Bílkoviny krevního séra/plazmy

2022

David Zeman, ÚLM-OKB FN Brno
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 (dříve referenční)
2) Biuretová metoda (dnes referenční)

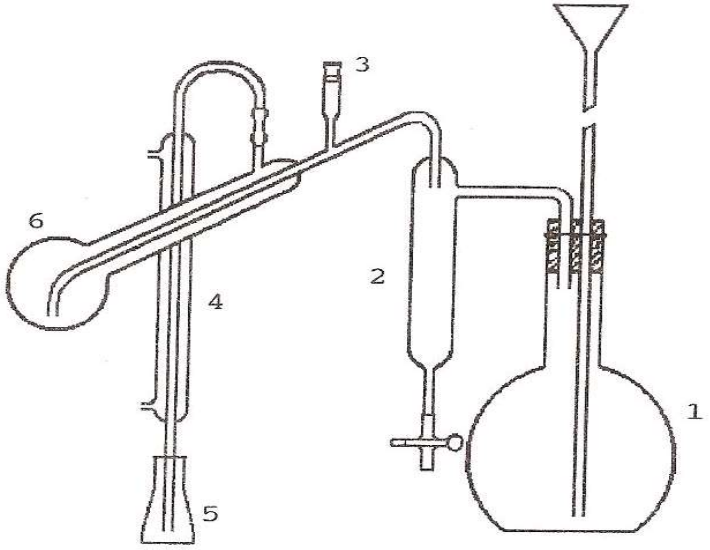
Stanovení nízkých koncentrací (moč, likvor):

1. Vazba barviva (Coomassie Brilliant Blue, pyrogallolová červeň/molybdenan)
2. Turbidimetricky (zákal reakcí s TCA, benzethonium-chloridem), popř. nefelometricky (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 acidimetricky)
- 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:
  $$\boldsymbol{organický}\ \boldsymbol{N} + \boldsymbol{H_2SO_4}$$
  $$\rightarrow\ \boldsymbol{(NH_4)_2SO_4} + \boldsymbol{H_2O} + \boldsymbol{CO_2} + \boldsymbol{H_2SO_4} + \boldsymbol{vedlejší\ produkty\ matrice}$$
- 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:
  $$\boldsymbol{(NH_4)_2SO_4 + NaOH \rightarrow 2NH_3 + Na_2SO_4 + 2H_2O + NaOH}$$
- 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:
  $$\boldsymbol{NH_3 + H_3BO_3 \rightarrow NH_4H_2BO_3 + H_3BO_3}$$

- 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):
  $$\boldsymbol{2NH_4H_2BO_3 + H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_2SO_4 + 2H_3BO_3}$$

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

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

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

T = titr titračního činidla (mol/L)

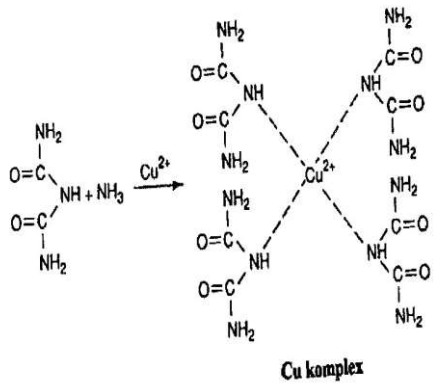
Faktory *0.14007* a *6.25* slouží k přepočtu titračního činidla na N (mg), resp. TP (g/L)

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

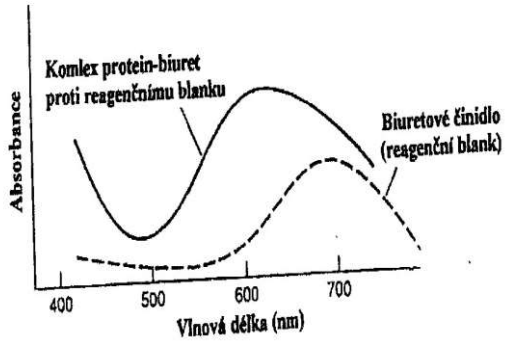
Biuretová reakce

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

- „Biuret“ vzniká ze dvou molekul močoviny zahřátím za uvolnění amoniaku; není to reagencie, 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 $Cu(OH)_2$), 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+fosfo-wolframovou kyselinou v ethanolu
- Koncentrace precipitovaných bílkovin centrifugací
- Rozpuštění bílkoviny a reakce s biuretovým činidlem

- **Folin-Lowryho metoda**
- Činidlo = fosfowolframová + fosfomolybdenová kyselina + alkalický roztok Cu
- Reakce s Tyr a Trp
- Produkce modrého zbarvení měřeného při 650 nm
- Detekční limit 5 – 10 mg/L

Turbidimetrické stanovení bílkovin reakcí s benzethonium chloridem

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

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

Stanovení bílkovin podle Bradforda (1976)

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

Marion Mckinley Bradford

(28. 10. 1946 – 3. 5. 2021)

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

Stanovení bílkovin metodou s pyrogallolovou červení a molybdenanem

- Při vazbě bílkovin na směs pyrogallolové červeně s molybdenanem za 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

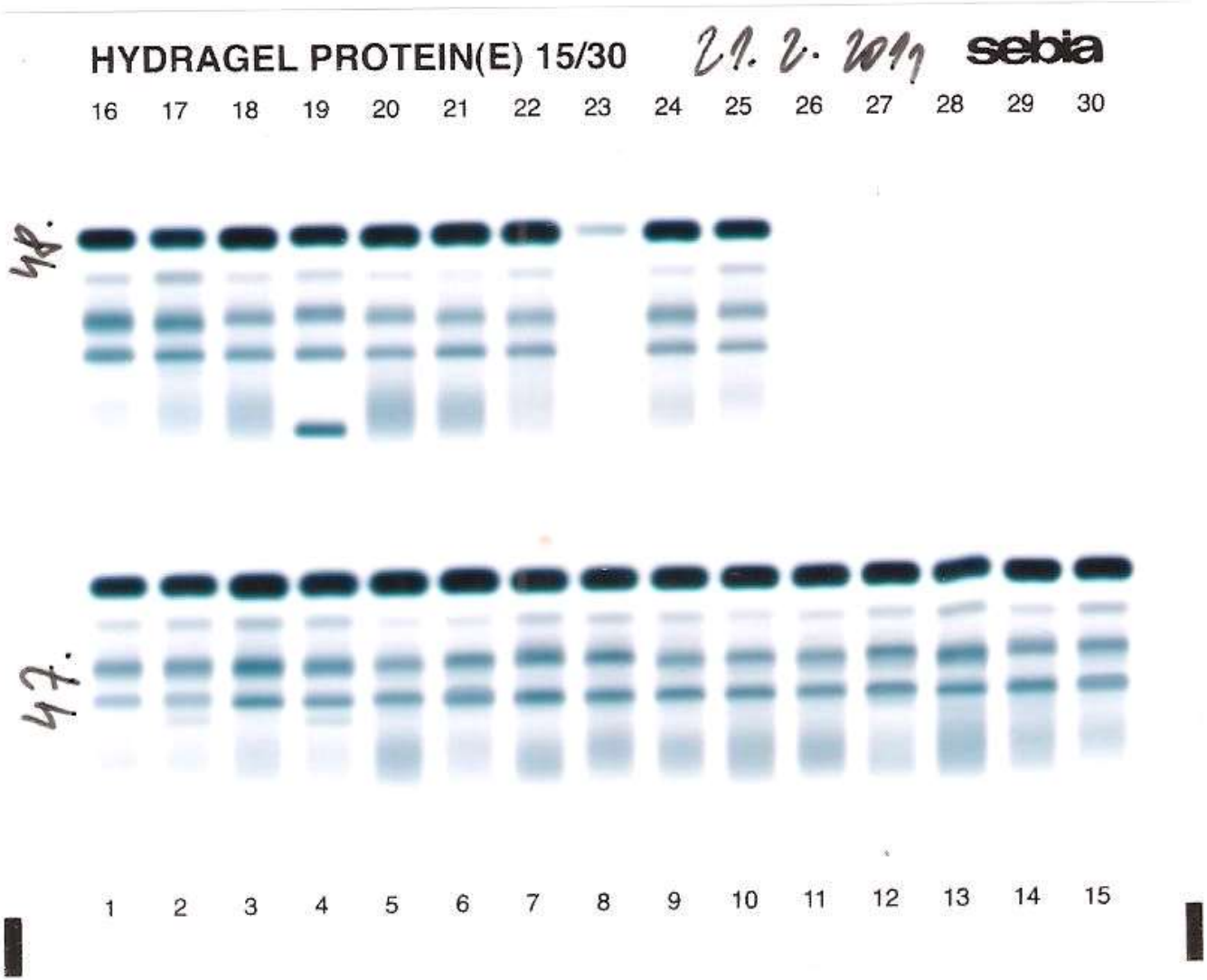
se provádí s cílem **zjistit abnormality bílkovin krevního séra**.

- 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:

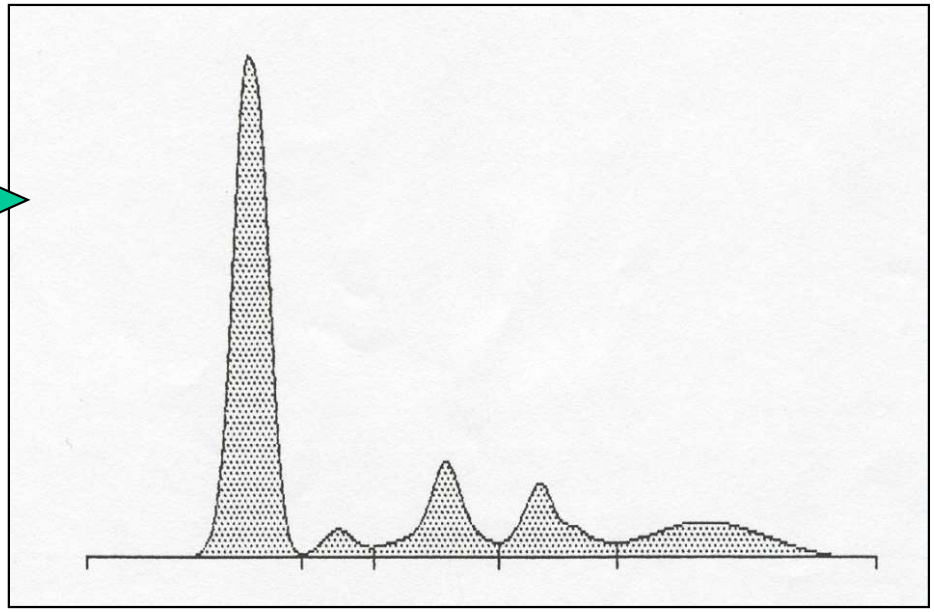
✦	Albumin	56 – 66 %
✦	α1 globuliny	2 – 3 %
✦	α2 globuliny	8 – 12 %
✦	β globuliny (β1, β 2)	7 – 10 %
✦	γ globuliny	10 – 18 %

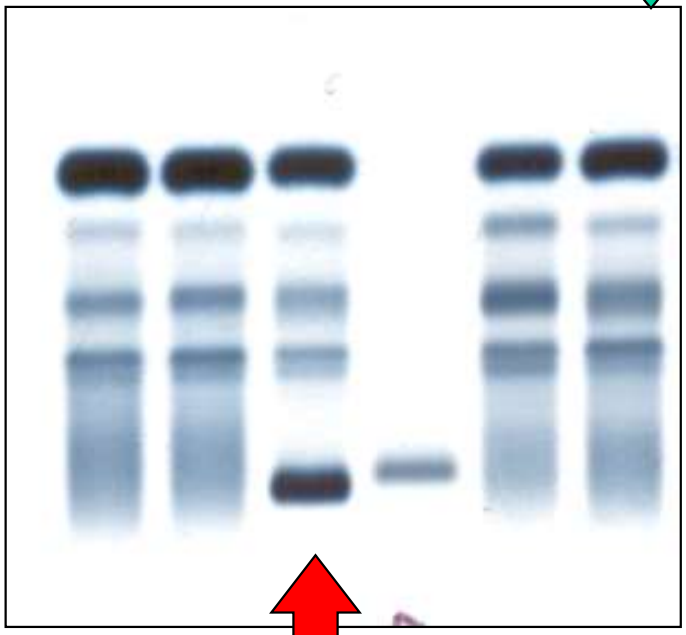
Elektroforeogramy

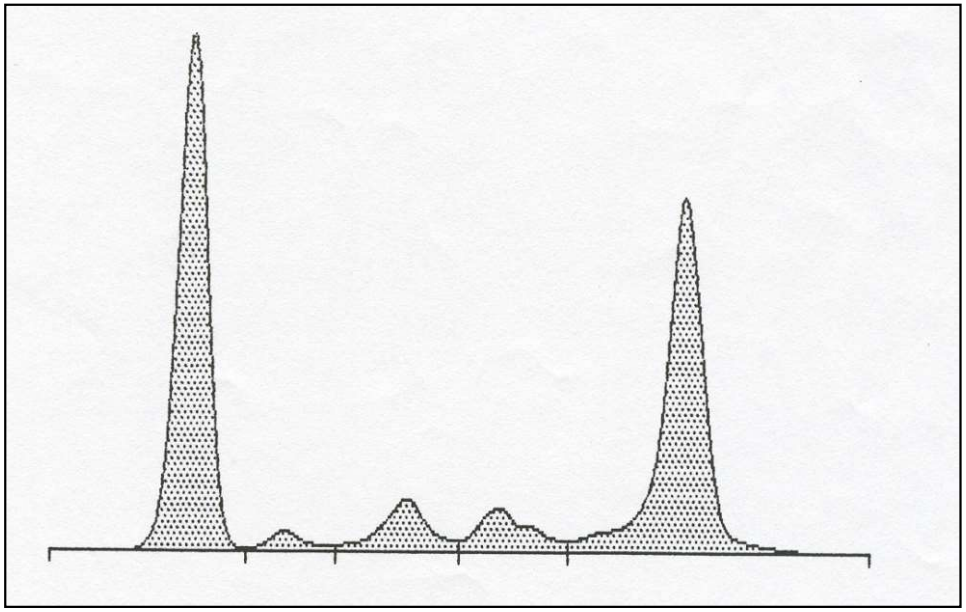


Denzitometrické vyhodnocení

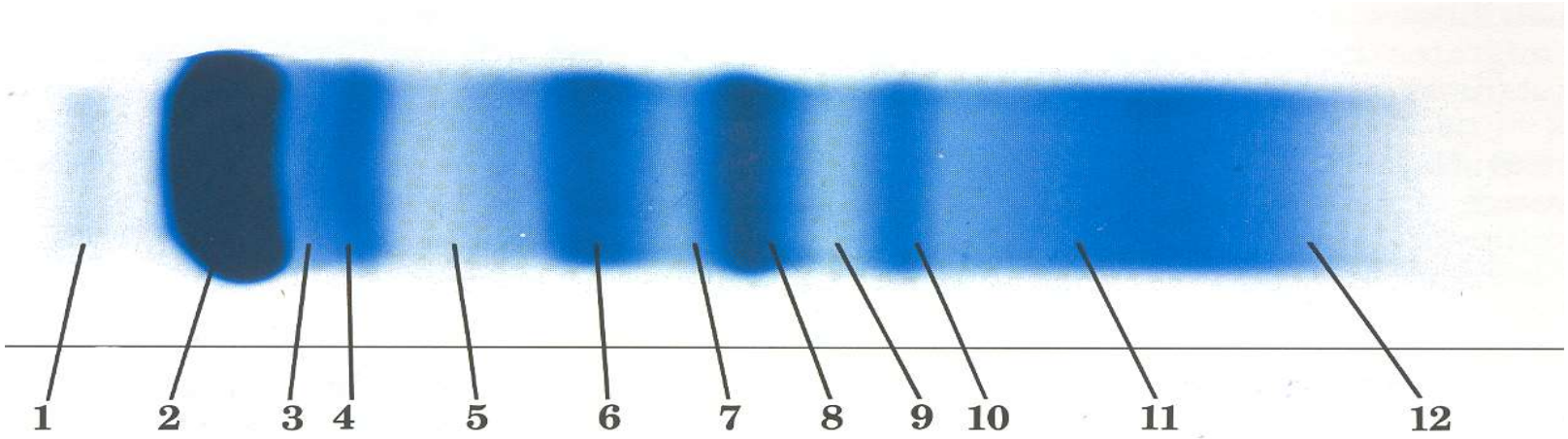
Normální nález







„M“ gradient



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

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

Stanovení jednotlivých plazmatických bílkovin

- V naprosté většině případů **reakce se specifickou protilátkou** (výjimky: albumin, fibrinogen, A1AT – lze i jiným způsobem)
- **Radiální imunodifúze (RID)** – precipitační metoda (d^2 precipitačního prstence je úměrná 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)

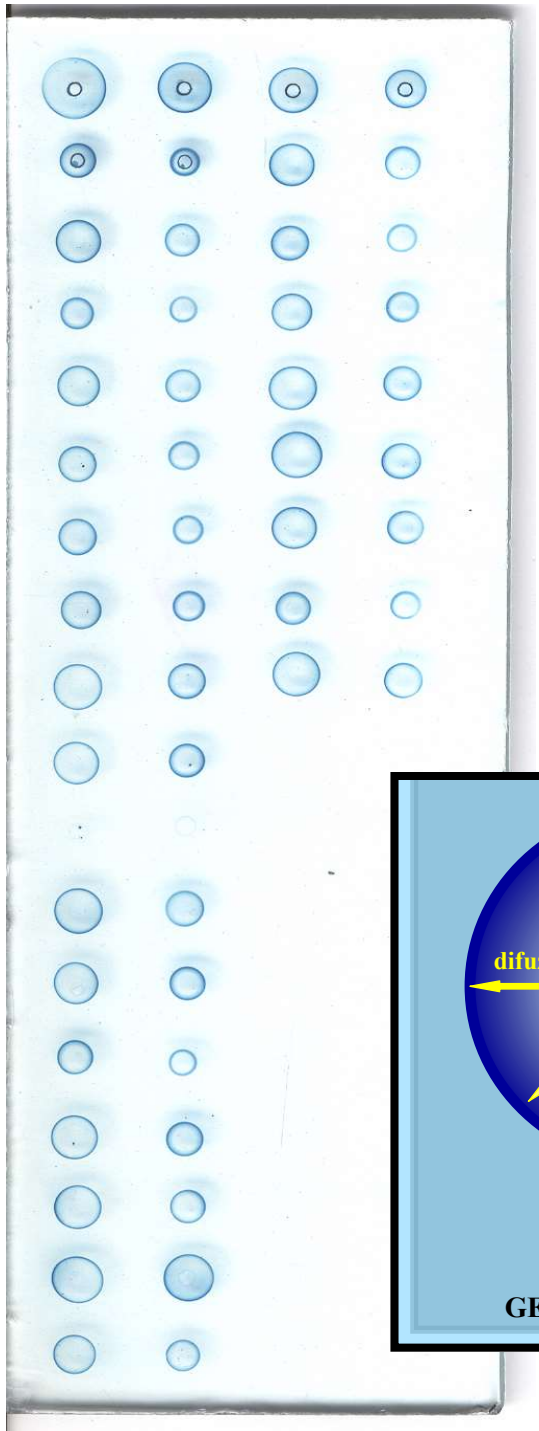
Kvantitativní stanovení: pro koncentrace nad 5 - 10 mg/L

A) Imunoprecipitační reakce v gelu (RID podle Manciniové)

B) Elektroimunostanovení (EID) podle Laurella

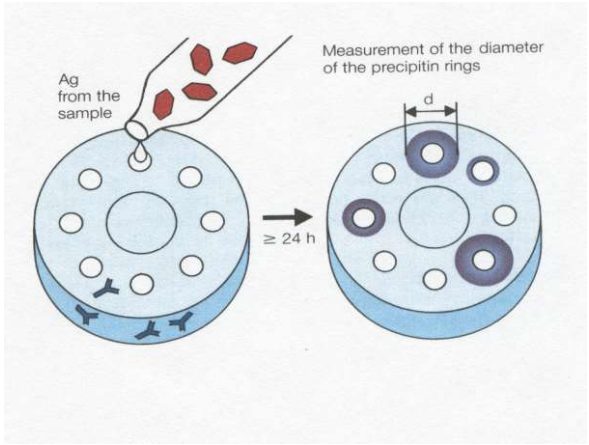
C) Imunoprecipitační reakce v roztoku (s turbidimetrickou nebo nefelometrickou detekcí)

