hodgkinovy choroby a melanomu

↑ ferritin - zánět (ferritin je bílkovinou akutní fáze)

Problémy související s tímto tématem

4 1. V ordinaci dětského lékaře je ošetřeno dítě (12 let) s následujícími potížemi – horečka, celková únava, silný kašel. Lze využít některých stanovení probíraných v tomto cvičení k možnosti rozhodnout, zdali dítěti nasadit antibiotika?

•

4 2. Které změny ve spektru sérových proteinů nastávají při chronických zánětlivých onemocněních?

•

•

4 3. Jaký nález ve spektru sérových proteinů lze očekávat při chronických hepatopatiích?

- ↓ albumin, ↑ γ-globuliny, ↓ α_1-globuliny, ↓ protrombin (Quickův test), ↓ cholinesteráza (ale při steatóze ↑), (při cholestáze ↑ α_2- a β- globuliny)

4 4. Uveďte, jaké změny (↑ zvýšené, ↓ snížené, N normální) v bílkovinném spektru lze předpokládat u pacienta s těžkým bronchiálním astmatem. (Uvažujte pouze z hlediska bílkovin probíraných v tomto cvičení).

-

- Další lab. diagnostika: častá eozinofilie, eozinofily ve sputu i v lavážní tekutině získané při bronchoskopii (bronchoalveolární laváž, BAL)

4 5. Mladá žena po porodu je bledá, trpí zvýšenou únavou a častými infekcemi, má potíže s udržením teploty. Krevní obraz svědčí pro anémii. Při stanovení hladiny ferritinu je zjištěna hodnota 15 $\mu g\ l^{-1}$. Co je příčinou anémie?

-