

# Plazmatické proteiny

**Magdaléna Fořtová**

***Ústav lékařské chemie a klinické biochemie***

***2.LF UK a FN Motol***

# Bílkoviny

- ✿ Makromolekulární sloučeniny tvořené různě dlouhými polypeptidovými řetězci z proteinogenních aminokyselin (AA)
- ✿  $\text{NH}_2$  – řetězec AA –  $\text{COOH}$
- ✿ Hlavní stavební materiál buněk a tkání
- ✿ Zdroj dusíku
- ✿ V organismu neexistuje skladiště bílkovin, neustále se odbourávají a znovu tvoří
  
- ✿ Skládají se z: C (55%), O (21%), N (17%), H (7%), S, P, Fe, I, Cu, Co, Zn, Mn, Mg

- ✿ Enzymy
- ✿ Hormony
- ✿ Proteiny receptorů, regulační funkce
- ✿ Součásti buněčných membrán
- ✿ Složky výživy
- ✿ Přenos a ukládání látek (hemoglobin, albumin, transferin, ferritin)
- ✿ Pohyb (svaly, spermie, řasinky epitelů)
- ✿ Podpůrné funkce (kůže, vazivo, kosti)
- ✿ Obrana proti infekci (Ig)
- ✿ Hemokoagulace a fibrinolýza
- ✿ Transformace energie (rhodopsin)
- ✿ Vznik a přenos nervového signálu
- ✿ Kontrola růstu a diferenciacce

# Primární struktura

- ✿ **Pořadí jednotlivých AA v polypeptidovém řetězci**

- ✿ Určuje ji třípísmenný kód –

3 různé heterocyklické báze v DNA: purinové (A, G)

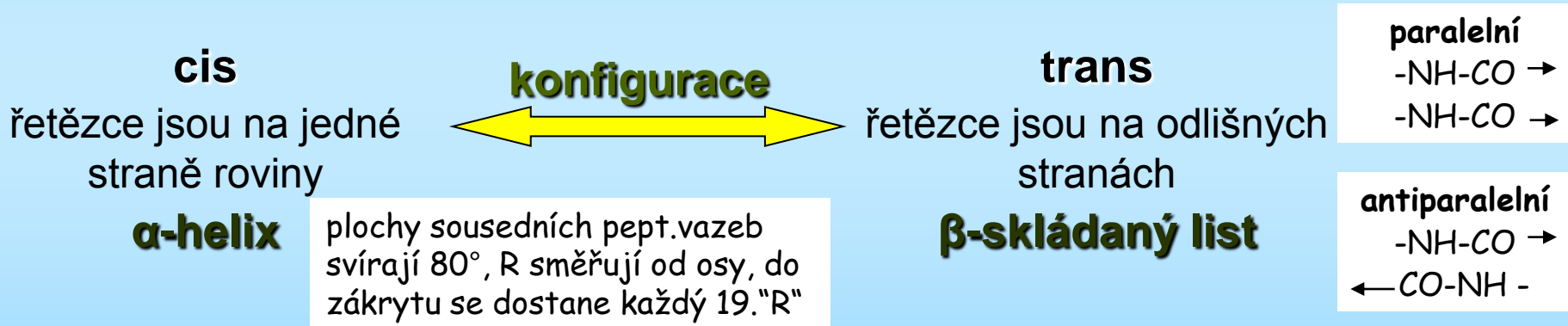
pyrimidinové (T, C)

- ✿ Transkripce: přepis do mRNA (místo T obsahuje U)

- ✿ Translace, od „N“ k „C“ konci, ribosomy čtou mRNA od 5' do 3' konce, k růstu dochází připojováním aminoacyl-tRNA na AA zbytek

# Sekundární struktura

- ✿ **Geometrické uspořádání AA v prostoru**
- ✿ interakce mezi volným el.párem „N“ a elektrony konjugované dvojně vazby mezi „C“ a „O“
- ✿ dochází k fixaci 6 atomů (4 atomy pept.vazby C, O, N, H a 2  $\alpha$ -C, obsahují různé postranní zbytky „R“)
- ✿ Atomy pept.vazby CO-NH leží v rovině, řetězec se může natočit jen kolem  $\alpha$ -C