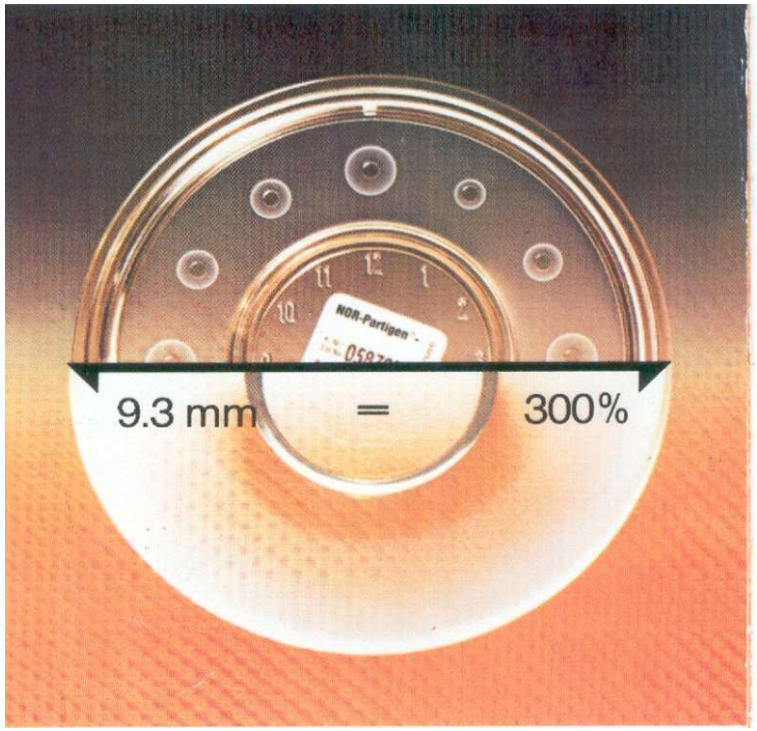
A) Imunochemická reakce v gelu

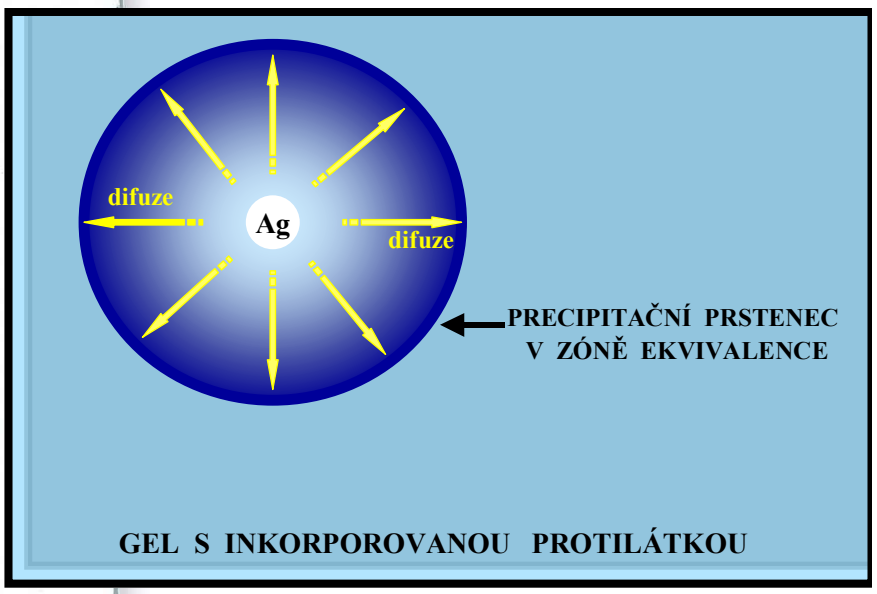


RID

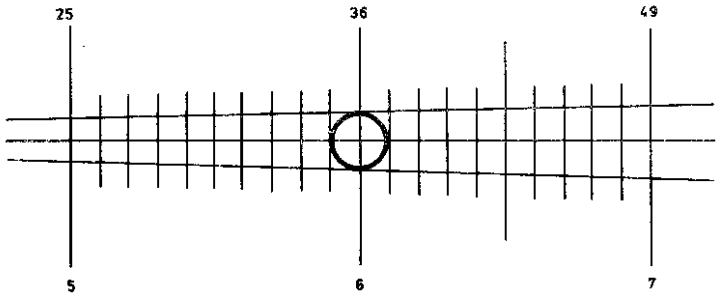
(Manciniová)







Kvantitativní měření

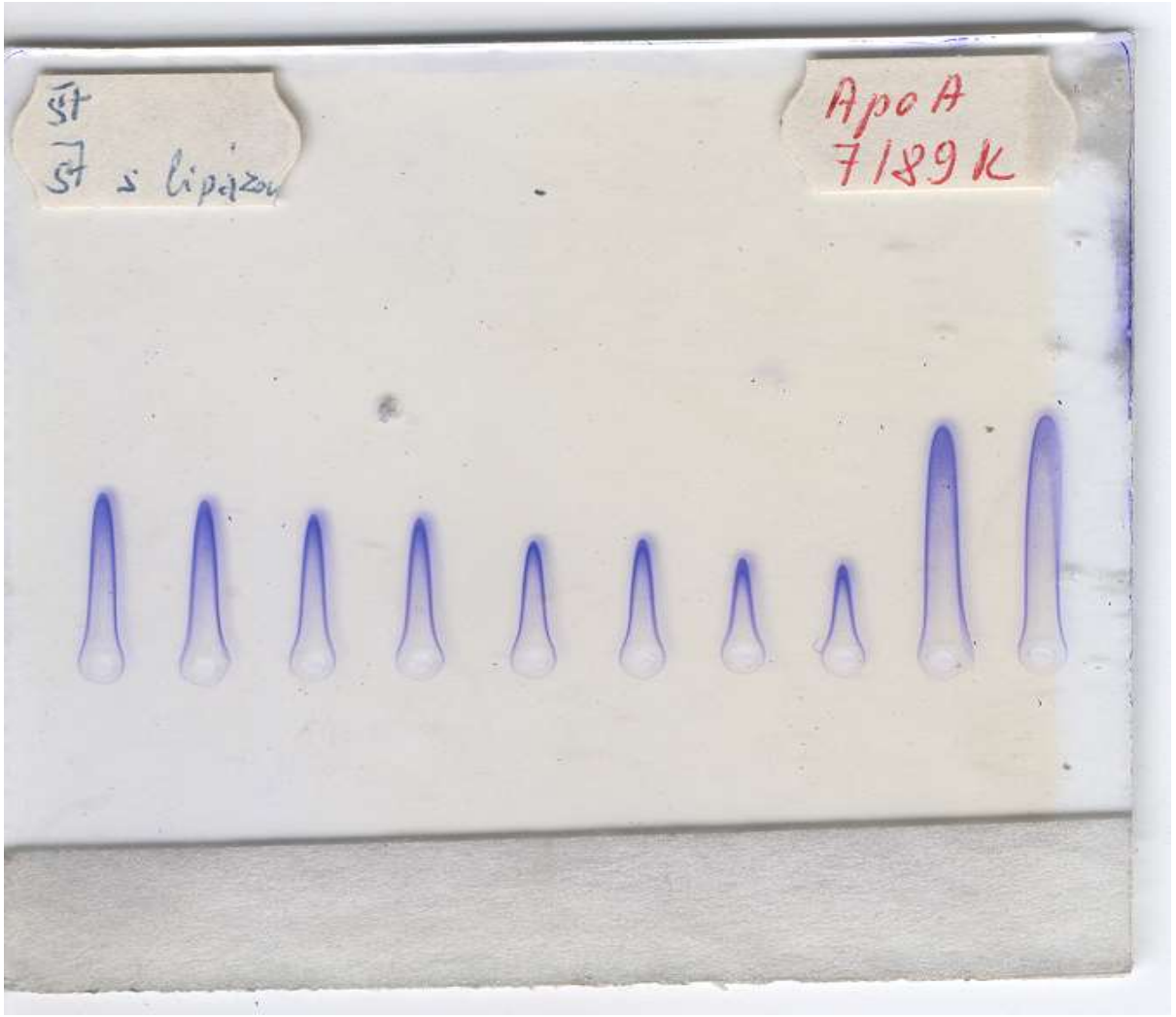


B)

Kvantitativní měření

Imunochemická reakce v gelu

Elektroimunodifuze dle Laurella

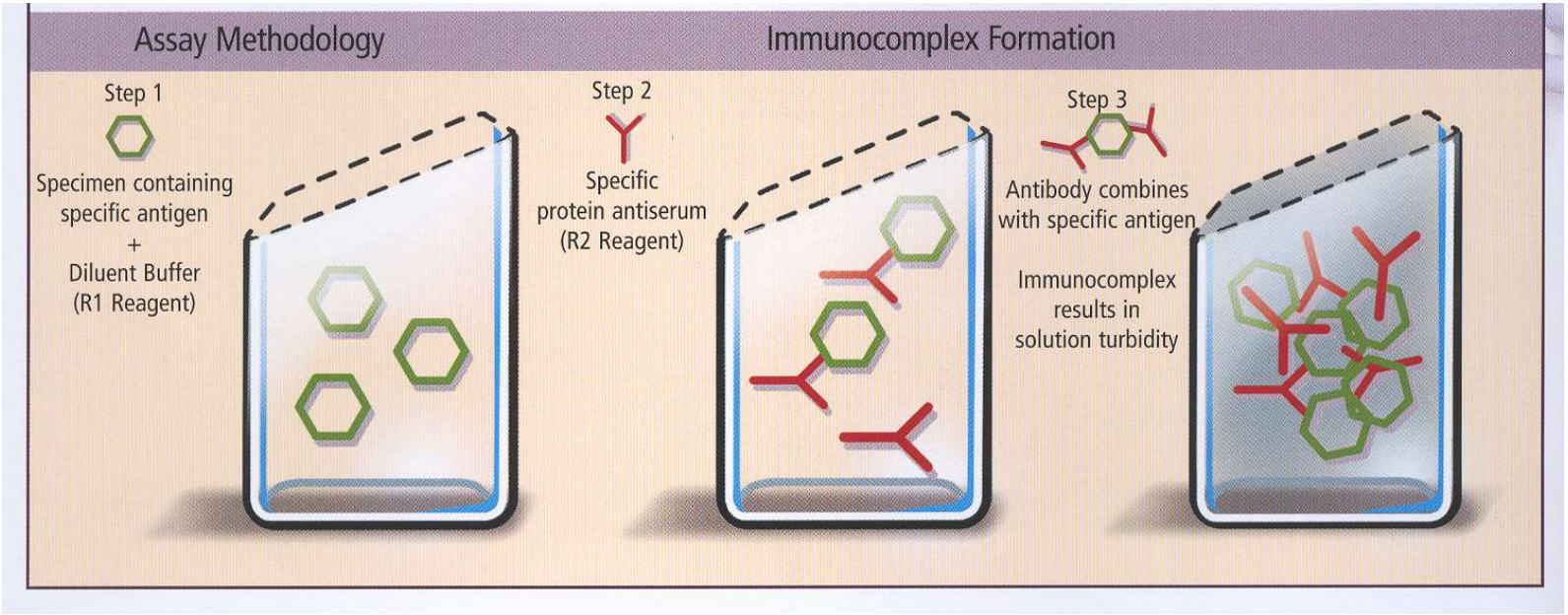


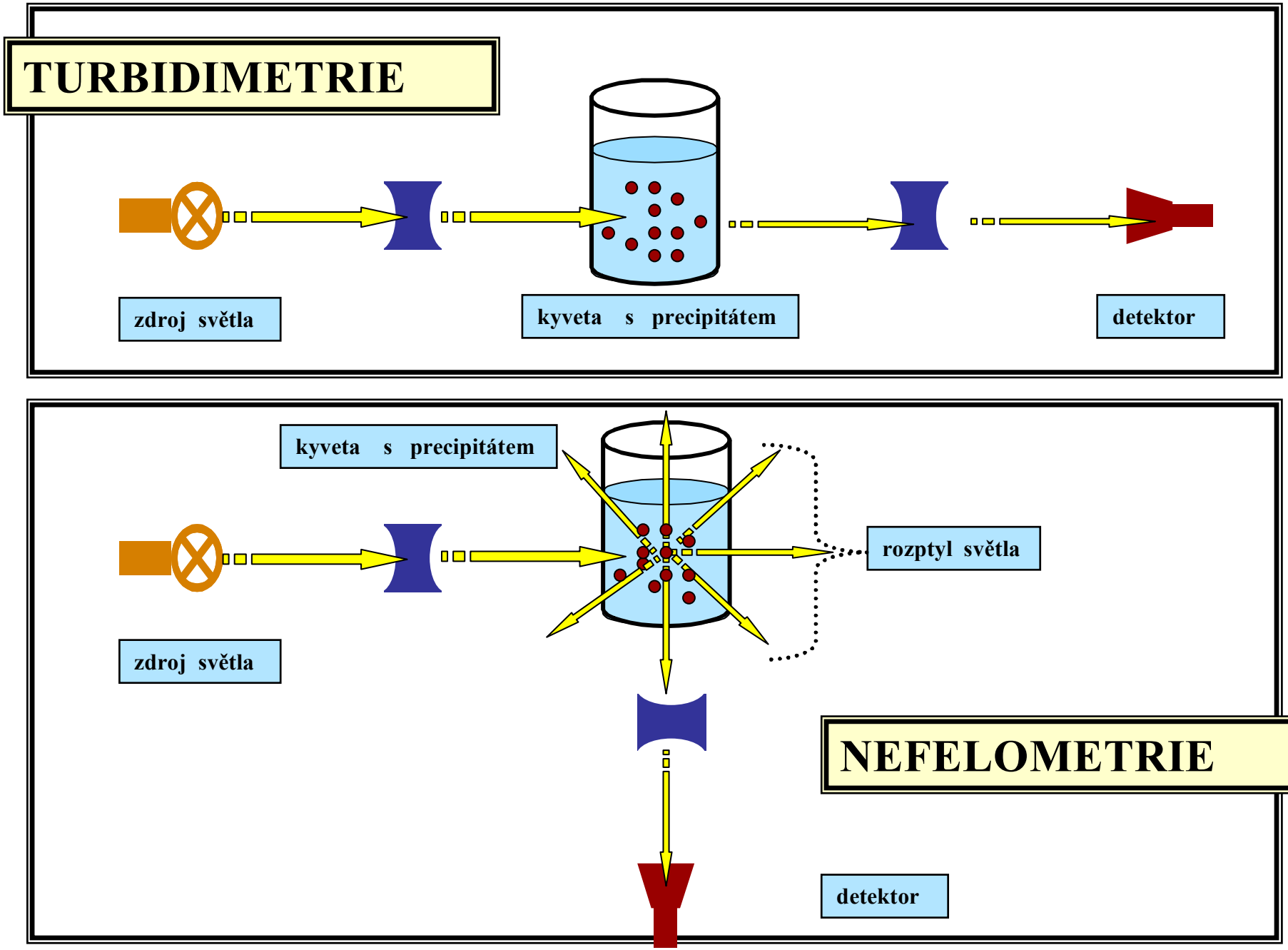
C) Imunoprecipitace v roztoku:

Prostředí: PEG

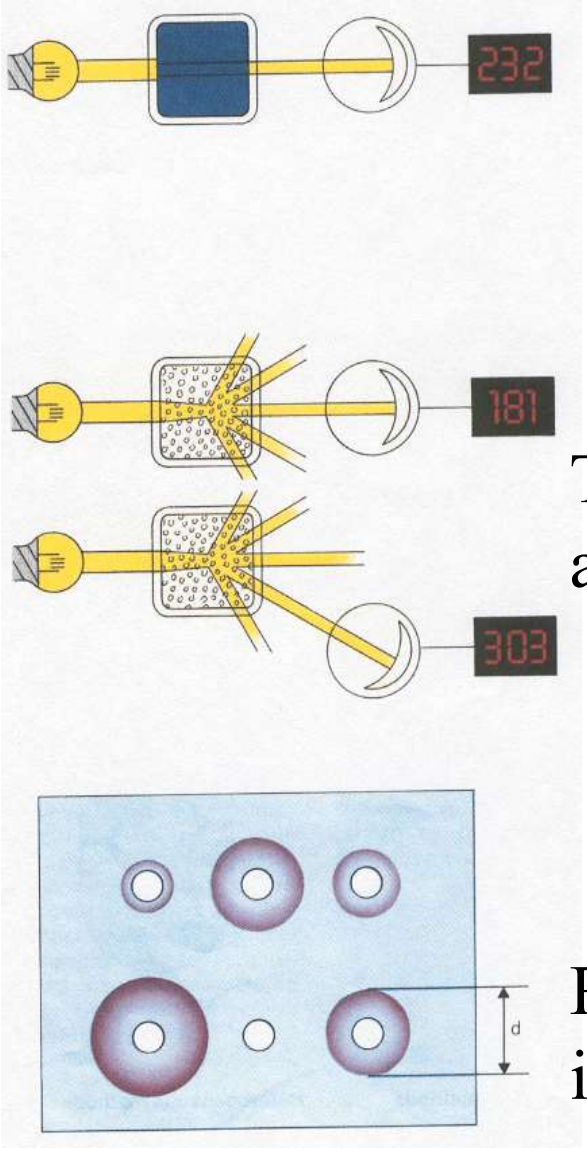
Detekce: nefelometrie, turbidimetrie

Stanovení koncentrace: IgG, IgA, IgM, proteiny akutní fáze




TURBIDIMETRIE
zdroj světla
kyveta s precipitátem
detektor
kyveta s precipitátem
rozptyl světla
zdroj světla
NEFELOMETRIE
detektor

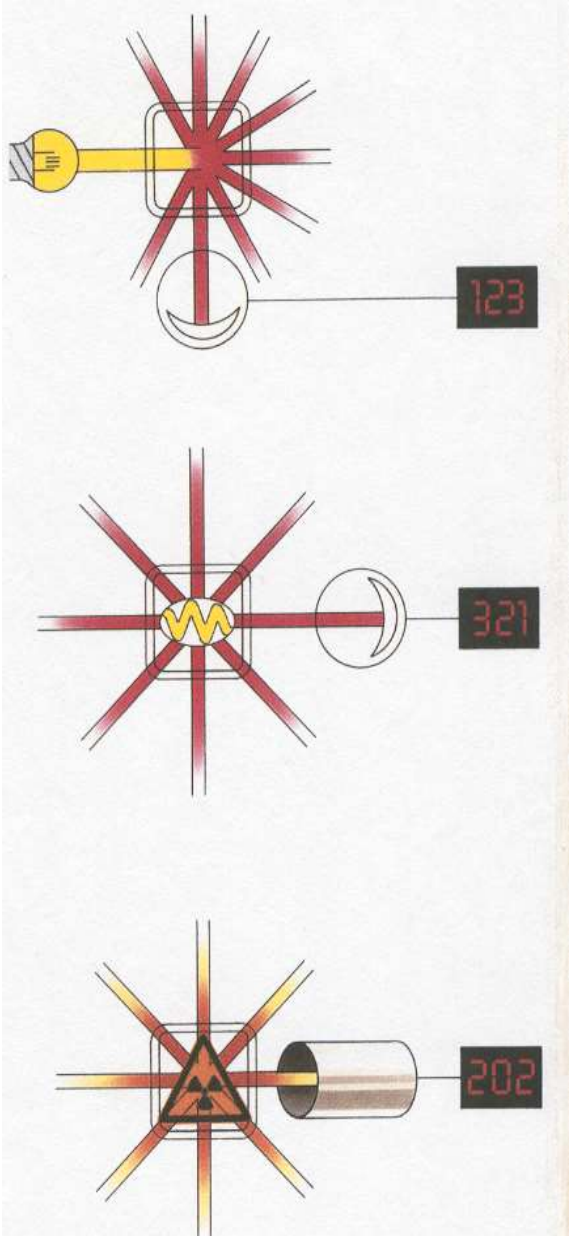
Měřící techniky



fotometrie

Turbidimetrie
a nefelometrie

Radiální
imunodifuze



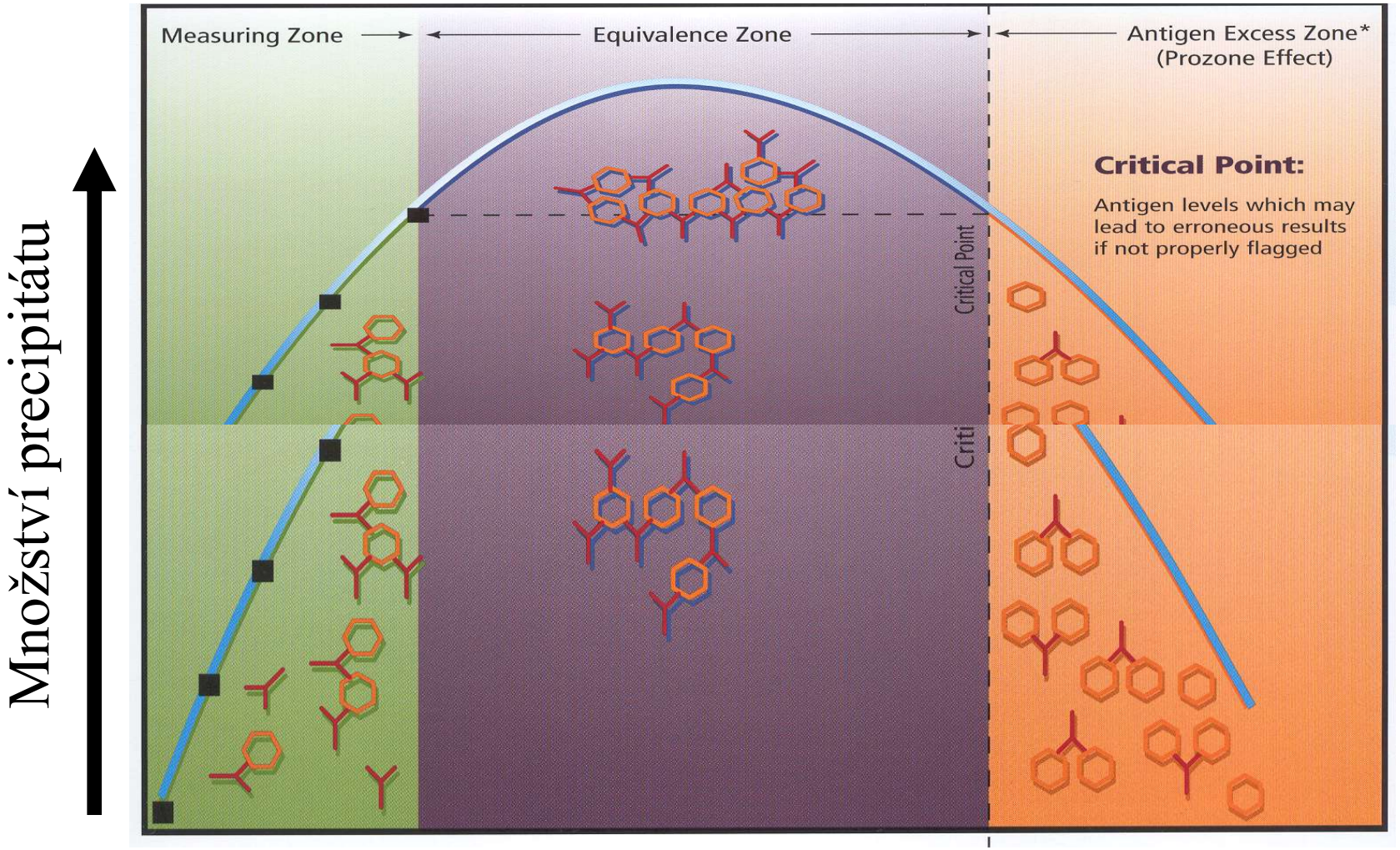
fluorescence

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“

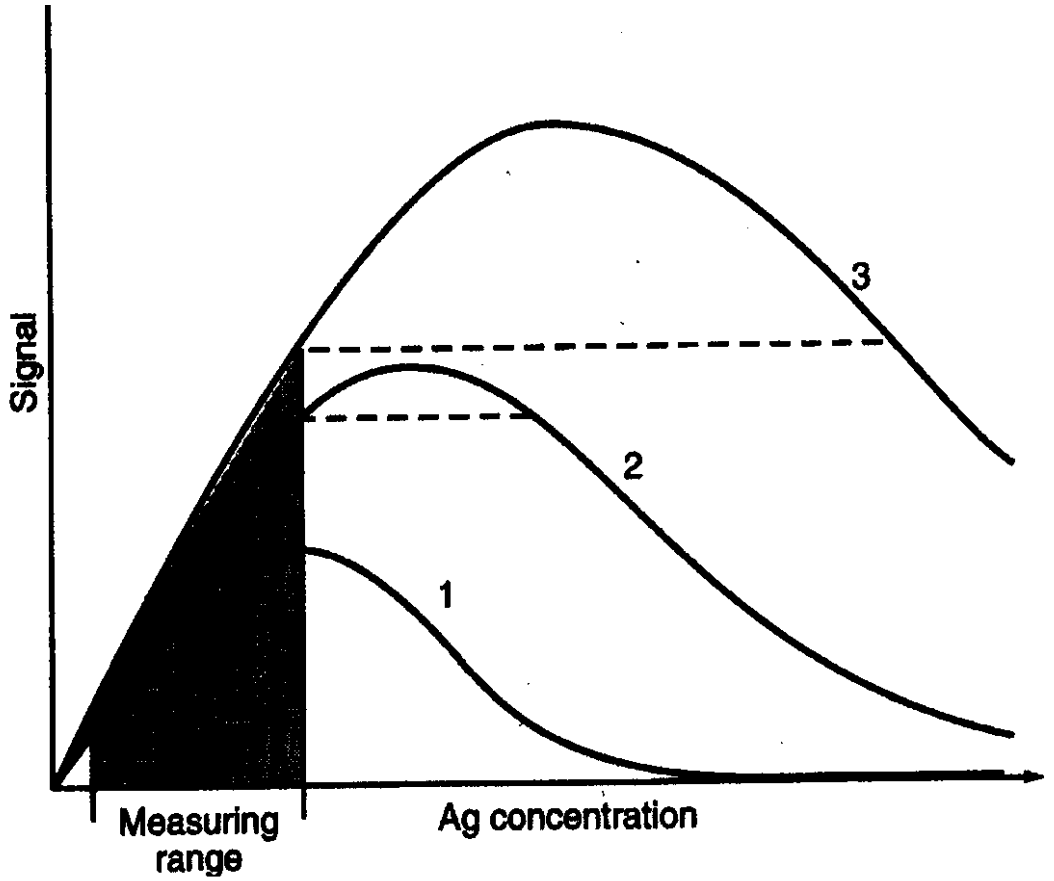
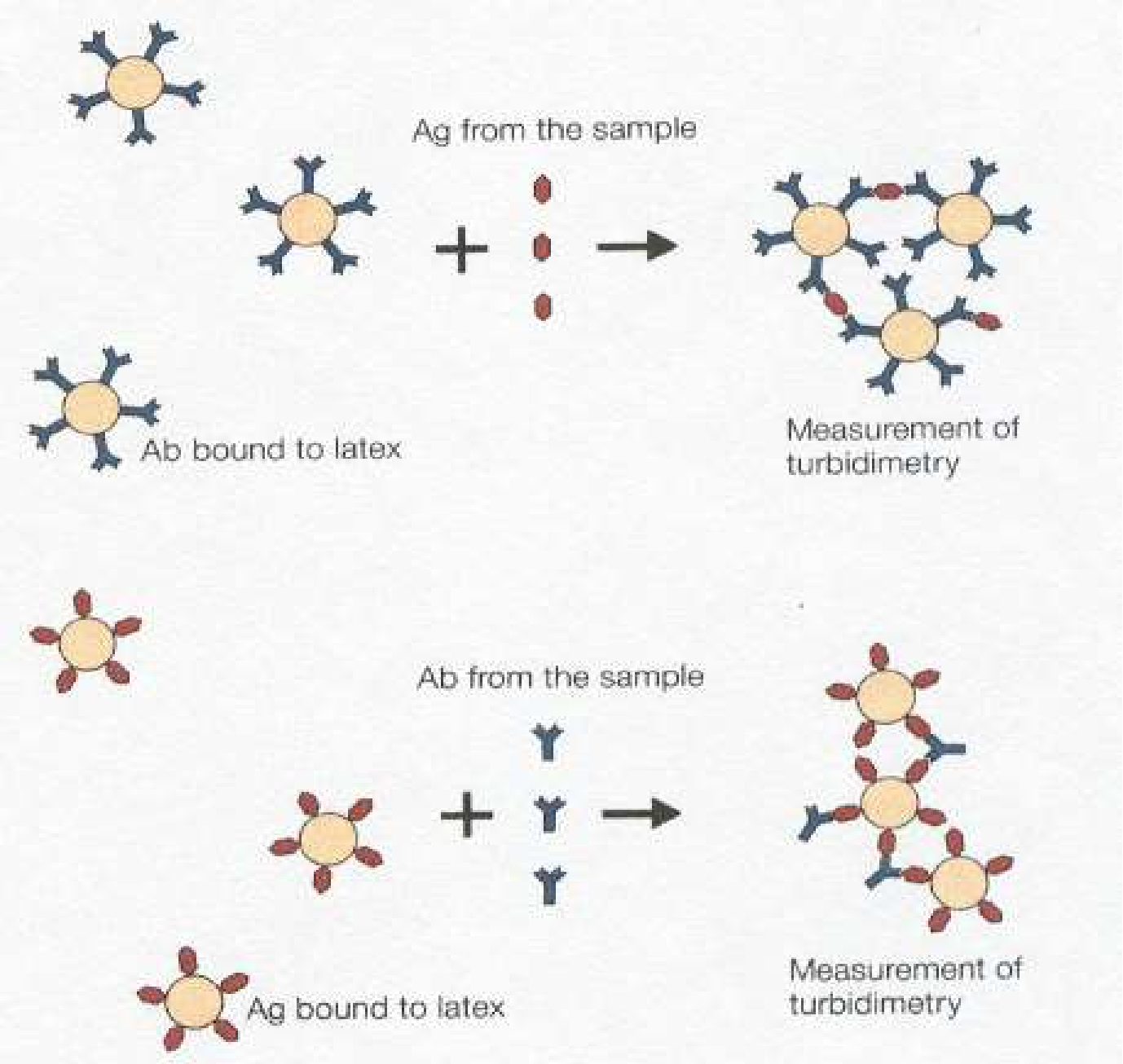


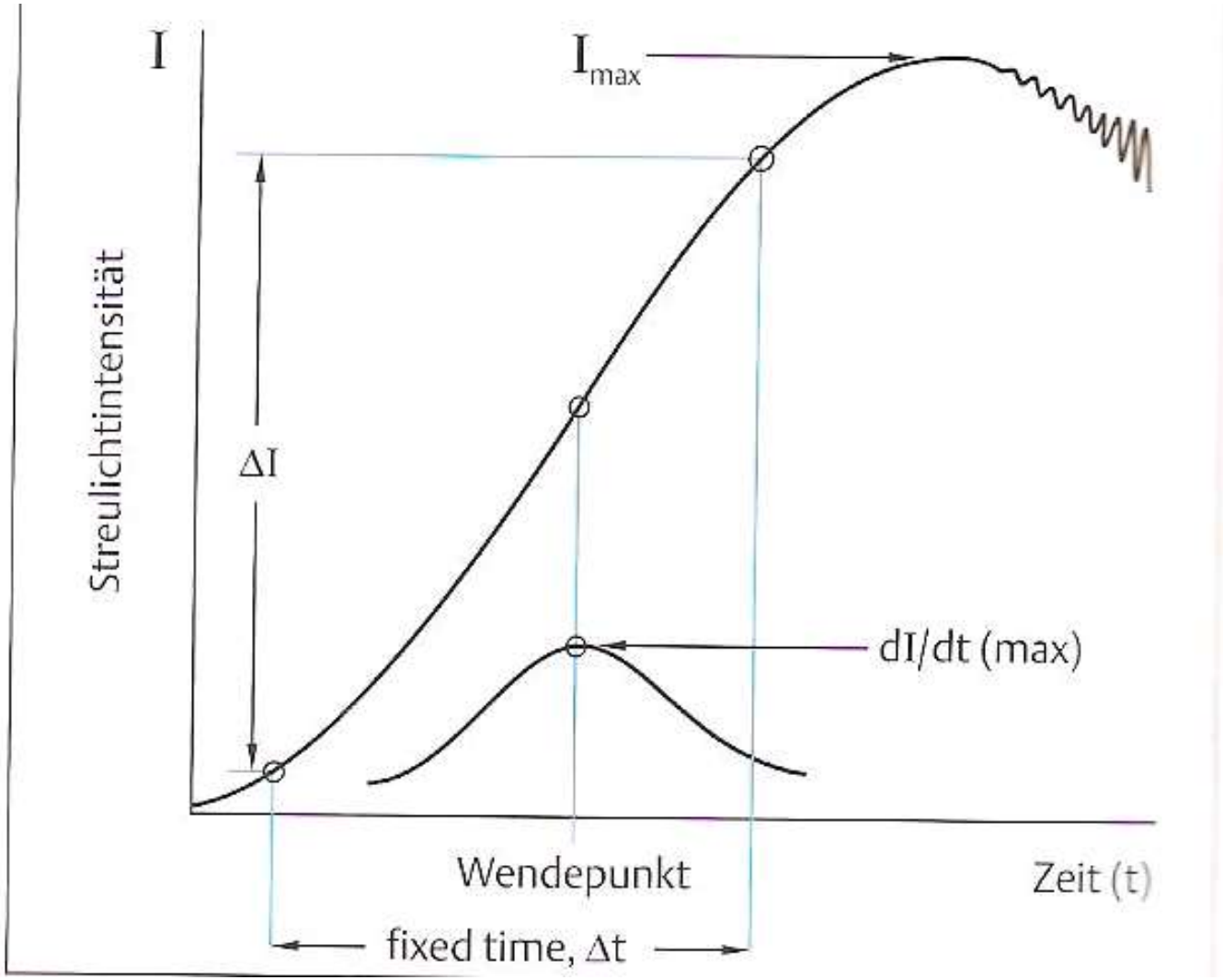
Figure 19. Dose-response curves illustrating the effect of increasing antibody concentration on the security range (dotted line).
1: Low, 2: Medium, 3: High antibody concentration.

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

fixní čas

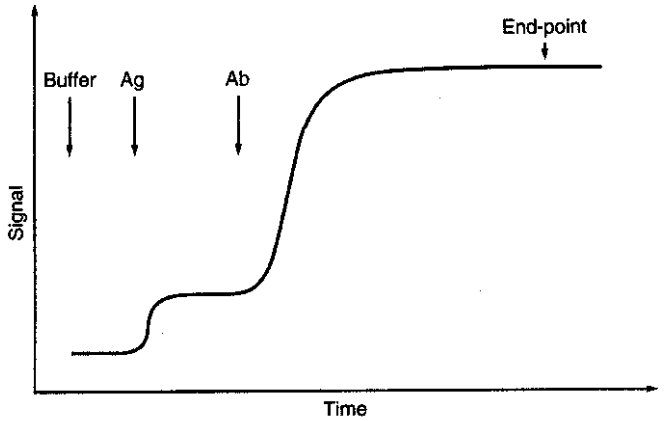


Figure 3. Signal development as a function of time.
The addition of buffer, antigen (Ag), and antibody (Ab) to the reaction cuvette is indicated by arrows.

Rate nefelometrie

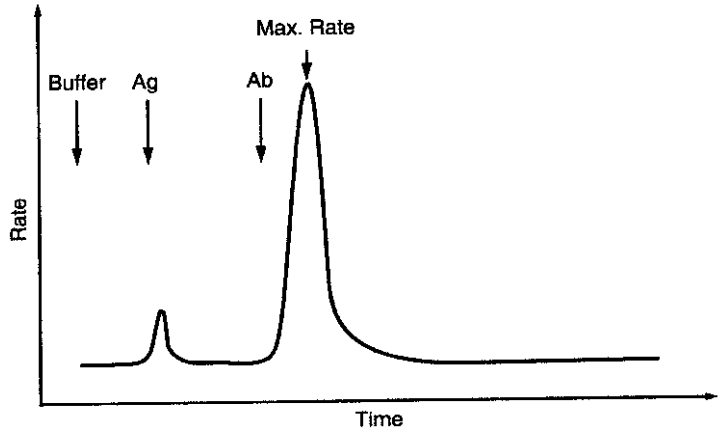
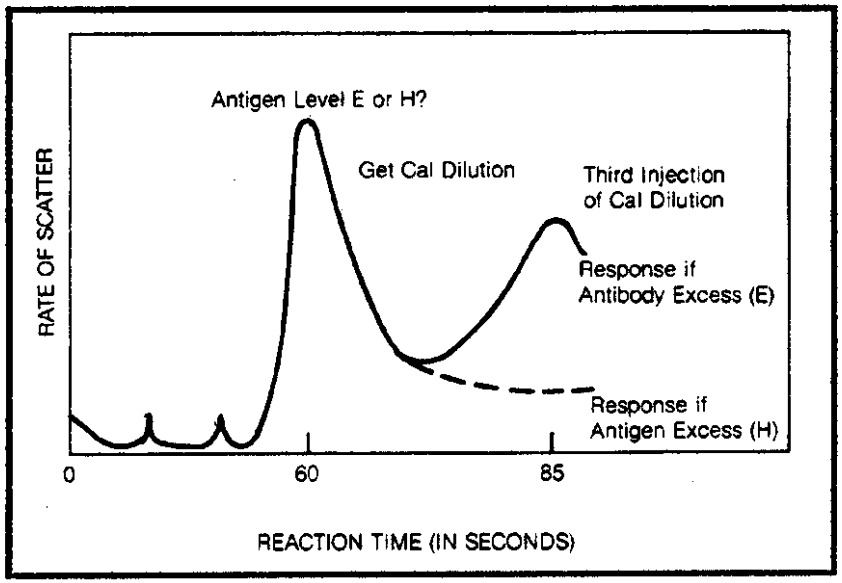
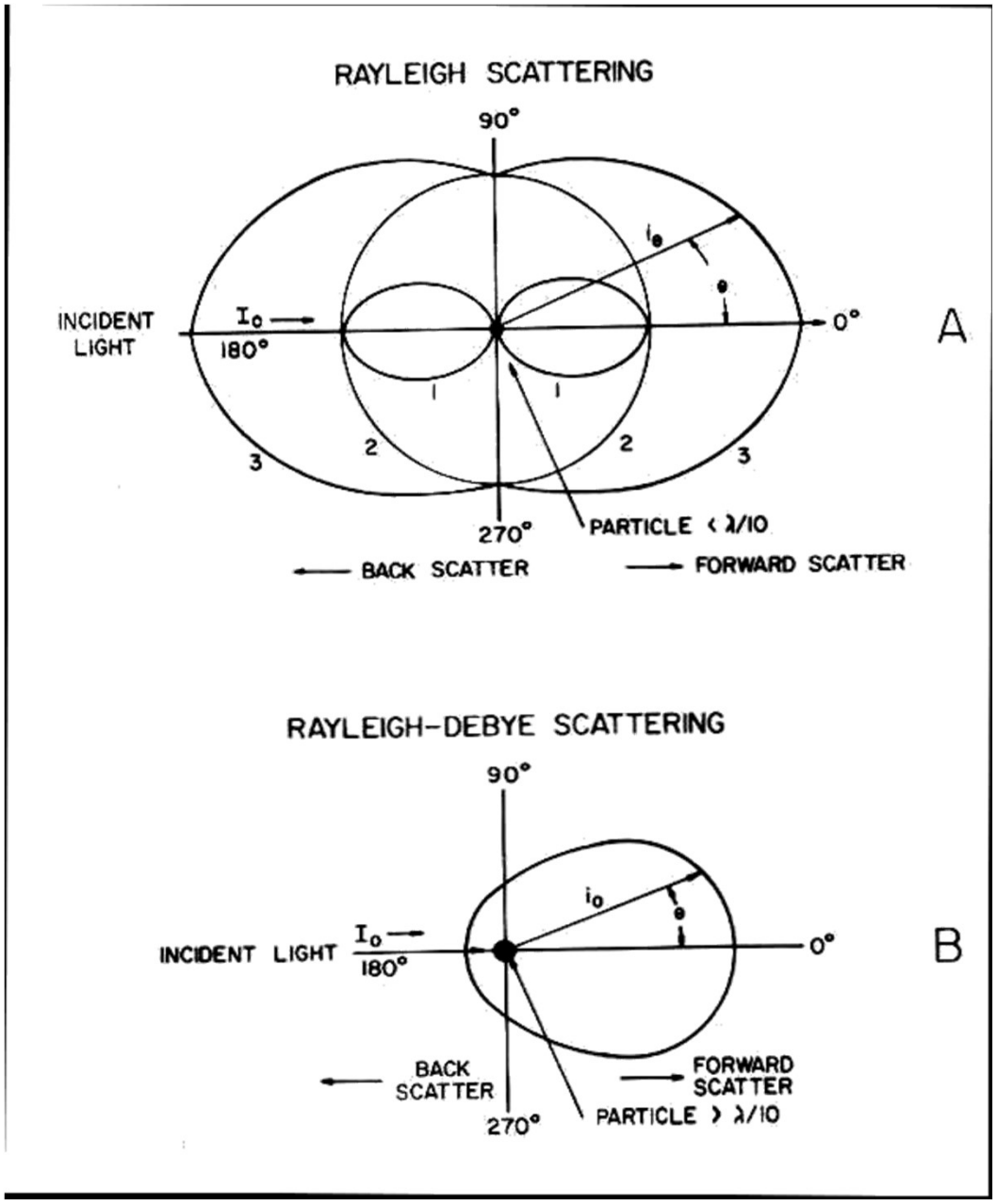


Figure 4. Reaction velocity (rate) as a function of time.
The addition of buffer, antigen (Ag), and antibody (Ab) to the reaction cuvette is indicated by arrows.



Vliv velikosti částice a vlnové délky



Lord Rayleigh (1871)

$$I_s = I_o.16.\pi^2.a.\sin^2\Theta / \lambda^4.r^2$$

I_s – intenzita rozptylu

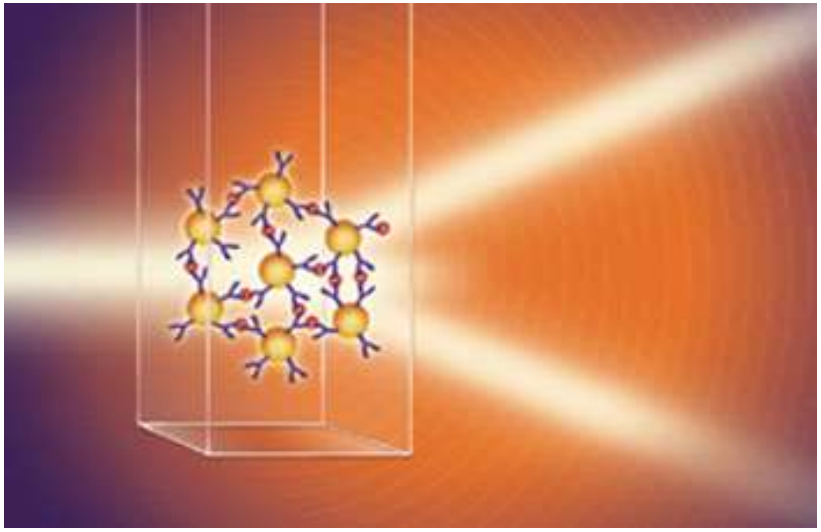
I_o – intenzita původního paprsku

a – koeficient polarizovatelnosti

Θ – úhel pozorování

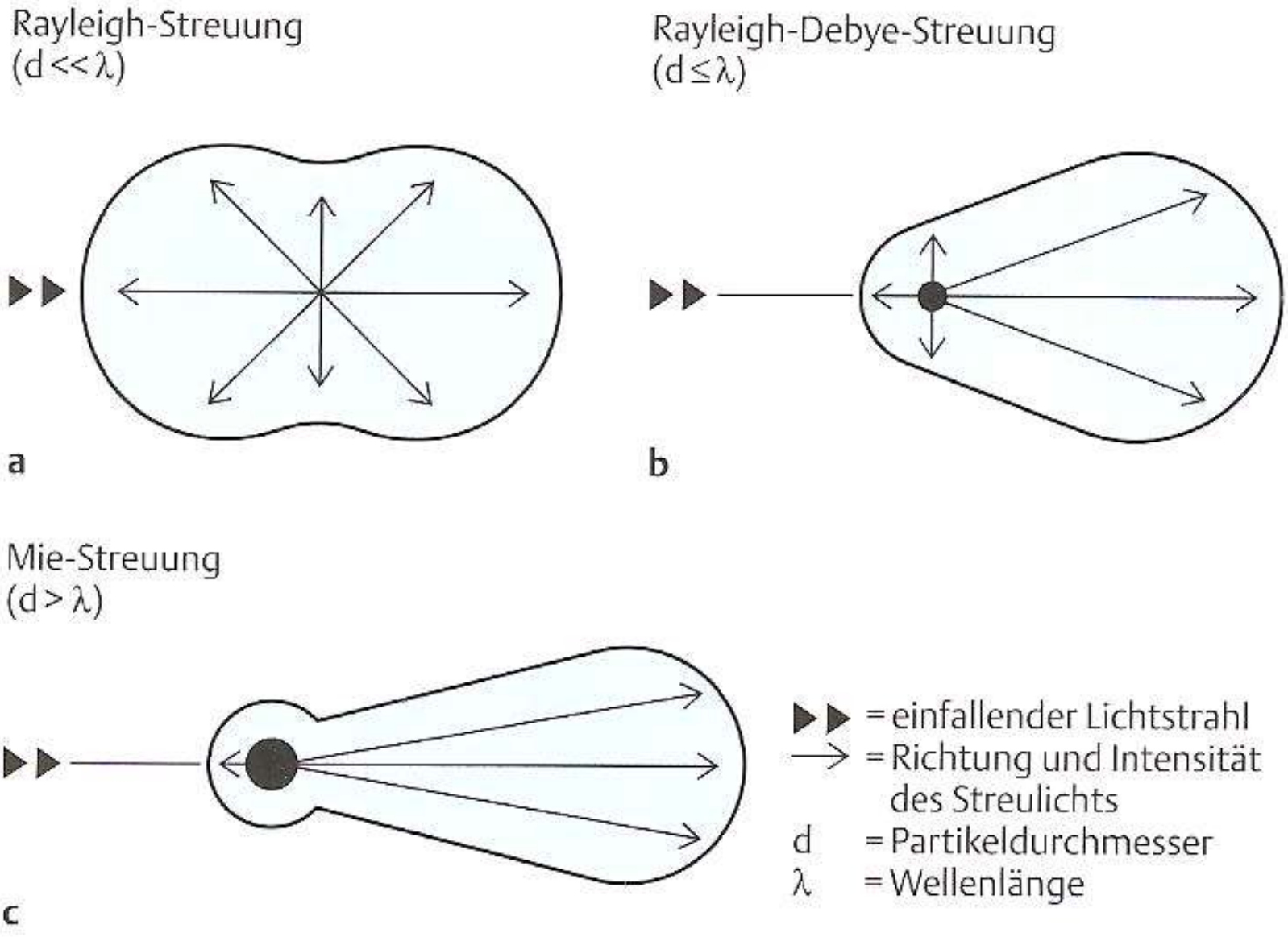
λ – vlnová délka

r – vzdálenost od detektoru

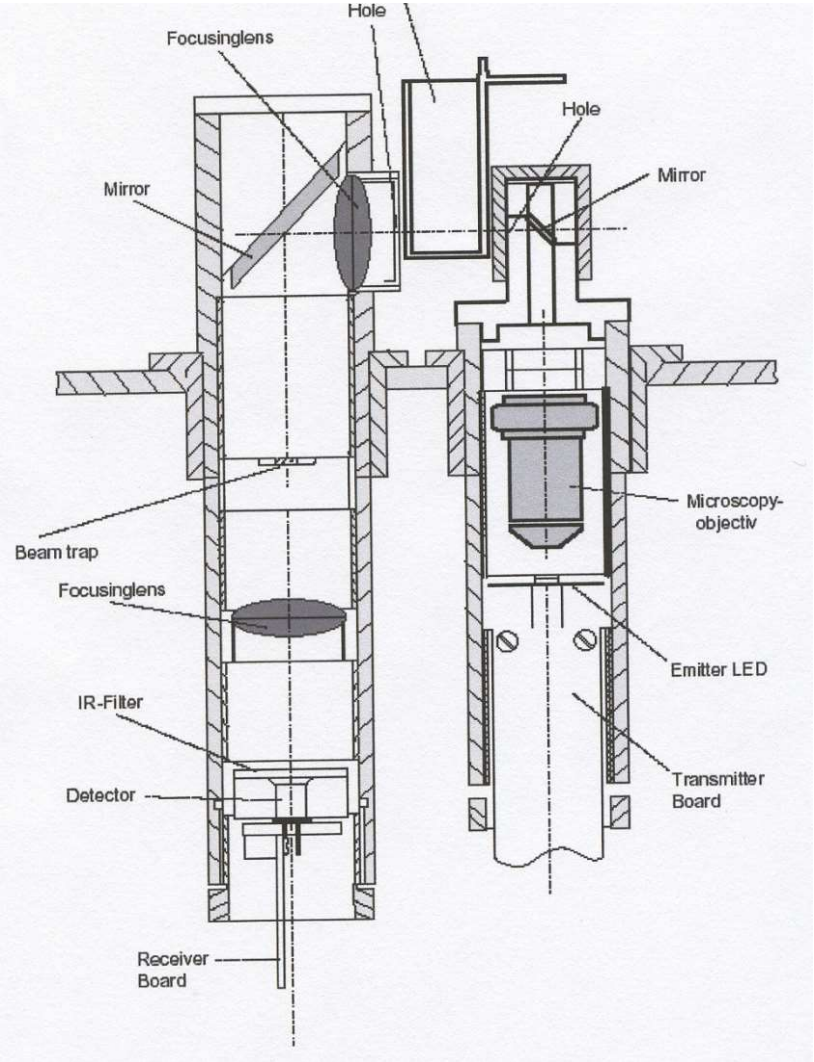


Nefelometrie: rozptyl světla na částicích

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

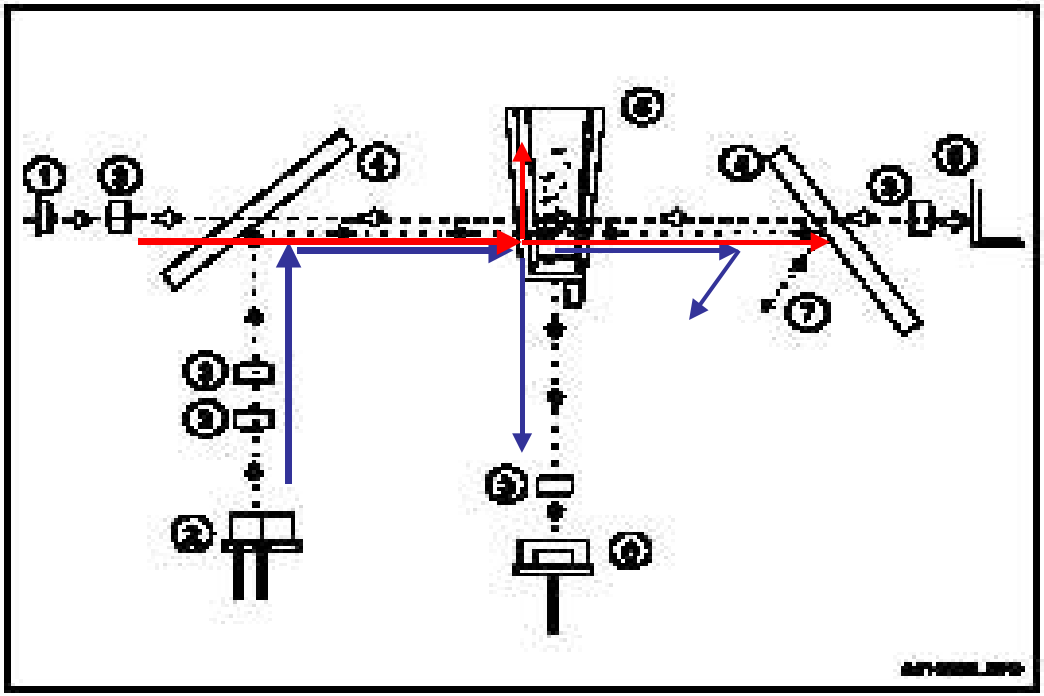


Nefelometr BN 100



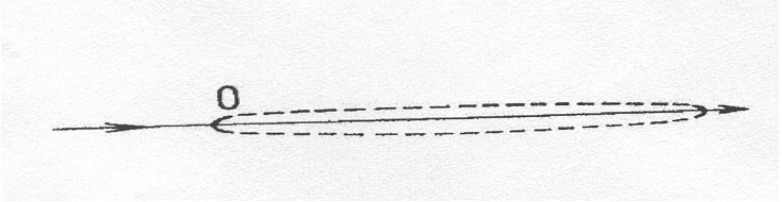
840 nm

Nefelometr Immage 680 nm



NIPIA režim

(near infra-red particle immunoassay)



940nm

Shrnutí

Blíže viz Štern P. Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie. *Klin Biochem Metab* 2006; 14(35), No.3: 146-151 (dostupné na www.cskb.cz)

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

Plazmatické bílkoviny: obvyklé referenční meze

Secchiero S, Sciacovelli L, Plebani M. Harmonization of units and reference intervals of plasma proteins: state of the art from an EQA scheme. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(1): 95-105

Bílkovina	Ref.meze		Bílkovina	Ref.meze
Albumin	35 – 52 g/L		Prealbumin	0,2 – 0,4 g/L
IgG	7 – 16 g/L		AAT	0,9 – 2,0 g/L
IgA	0,7 – 4,0 g/L		AAG	0,5 – 1,2 g/L
IgM	0,4 – 2,3 g/L		A2M	1,3 – 3,0 g/L
C3	0,9 – 1,8 g/L		HPT	0,3 – 2,0 g/L
C4	0,1 – 0,4 g/L		CRP	<5 mg/L

Prealbumin = transthyretin (TTR)

- M.r. 54 000
- Syntéza v játrech (a v plexus choroideus mozkových komor)
- Asociace s retinol-vázajícím proteinem
- Krátký biologický poločas $\Rightarrow$ 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: 35-52 g/L

- FUNKCE:
- Fyzikálně-chemické: zajišťuje koloidně-osmotický (onkotický) tlak, pufrovací kapacita
- Transportní funkce

Albumin – transportní funkce

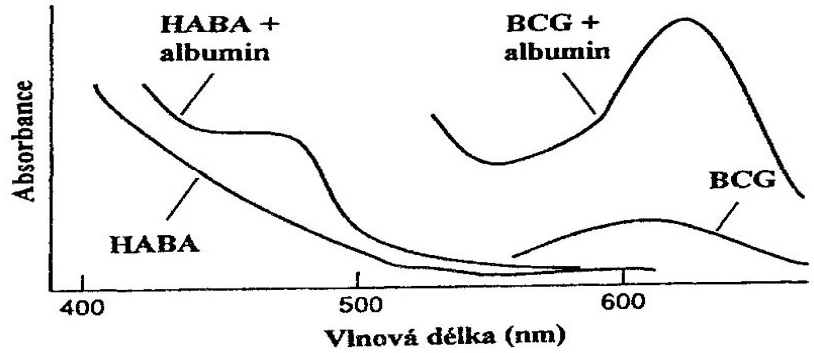
- Látky ve vodě nerozpustné:
- nekonjugovaný bilirubin
- Mastné kyseliny
- Hormony
- Léky (!)

- Látky hydrofilní (adsorpcí):
- Ca^{++}
- Zn^{++}
- Kyselina močová

Stanovení albuminu

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

- Vazba barviva ⇒ 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 ⇒ 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)



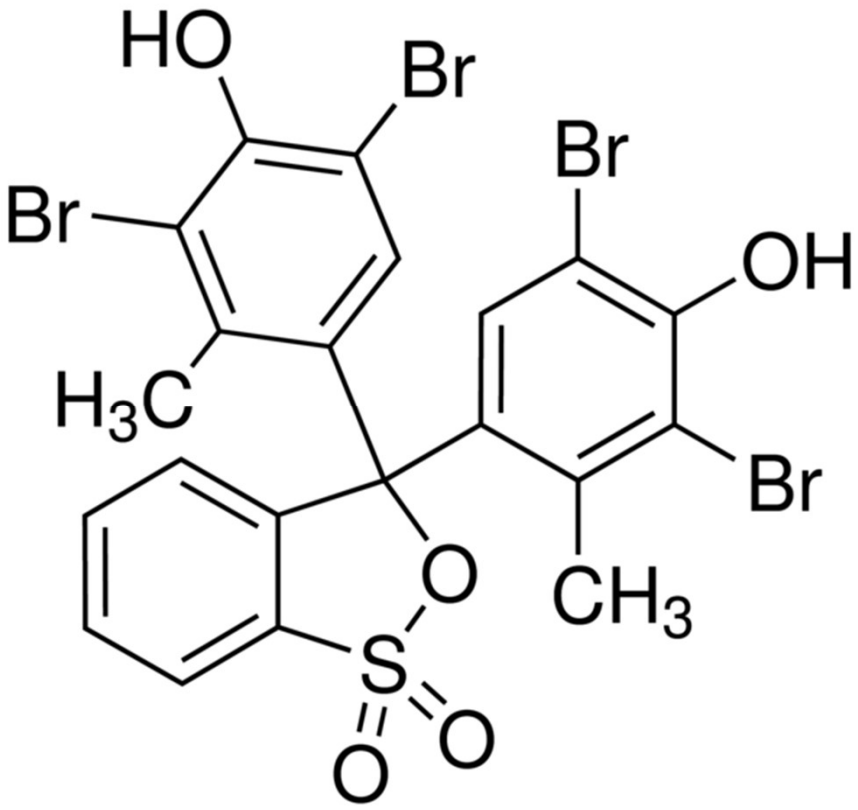
Obr. 6-4 Spektra BCG, HABA a jejich komplexů s albuminem

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

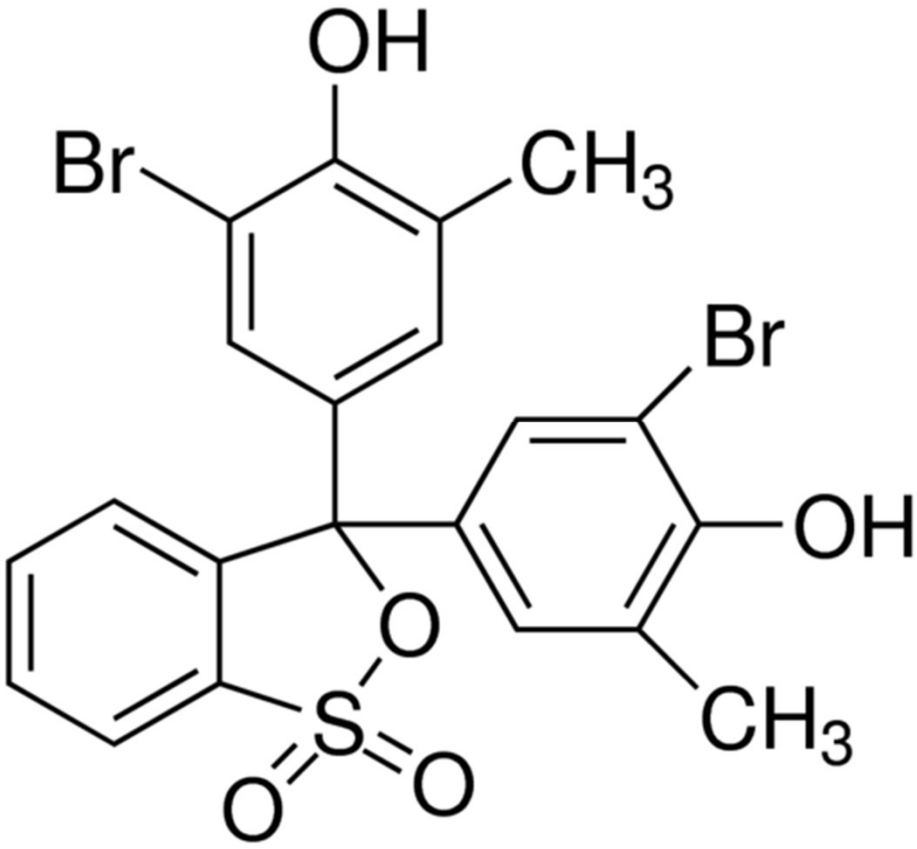
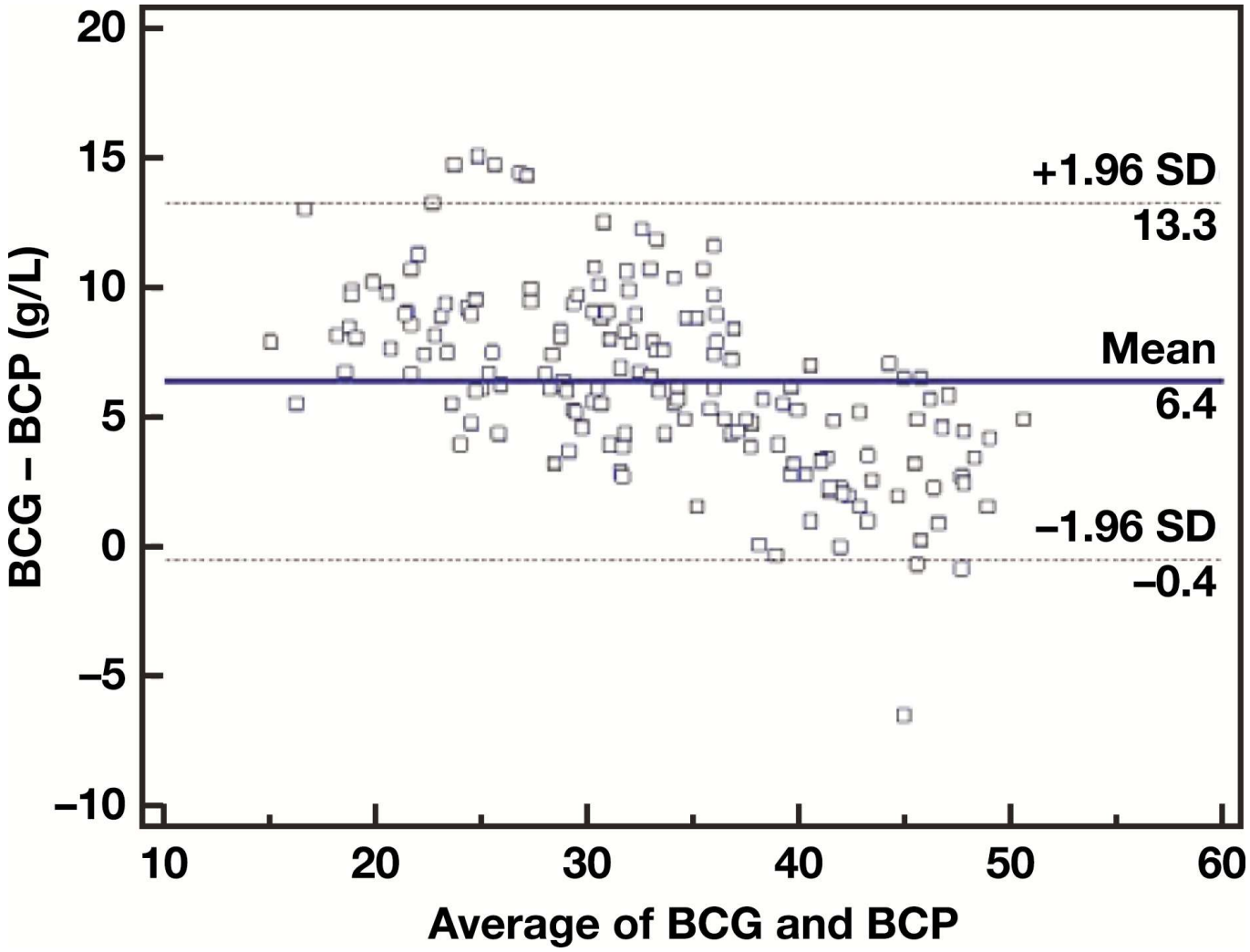


Figure 1 Average and range for albumin values, as tested by bromocresol green (BCG) and bromocresol purple (BCP) ...



Lab Med, Volume 49, Issue 4, November 2018, Pages 355–361, https://doi.org/10.1093/labmed/lmy020

The content of this slide may be subject to copyright: please see the slide notes for details.

OXFORD UNIVERSITY PRESS

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 α1- a α2-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 *(↓↓α_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) $\Rightarrow$ výhodné stanovení současně s CRP (začátek/vrchol/ odeznívání onemocnění)

Alfa-2-globuliny

- **Ceruloplazmin**
- **Inhibitor C1-esterasy (C1-INH)**
- **Haptoglobin (Hp, HPT)**
- **Alfa-2-makroglobulin (A2M)**
- **Pre-beta-lipoprotein (VLDL)**

Ceruloplazmin (CPL)

- 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 (HPT)

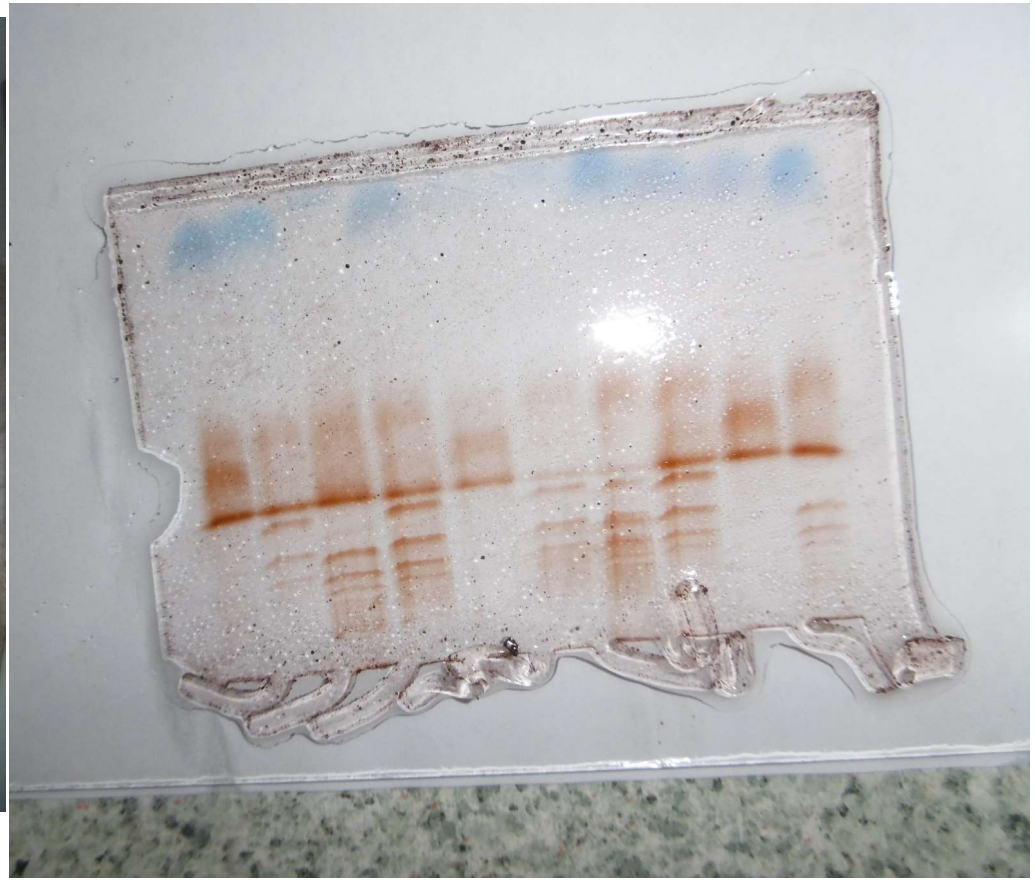
- Dva lehké řetězce (α) a dva těžké řetězce (β) navzájem spojené disulfidovými můstky
- Syntéza v játrech
- Poločas odbourávání 3,5-4 dny
- Funkce: vychytávání uvolněného hemoglobinu (zábrana ledvinného poškození a ztrátám Fe), antiproteinasová aktivita
- Referenční meze: podle typu (Hp 1-1, 2-1, 2-2)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

Stanovení fenotypu haptoglobinu - výsledky

(vzorky zprava doleva):

vlevo 3. 10. 2022: v pozici 7 Hp1-1; v pozici 3 Hp2-2; v pozicích 2,4,5,6,8,9,10 Hp2-1

vpravo 10. 10. 2022: v pozici 2,6,10 Hp1-1; v pozici 1,8 Hp2-2; v pozicích 3,4,5,7,9 Hp2-1



Alfa-2-makroglobulin (A2M)

- 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
- Referenční meze 1,3 – 3,0 g/L

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 ± normálních hodnotách haptoglobinu

Transferin

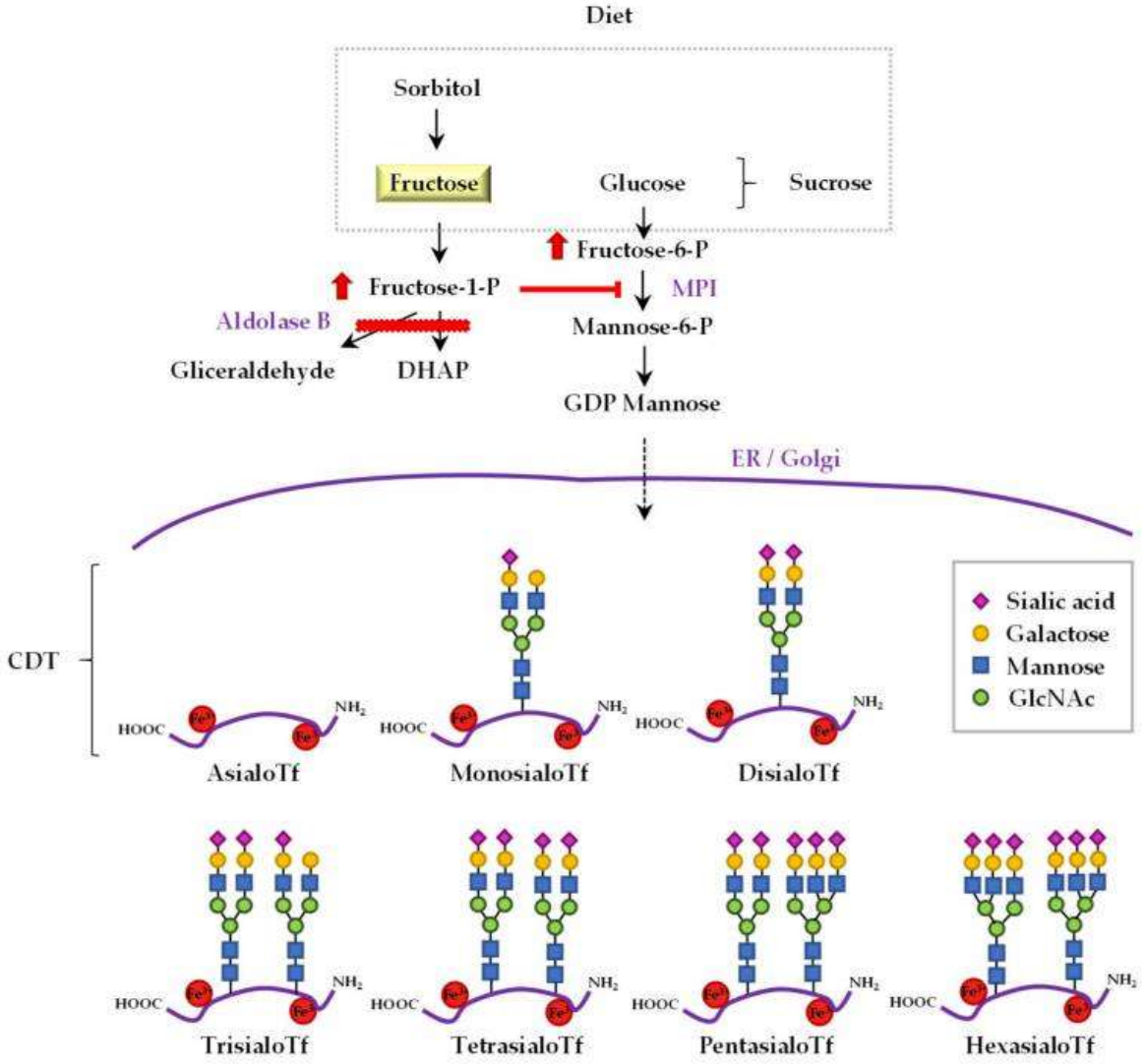
- M.h. 76 kD
- Referenční meze:
  2,0 – 3,6 g/L

- 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

Glykoformy transferinu

tetrasialo- (80%) > pentasialo- (14%) > trisialo (4%) > disialo- (1%) a hexasialo- (1%)

Cano A et al. *J Clin Med* 2021; 10(13): 2932



Transferin

- Saturace transferinu – výpočet:
- **TfS (%) = 3,98*Fe-S (μmol/L)/Transferin (g/L)**

- **Index selektivity S:**
- **S = (IgG-U/IgG-S) : (Transferin-S/Transferin-U)**
- **S < 0,1 … selektivní proteinurie**
- **S > 0,2 … neselektivní proteinurie**
- **0,1 < S < 0,2 … selektivitu nelze vyhodnotit**
- **Alternativa: Albumin/IgG index**

CDT: Carbohydrate deficient transferrin („bezsacharidový transferin“)

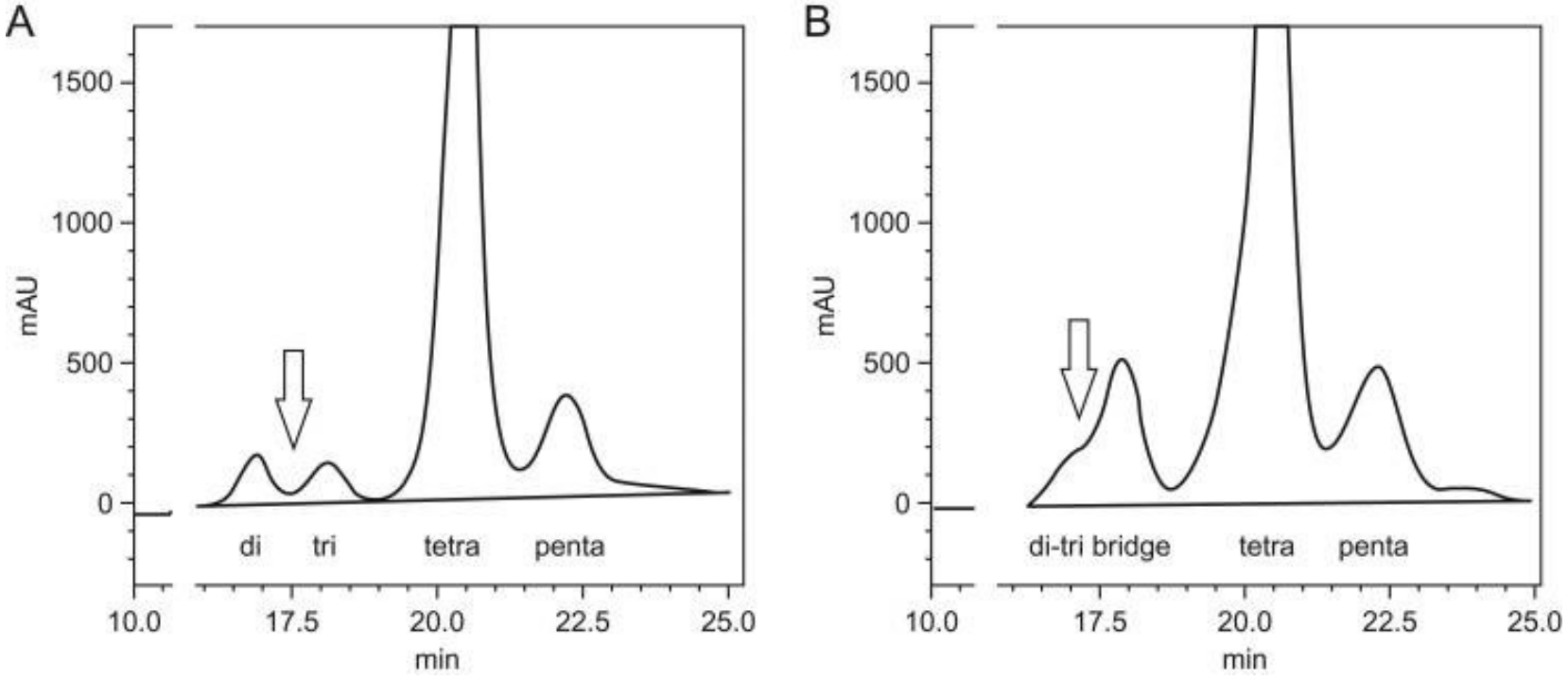
CDT původně označovalo sumu asialo-, monosialo- a disialotransferinu

- Biomarker alkoholismu
- Definován jako **% disialotransferinu z celkového transferinu** (IFCC)
- *Referenční metoda:* **HPLC** (standardizace IFCC) se spektrofotometrickou detekcí TRF saturovaného železem při 470 nm
- *Další metody:* **kapilární elektroforéza**; **imunonefelometrie** (použití monoklonální protilátky selektivně detekující disialoformu spolu se zpravidla zanedbatelným množstvím monosialo- a asialotransferinu – kit firmy Siemens Healthineers)
- *Referenční meze:* ≤ 1,7 % (jasně patologické jsou hodnoty ≥2,0 %; při sledování je významná změna oproti „baseline“ hodnotě o >0,2 %)

Chromatogram izoforem transferinu

A – typický obraz se zvýšenou frakcí disialotransferinu u alkoholika;
B – atypický obraz se spojenou di- a trisialofrakcí u pacienta s jaterní cirhózou

Stewart SH, Reuben A, Anton RF. *Alcohol Alcohol.* 2017; 52(1): 24-28



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

- **Opsonizace (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. baktérie) → odhalení vazebného místa pro C1 → navázané C1 získá proteolytickou aktivitu – štěpí proteiny C4 a C2 → vzniká „klasická" C3-konvertasa (C4bC2a), ta štěpí C3 na C3a a C3b → vzniká C5-konvertasa (C4bC3bC2a)
- alternativní cesta: C3 se v malé míře samovolně štěpí na C3b a C3a; v C3b se odhalí reaktivní thioesterová skupina, která reaguje s hydroxy- a aminoskupinami v blízkém okolí (na povrchu nějaké částice); k C3b se připojí faktor B, ten je pak štěpen faktorem D na Ba a Bb; komplex C3bBb stabilizovaný faktorem P (properdin) působí jako alternativní C3-konvertasa

Komplement – diagnostické využití

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

Beta-2-mikroglobulin

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

Fibrinogen

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

Gama-globuliny: IMUNOGLOBULINY

- **IgG, IgA, IgM, IgD, IgE**
- **Těžké řetězce gamma, alfa, mí, delta, epsílon (γ, α, μ, δ, ε)**
- **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	Opsonizace; neutralizace; aktivace komplementu; přestup placentou; sekundární protilátková reakce	7-16
IgA	6	Sérum, slzy, sliny, povrch sliznic, kolostrum, mateřské mléko	Ochrana sliznic, opsonizace	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: hypoimunoglobulinémie**

- 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: hyperimunoglobulinémie**

- polyklonální: kompetentní odpověď imunitního systému na infekci
- Monoklonální („paraproteinémie“):

a) MGUS: monoklonální gamapatie nejasného významu

b) maligní: plazmocytom (mnohočetný myelom, Kahlerova nemoc): IgG>IgA>fLC>IgM>>nemoc těžkých řetězců, IgD, kryoglobulinémie

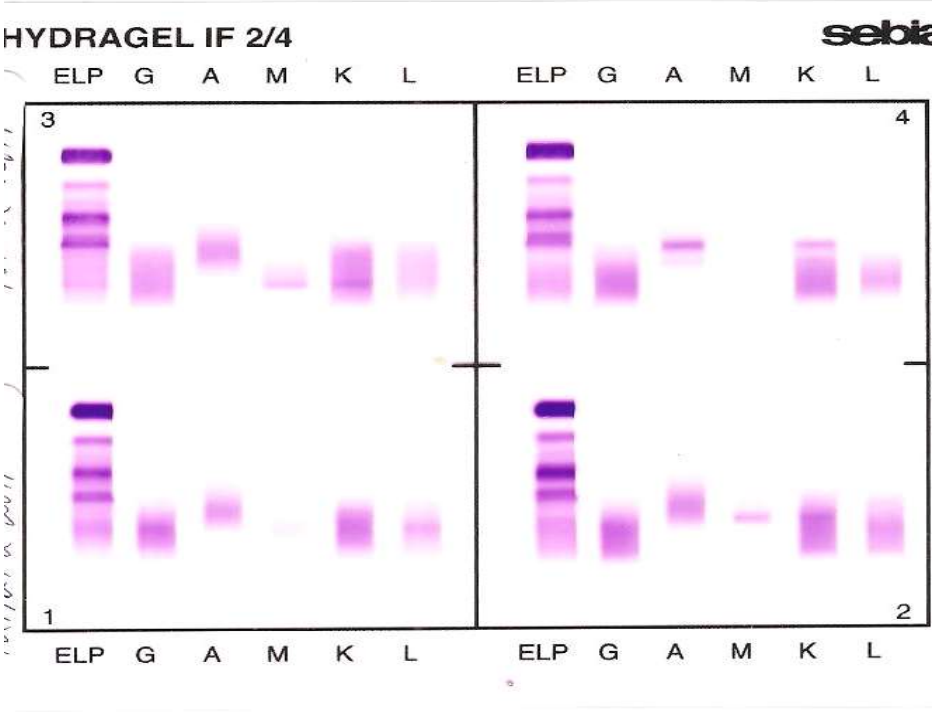
Pozn.: IgM = „Waldenströmova makroglobulinémie“

Nemaligní onemocnění vzácně spojená s výskytem M-proteinu (zprav. MGUS)

- Při imunitní reakci (po očkování nebo při akutní infekci) může být protilátková reakce proti určitému antigennímu epitopu velmi silná, takže se **přechodně** objeví i malé množství monoklonálních protilátek. Při adekvátní regulaci imunitní reakce zůstává pouze několik dlouhožijících plazmatických buněk, které se nedělí a secernují trvale určité množství protilátek.

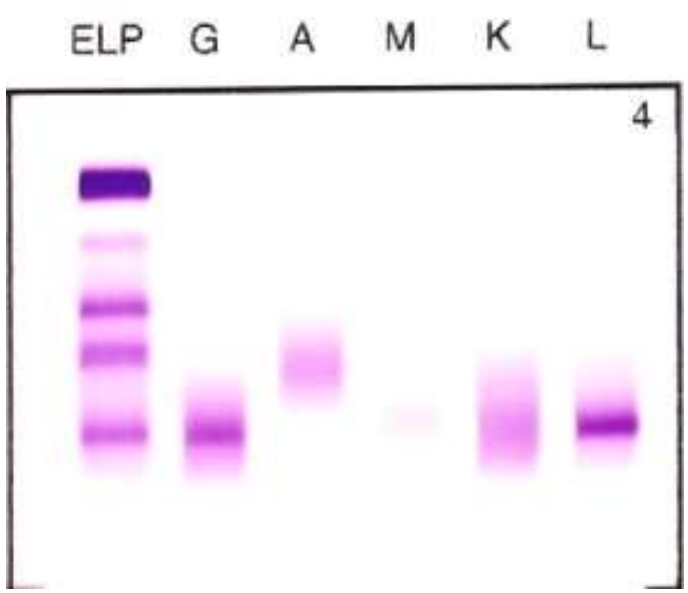
Paraproteiny - typizace

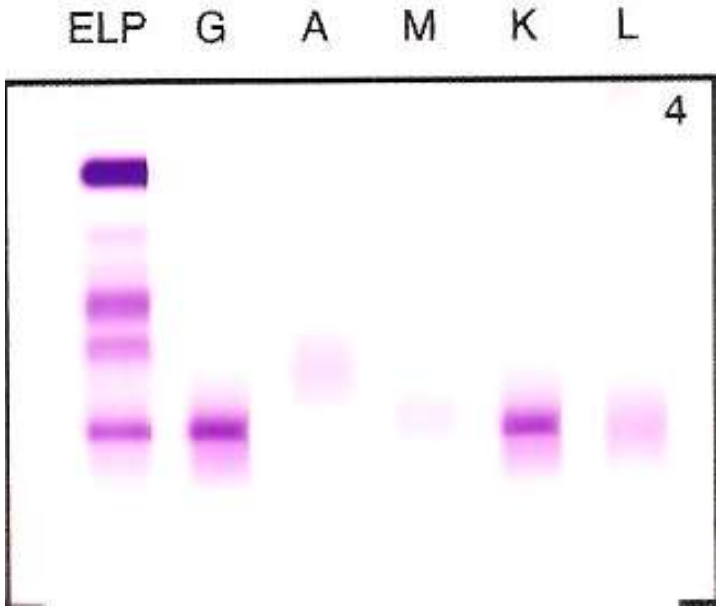
- A) imunoelektroforéza (dnes se již téměř nepoužívá)
- B) **imunofixace** – antiséra anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-kappa, anti-lambda (dle potřeby lze použít i anti-IgD, anti-IgE, anti-free kappa, anti-free lambda) po elektroforéze „fixují“ paraprotein dané třídy v gelu, ostatní proteiny se odmyjí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



IMUNOFIXACE

Určete, zda je přítomen paraprotein.
Určete typ těžkého a lehkého řetězce.

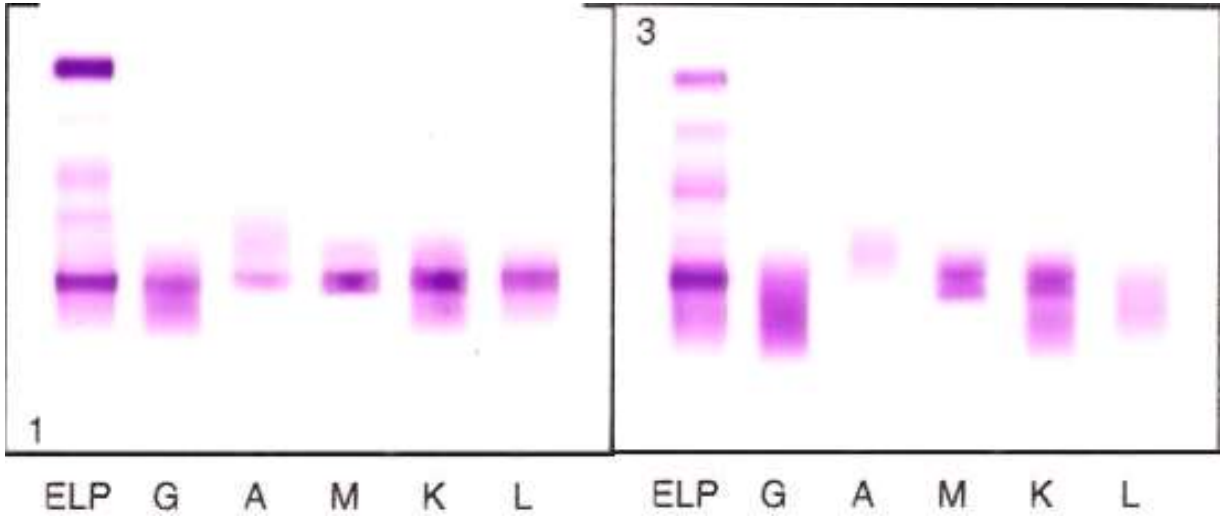




IMUNOFIXACE

Někdy na sebe paraprotein (zejm. IgM) váže jiné bílkoviny (Ig) a nedaří se ho určit. Řešením je přidání malého množství merkaptoethanolu nebo dithiothreitolu.

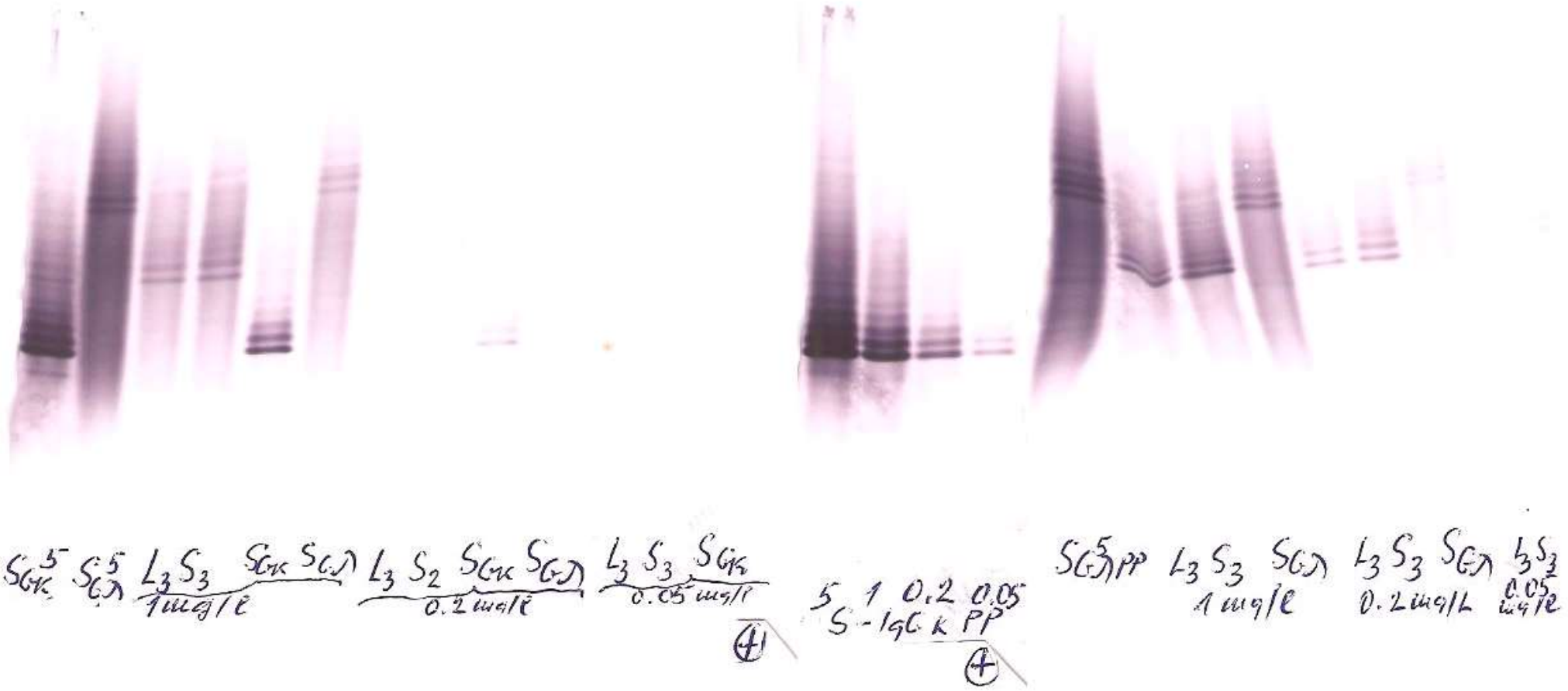
Vlevo: vzorek bez DTT; vpravo: vzorek s přídavkem 10 mmol/l DTT



Izoelektrická fokusace (IEF): paraprotein se rozdělí na několik pásů („spektrotyp“) – u IgG v těsné blízkosti

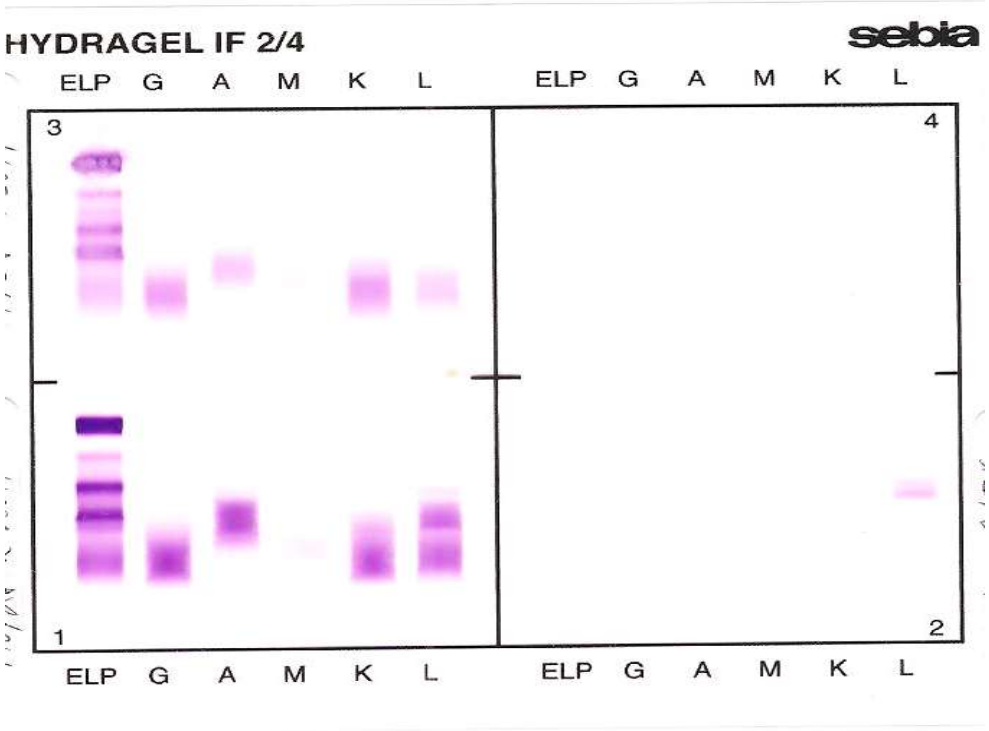
Mnohem nižší detekční limit než elfo x nákladnější, komplikovanější hodnocení (snadné jen u IgG), obtížně použitelné pro IgM paraproteiny; rutinně se nepoužívá

Zleva doprava: detekce značenými protilátkami anti-IgG, anti-IgGκ, anti-IgGλ



Paraproteiny - typizace

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



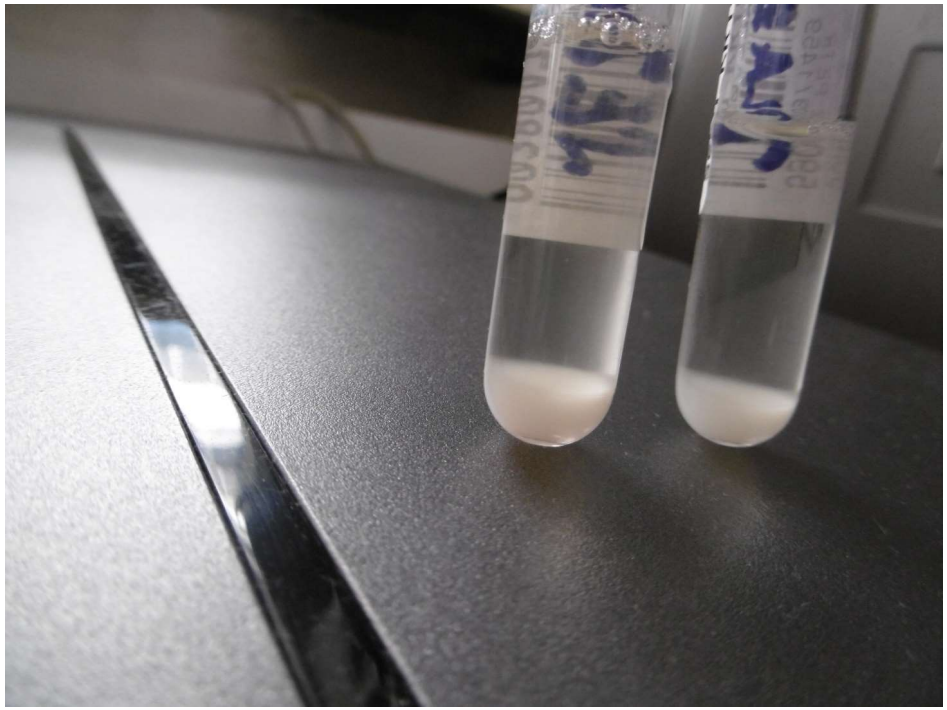
Kryoglobuliny

- **imunoglobuliny reverzibilně precipitující při teplotách nižších než je teplota lidského těla.**
- Dělíme je do 3 typů:
- - I. typ: izolované monoklonální kryoglobuliny (paraproteiny IgM /nejčastěji IgM kappa/, vzácněji IgG, IgA nebo monoklonální lehké řetězce)
- - II. typ: smíšené kryoglobuliny (kombinace paraproteinu s polyklonálním imunoglobulinem, obvykle paraprotein IgM /nejčastěji IgM kappa/ 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 předehříván; někdy se doporučuje před elektroforézou inkubace séra s merkaptoethanolem nebo dithiothreitolem.
- Ještě vzácnější než kryoglobuliny jsou tzv. **pyroglobuliny** – monoklonální imunoglobuliny ireverzibilně precipitující při teplotě 56°C.

Kryoprecipitát

ve vzorku séra a plazmy

po trojím promytí chladným fyziologickým roztokem



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 = Free Light Chains)

- 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^{TM})**:**
- sérum: free kappa 3,3-19,4 mg/L, free lambda 5,7 – 26,3 mg/L; **poměr fκ/fλ** 0,26 – 1,65
- Moč: free kappa 5,4 ± 4,95 mg/L, free lambda 3,17 ± 3,3 mg/L; průměrný poměr fκ/fλ 0,46-4,0 (první ranní moč)

- **Klinický význam** stanovení v séru - marker maligního myelomu, vhodný ke sledování pacientů (drahé ⇒ nevhodný jako screeningový test)
- Stanovení v moči není doporučováno *(řada možných interferencí)* !

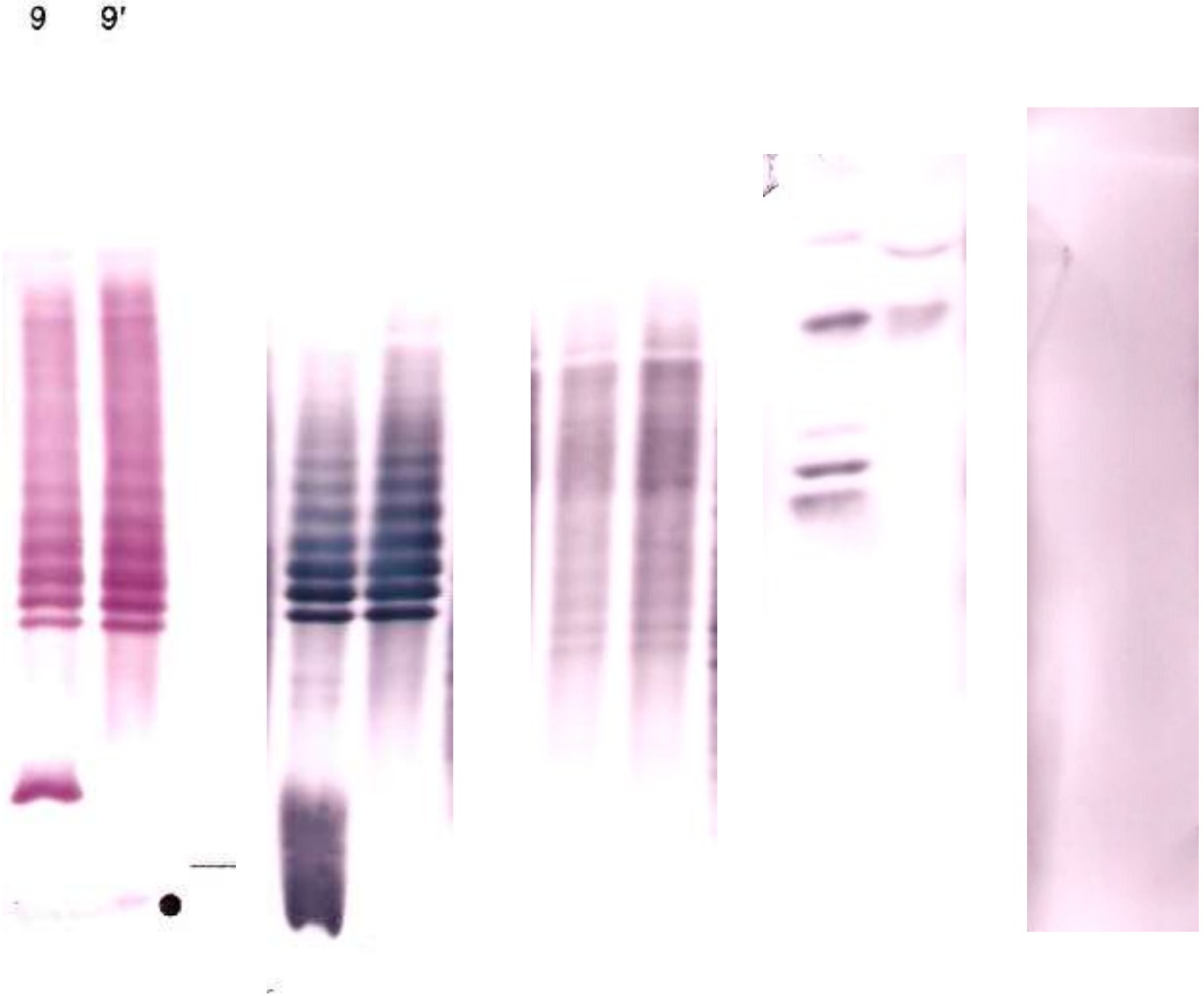
Referenční meze FLCκ, FLCλ a poměru FLCκ/FLCλ při použití souprav dvou hlavních výrobců

Souprava	firma	Použitá protilátka	FLC κ (mg/L)*	FLC λ (mg/L)*	Poměr FLCκ/FLCλ**
Freelite™	The Binding Site	Polyklonální ovčí	3,3 – 19,4	5,7 – 26,3	0,26 – 1,65
N Latex FLC™	Siemens Healthineers	Monoklonální myší (směs)	6,7 – 22,4	8,3 – 27,0	0,31 – 1,65
* 95% referenční interval (percentil 2,5 – 97,5); ** minimum - maximum					

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

Zleva doprava:

IgG (IEF/IF, Sebia), IgGκ, IgGλ, free κ, free λ (IEF/AIB)



Reaktanty akutní fáze

Definice: Sekreční proteiny jaterních buněk, jejichž tvorba a uvolnění do cirkulace jsou regulovány prozánětovými cytokiny

(Maruna P. Proteiny akutní fáze. Maxdorf, Praha 2004. ISBN 80-85912-05-8)

- **„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):

transferin, 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 arthritis, 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)
- Opsonizace fragmentů nukleových kyselin a histonů $\Rightarrow$ jejich rychlejší odstranění $\Rightarrow$ zábrana tvorby autoprotilátek proti jaderným strukturám

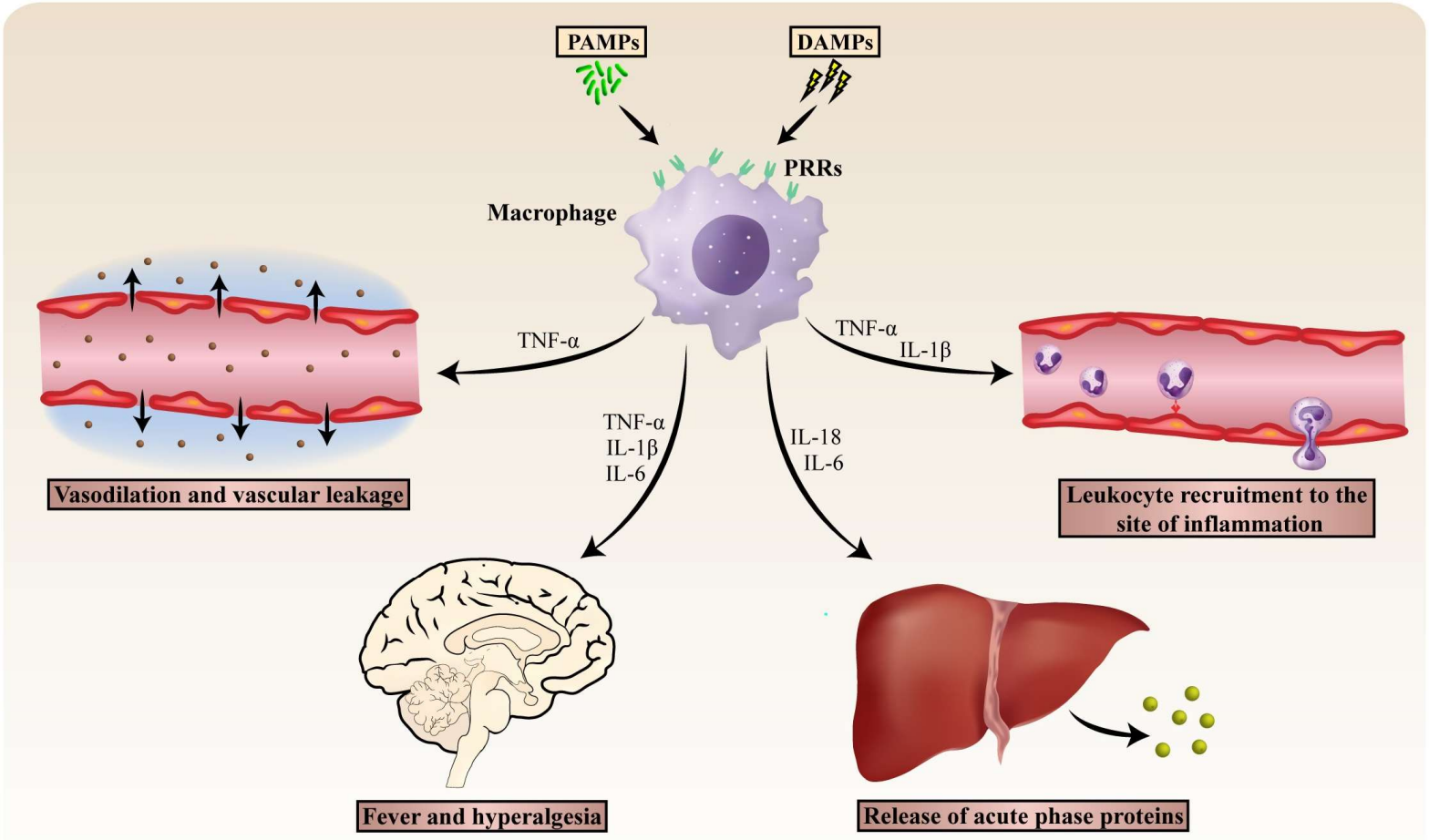
Další markery bakteriálního zánětu

(ke stanovení nutné použít vysoce citlivé imunoanalytické 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 baktérií
- 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

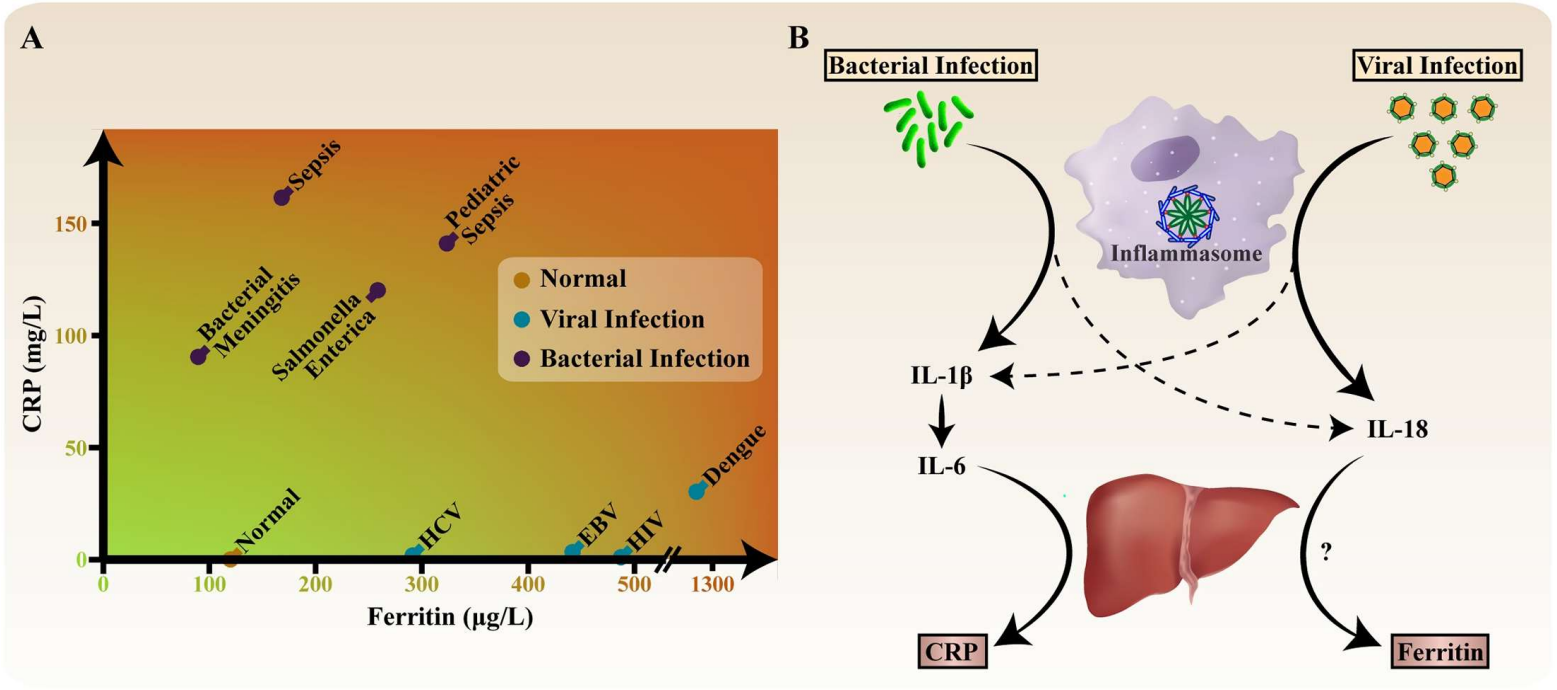
Akutní zánětlivá odpověď zprostředkovaná uvolněním prozánětlivých cytokinů

Slaats J et al. *PLoS Pathog* 2016;12:e1005973



CRP a ferritin u bakteriálních a virových zánětů

Slaats J et al. *PLoS Pathog* 2016;12:e1005973



SIRS (systemic inflammatory response syndrome) a sepse

SIRS

(Chakraborty RK, Burns B, StatPearls Publishing 2021)

- Přehnaná obranná odpověď organismu na poškozující stresor (infekce, trauma, operační zákroky aj.)
- Zahrnuje uvolnění reaktantů akutní fáze, které jsou přímými mediátory rozsáhlých autonomních, endokrinních, hematologických a imunologických změn u postižené osoby
- Navzdory svému obrannému účelu může dysregulovaná cytokinová bouře způsobit masivní zánětlivou kaskádu vedoucí k orgánové dysfunkci a dokonce i smrti

Sepse

- Život ohrožující orgánová dysfunkce způsobená dysregulovanou odpovědí hostitele na infekci (Singer M et al. JAMA 2016)
- SIRS se (suspektním) zdrojem infekce (Chakraborty RK, Burns B 2021)
- tj. **prakticky všichni pacienti se sepsí mají SIRS, ale ne všichni pacienti se SIRS mají sepsi**

Biomarkery sepse

Biomarker	Obvyklá zkratka	Referenční rozmezí	Příklady navržených cut-off hodnot	Přibližný biologický poločas
C-reaktivní protein	CRP	<5 mg/L	50 mg/L	19 hod.
Prokalcitonin	PCT	<0.5 µg/L	2 µg/L, 10 µg/L	20 – 30 hod.
Interleukin 6	IL-6	<7 ng/L	50 ng/L	<1 hod.
Presepsin	PSEP	60 – 365 ng/L	500 ng/L 729 ng/L 1000 ng/L	4 – 5 hod.

Diagnostika sepse: Presepsin

- Solubilní N-terminální fragment molekuly CD14
- M.h. 13 kDa
- Membránový CD14 na monocytech a makrofázích rozeznává antigeny baktérií, virů a plísní (zejm. lipoproteiny)
- Po fagocytóze mikroorganismu a aktivaci signální dráhy TLR je CD14 odloučen z membrány monocytů do cirkulace
- Cut-off pro rozlišení SIRS a sepse: 327 ng/L (údaj výrobce) nebo 729 ng/L (Romualdo et al. 2014)
- Zvýšené koncentrace u pacientů starších 70 let i bez přítomnosti zánětlivého onemocnění a při výrazně snížené glomerulární filtraci

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)

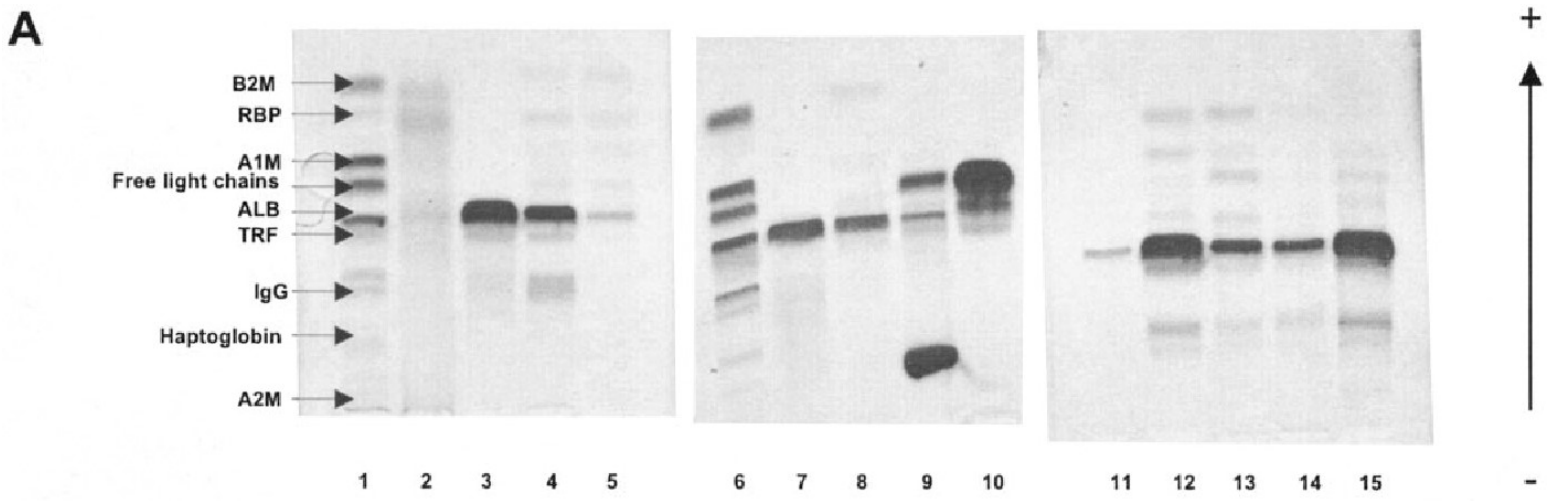
bílkovina	M.h. (kD)	Diagnostický význam; příčina	Rozhodovací meze mg/L	mg/g Kr, (mg/mmol Kr)
α_1-mikroglobulin	33	Tubulární PU; nedostatečná tubulární zpětná resorpce	< 12	< 14 (<1,58)
albumin	67	Glomerulární PU; zvýšená filtrace	< 20	< 30 (<3,40)
transferrin	76	Jako albumin	< 1,2	< 1,9 (< 0,21)
IgG	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)

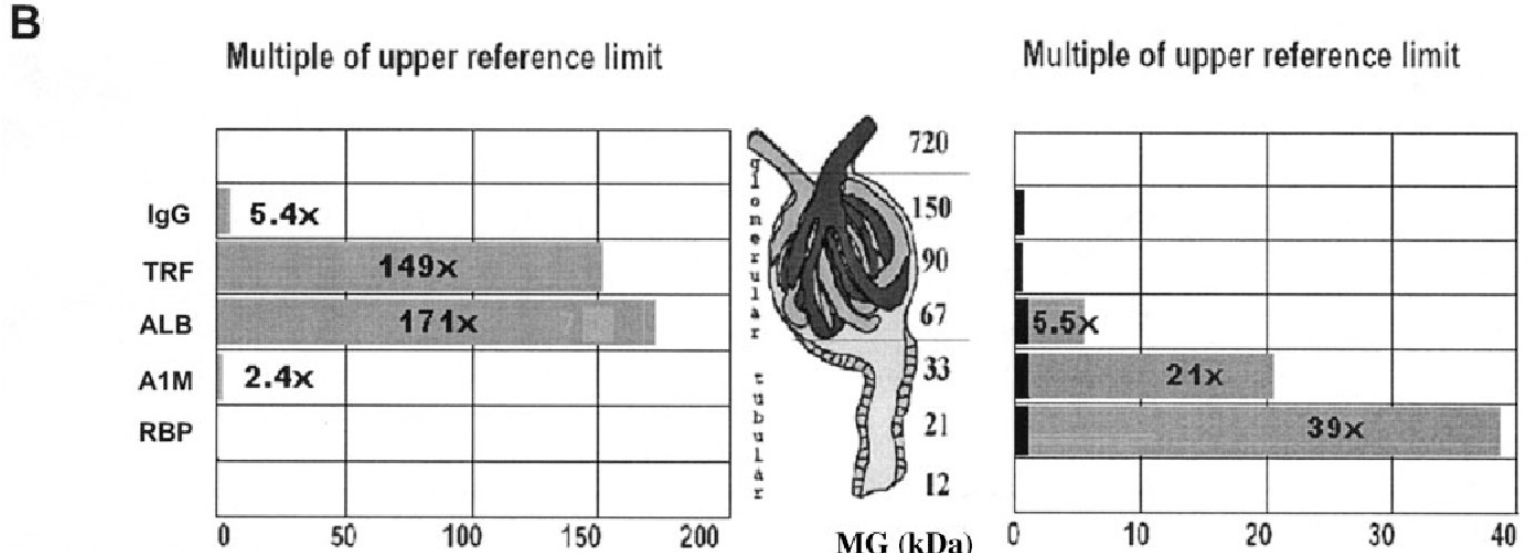
Typy proteinurie

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)	Hydrody-namický 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} :
- $Q_{Prot} = {[Prot]_{CSF}}/{[Prot]_{Serum}}$
- Podíl kvocientu zkoumaného proteinu a kvocientu albuminu označujeme jako **INDEX** zkoumaného proteinu, např.
- $IgG\ index = {Q_{IgG}}/{Q_{Alb}}$
- 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.)

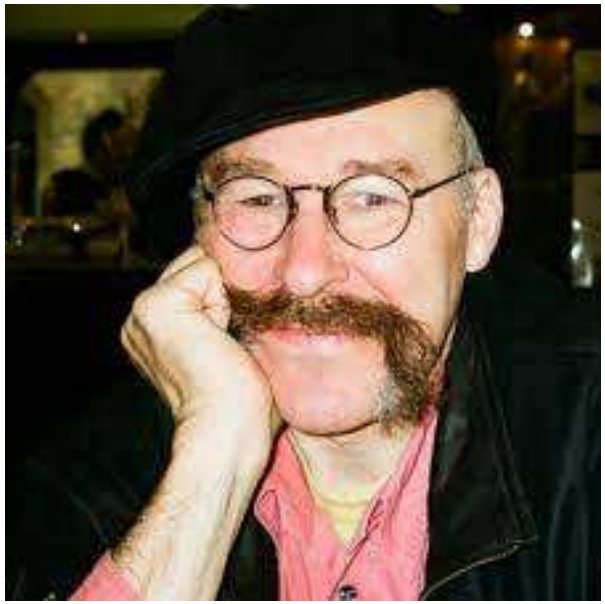
Koncentrace bílkovin v likvoru závisí i na místu odběru:

- koncentrace CB a plazmatických bílkovin je vyšší v lumbálním likvoru oproti komorovému likoru
- 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

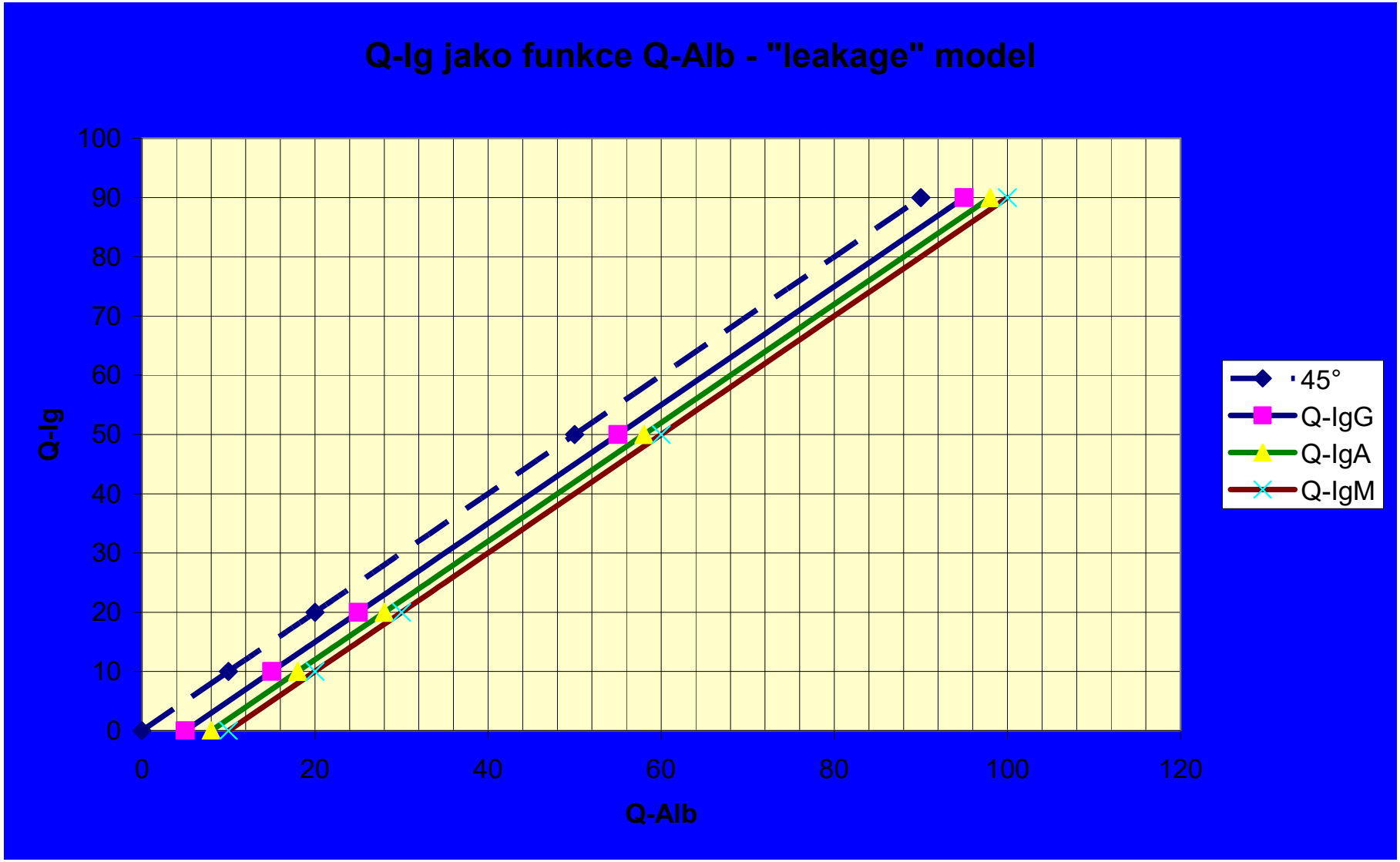
Původ bílkoviny	*Příklady*	*V:L gradient*	*S ↑ Q-alb koncentrace*
Neurony, glie	Tau-protein, NSE, S-100B	> 1	se nemění
Lepto-meningy	Beta-trace protein, cystatin C	1:11 1:3,5	lineárně stoupá
Částečně z plazmy	Transthyretin, ACE, s-ICAM	1,1:1 (TT)	
Plazmatické	Alb, IgG, IgM, IgA, …	1:2,5 (Alb)	nelineárně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

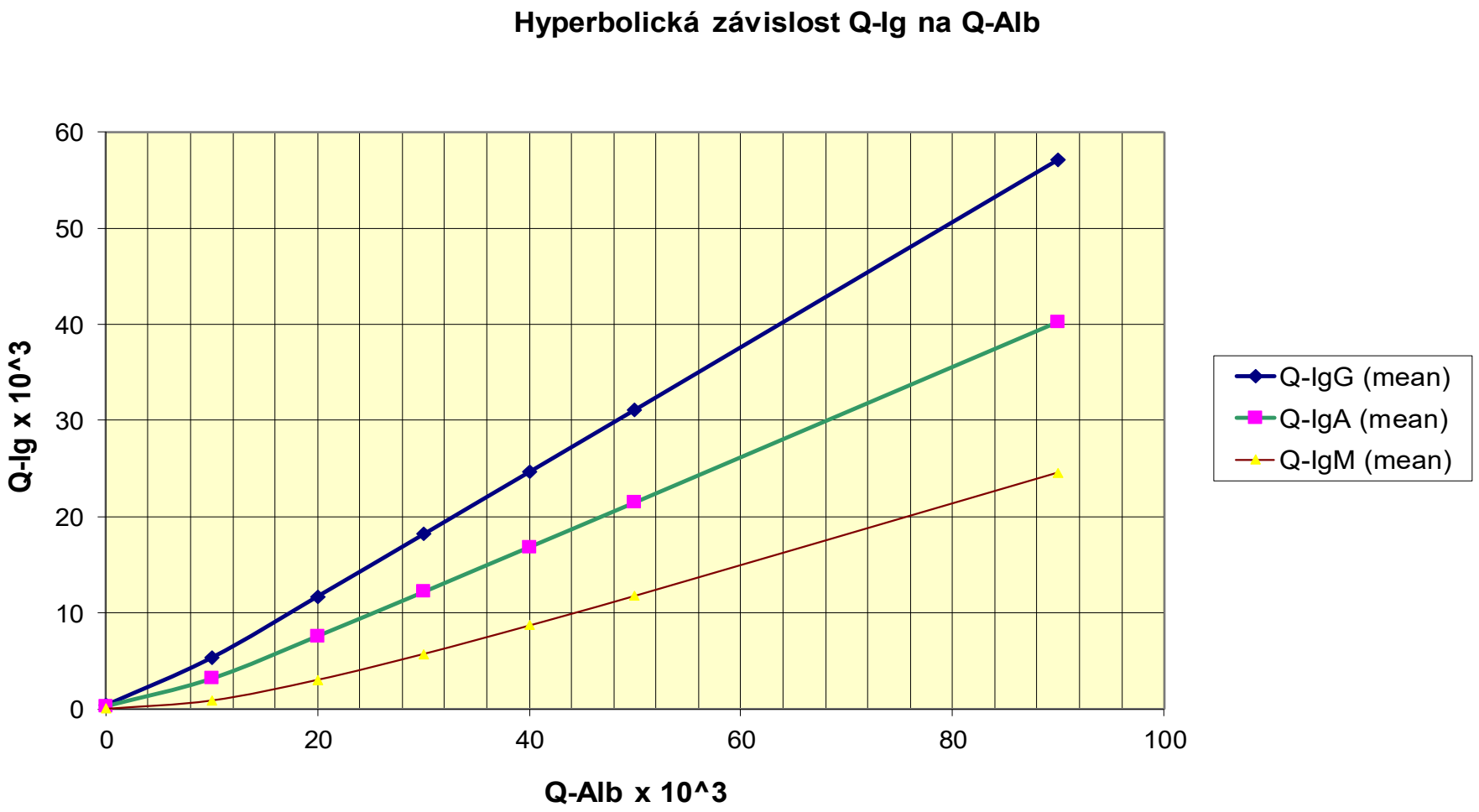
Koncepce hemato-likvorové bariéry a výpočty intrathekální syntézy imunoglobulinů

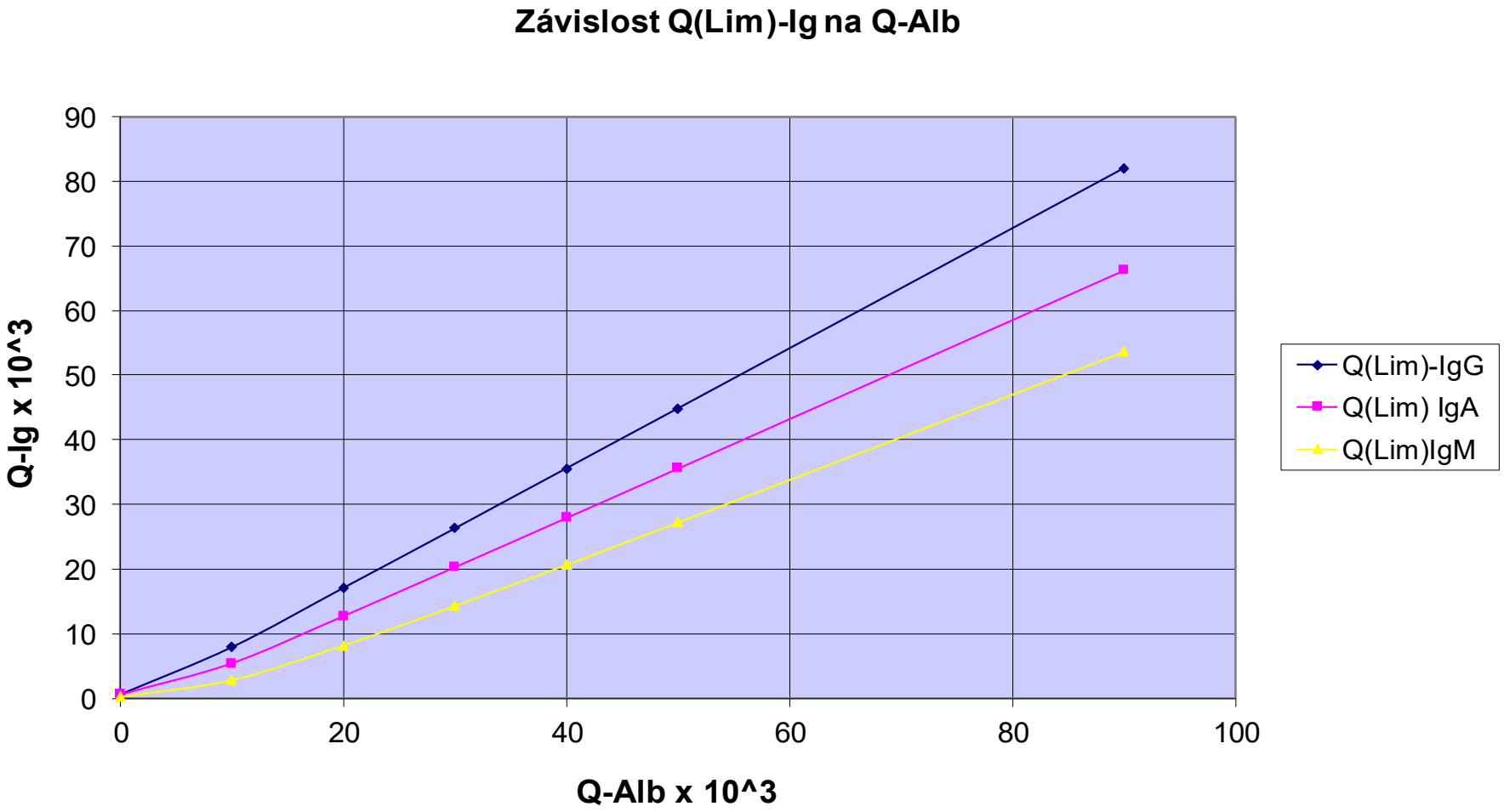
prof. Hansotto Reiber (nar. 1940) www.horeiber.de



- 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
Q-Ig
Q-Alb
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
20
40
60
80
100
120
45°
Q-IgG
Q-IgA
Q-IgM


Hyperbolická závislost Q-Ig na Q-Alb
Q-Ig x 10^3
Q-Alb x 10^3
0
10
20
30
40
50
60
0
20
40
60
80
100
Q-IgG (mean)
Q-IgA (mean)
Q-IgM (mean)


Závislost Q(Lim)-Ig na Q-Alb
Q-Ig x 10^3
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
20
40
60
80
100
Q-Alb x 10^3
Q(Lim)-IgG
Q(Lim) IgA
Q(Lim)IgM

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} = $\mathbf{Albumin_{CSF}/Albumin_{Serum}}$**
- Referenční rozmezí Q_{Alb} závisí na věku:
- $Q_{Alb} \cdot 10^3 \leq 5 + \frac{age\ (in\ years)}{15}$

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

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

(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*** (produkován pouze játry ⇒ 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 ⇒ 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:

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

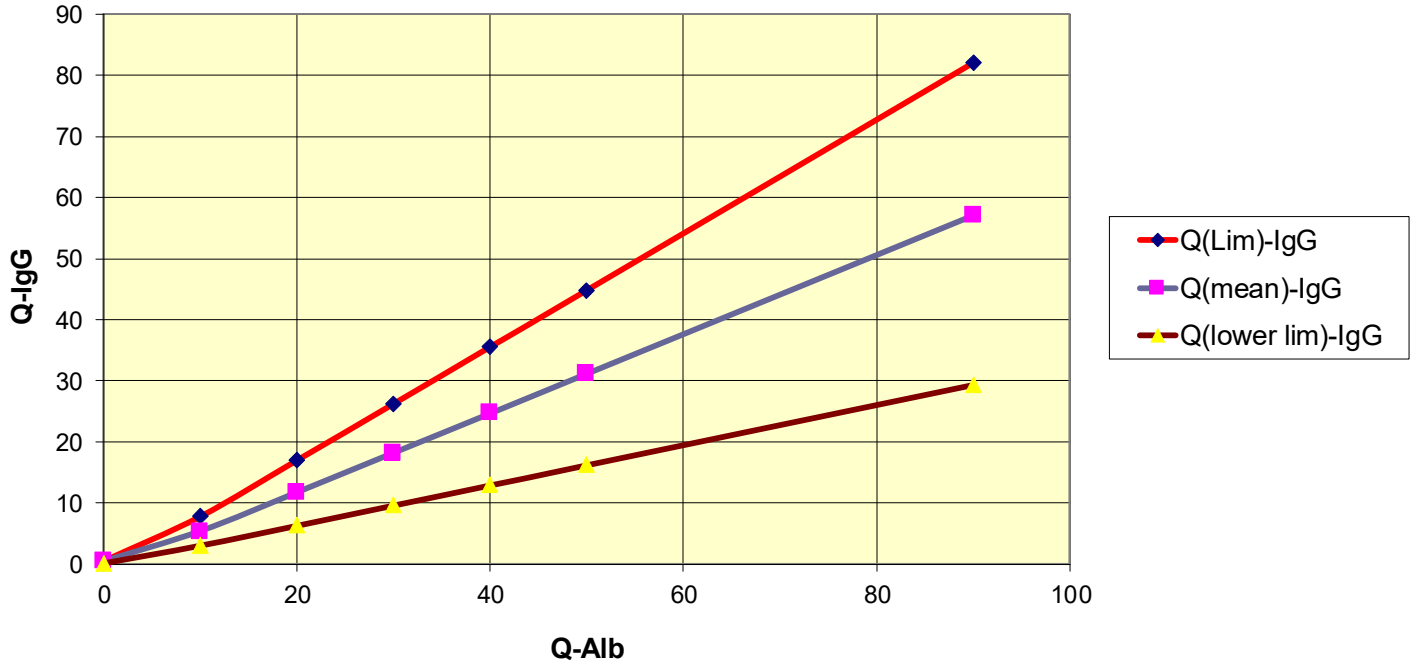
- Ig kvocient (např. IgG – podobně pro IgM, IgA, ...)

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

V nepřítomnosti intrathekální syntézy platí následující nerovnost: $\boldsymbol{Q_{Alb} > Q_{IgG} > Q_{IgA} > Q_{IgM}}$ ***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)

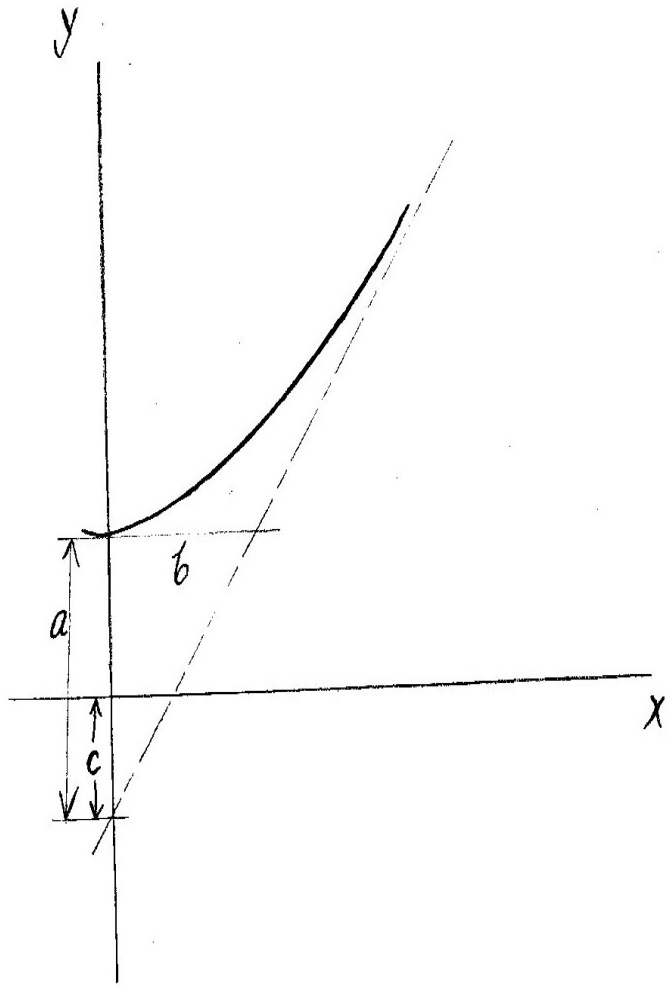


$$Q_{Ig} = \frac{a}{b}\sqrt{(Q_{Alb})^2 + b^2} - c$$

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

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

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

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

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

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)

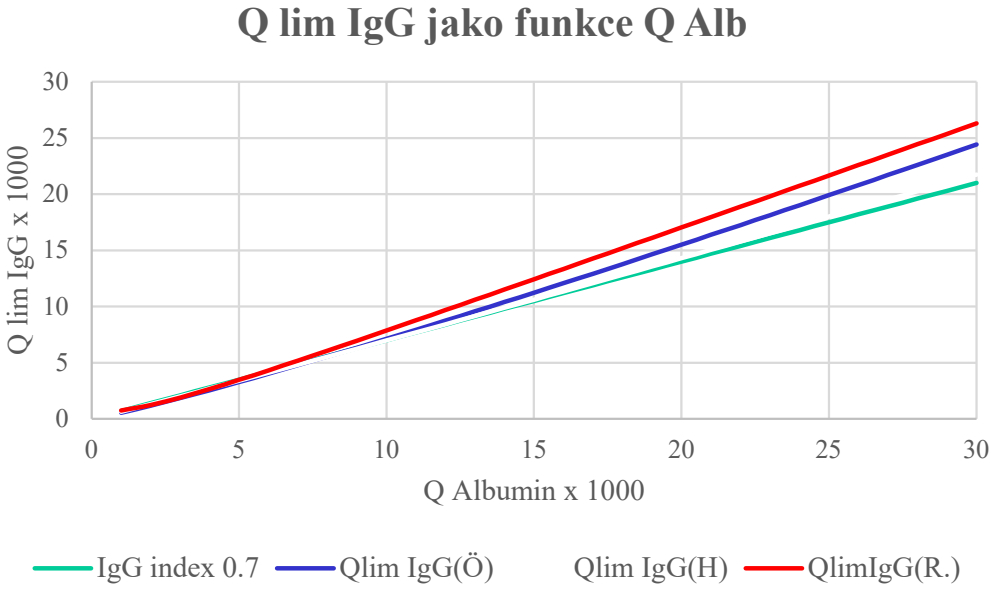
Auer M *et al.* Quantitation of intrathecal immunoglobulin synthesis – a new empirical formula. *Eur J Neurol* 2016, 23: 713-721.

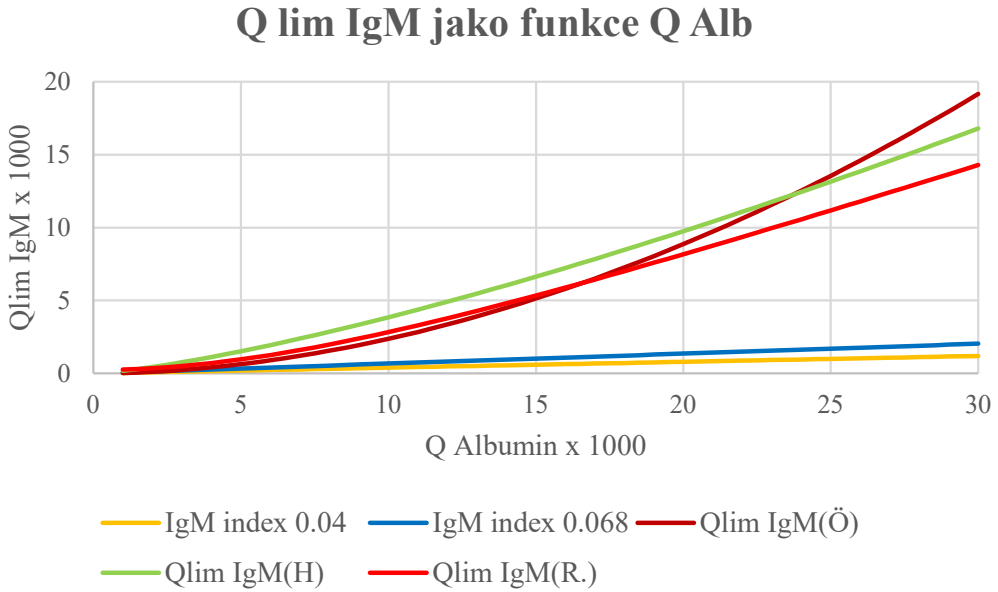
$$Q_{\lim Ig} = a \cdot Q_{Alb}^{\ b}$$

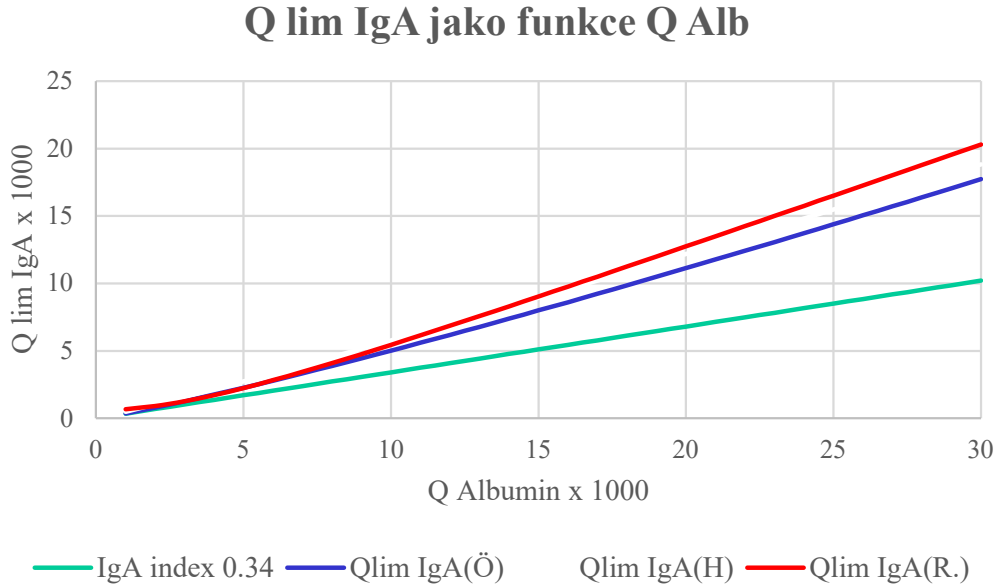
	a	*b*
IgG*	0,882	1,035
IgA*	0,819	1,076
IgM*	1,845	1,340
fKLC**	0,9358	0,6687
fKLC***	3.1276	0.8001
fLLC***	2.1138	0.8650

(*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







Vlastní výpočet intrathekální syntézy Ig

- $Ig_{loc} = \left(Q_{Ig} - Q_{\lim Ig}\right) \cdot Ig_{serum}$ [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 intrathékální 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	- Časná fáze bakteriálních meningitid a virových meningoencefalitid - Syndrom Guillain-Barré
Dominance IgG	- 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	- Neurotuberkulóza (IgA izolovaně nebo spolu s méně výraznou ith. syntézou IgG) - Mozkový absces - Někdy u HSV a VZV meningoencefalitidy
Dominance IgM	- Lymeská neuroborrelióza (IgM > IgA > IgG) - Meningoencefalitida při příušnicích (IgM + IgA + IgG) - Klíšťová meningoencefalitida - Někdy u lymfomů s postižením CNS (monoklonální IgM) - Neurotrypanosomiáza (IgM + IgA + IgG, IgM v 95% případů)
IgG + IgA + IgM	- 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)*

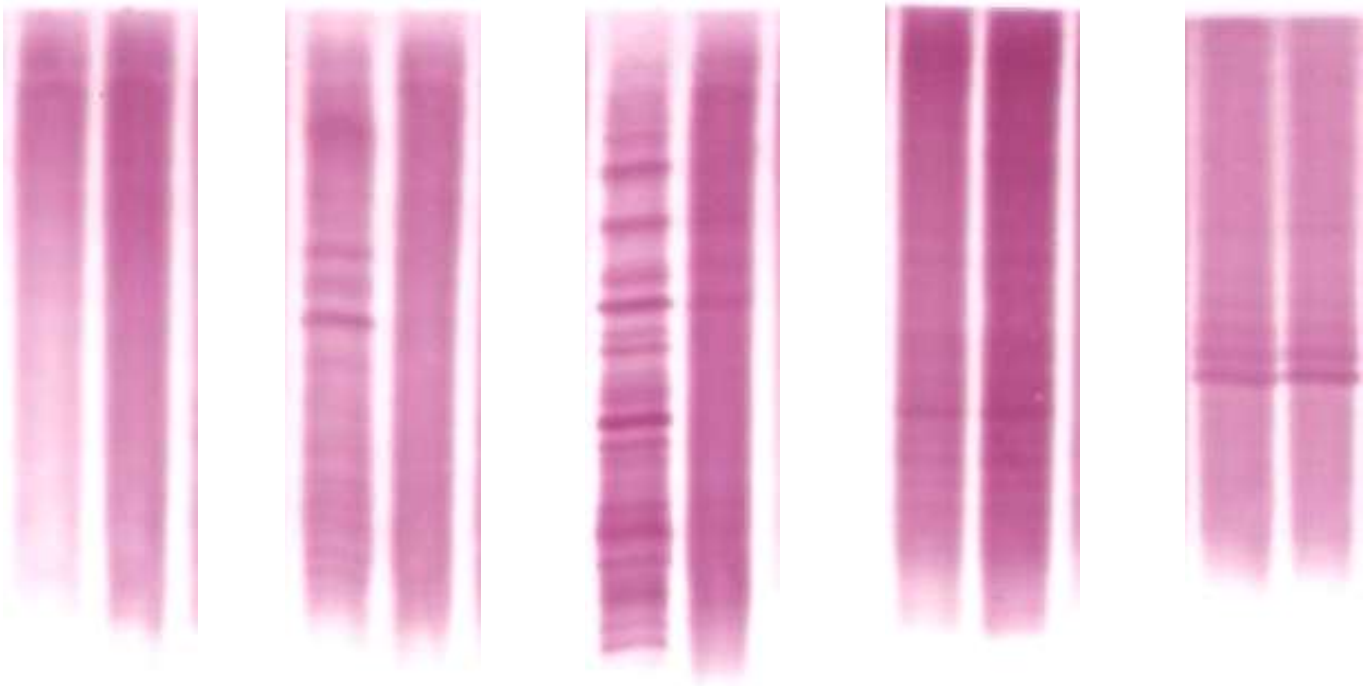
c) („imuno“)blotting *(*komerčně dostupný kit firmy *Helena BioSciences)*

d) afinitní imunoblotting (AIB)

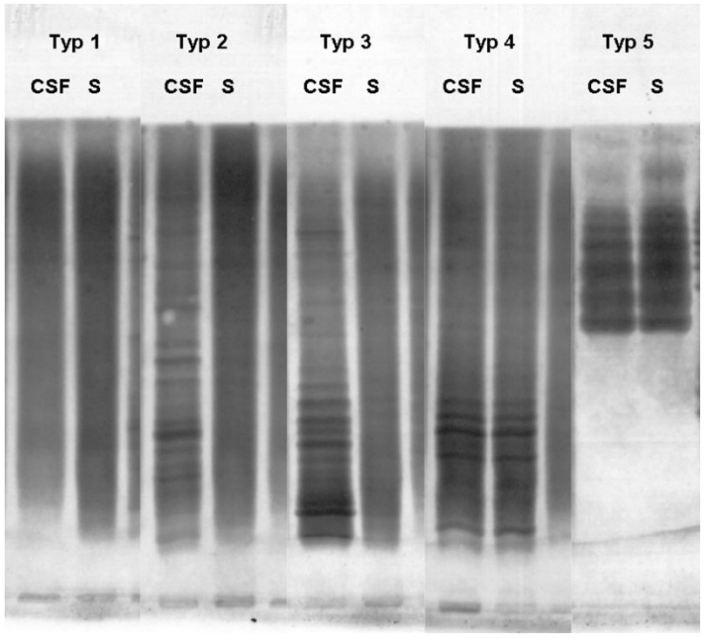
Oligoklonální IgG - typy IEF nálezu:
IEF/IF (Sebia)

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