Obě struktury udržovány hlavně „H“ můstky (mezi karb.kyslíky C=O a skupinou NH) a iontovými interakcemi mezi atomy v postranních řetězcích AA

„Pro“ nemá na peptidovém „N“ vodík, nemůže tak tvořit sekund.strukturu, vzniká charakteristická struktura **kolagenu**

Stabilní sek.struktura vznikne spojením různých peptidových řetězců nebo spojením vzdálenějších částí v daném řetězci

# Terciální struktura

## ✿ Prostorové uspořádání proteinu

### ✿ Tvoří ji:

- ✿ sekundární struktura

- ✿ iontové interakce (které jsou výsledkem reakcí mezi skupinami s opačným nábojem umístěnými v různých částech pept.řetězce)

- ✿ -S-S- můstky

- ✿ nepolární interakce (vedou ke sbalení bílk.struktury do klubíčka, ve vodném roztoku polární skupiny na povrchu, nepolární uvnitř)

- ✿ **Doména** – relativně samostatná struktura celé globulární struktury, nese charakteristické vlastnosti celé molekuly, domény vzájemně volně propojeny, můžou plnit rozdílné funkce

# Kvartéerní struktura

## \* Spojení několika řetězců

→ vznik nových kvalitativních vlastností

- \* V ní může být držen u sebe různý počet podjednotek kovalentními vazbami (IgM pentamer) nebo vodíkovými můstky a iontovými vazbami (insulin-hexamer, hemoglobin-tetramer)
- \* Celý útvar (molekula) tvořen spojenými **podjednotkami**, které mohou disociovat

## KONFORMACE BÍLKOVINY

= sekundární + terciální + kvartéerní struktura

# Denaturace bílkovin

- ✿ fyzikální vlivy: teplota, UV záření, ultrazvuk, tlak, mechanické vlivy...
- ✿ chemické vlivy: pH, organická rozpouštědla, tenzidy...
- ✿ Primární struktura zůstává zachována, významně se ovlivní sekundární, terciální a kvartérní struktura
- ✿ Většinou ireverzibilní



# Izoelektrický bod pI

- ✿ Počet kladných a záporných nábojů na povrchu bílkovin se mění podle vnějšího pH

**Při pI elektrický náboj bílkoviny navenek nulový**



**izoelektrická fokusace** k určení bílkovin

# Plazmatické proteiny

- ✿ Krevní sérum vs krevní plazma: sérum neobsahuje fibrinogen, koagulační faktory
- ✿ Mnoho druhů proteinů pocházejících z různých buněk
- ✿ Biosyntéza většiny z nich probíhá v játrech, menší část syntetizována na jiných místech: v lymfocytech (Ig), enterocytech (apolipoprotein B-48)
- ✿ Odbourávání: v hepatocytech a v mononukleárním fagocytárním systému (degradace bílkovin po vytvoření komplexů- např. antigen-protilátka, hemoglobin-haptoglobin)
- ✿ Intracelulárně hydrolyzovány proteázami a peptidázami, exkrece ledvinami

# Funkce plazmatických proteinů

- ✿ Udržování koloidně-osmotického tlaku
- ✿ Transport látek (hormony, vitaminy, lipidy, bilirubin, léky)
- ✿ Nutriční funkce
- ✿ Udržování acidobazické rovnováhy
- ✿ Hemokoagulace a fibrinolýza
- ✿ Obranné reakce organismu:
  - ✿ Specifická imunita: imunoglobuliny
  - ✿ Nespecifická imunita: složky komplementu, bílkoviny akutní fáze

# Elektroforéza plazmatických proteinů

- ✿ Elektroforéza (ELFO) založena na pohybu nabitých částic v elektrickém poli
- ✿ Stanovované látky musí mít charakter iontů nebo amfolytů
- ✿ Bílkoviny = amfolyty, které mohou nabývat kladného i záporného náboje v závislosti na pH pufru, při kterém ELFO probíhá
- ✿ Je-li směs nabitých částic vystavena působení elektrického pole, začnou se molekuly látek pohybovat
- ✿ Pohyblivost dána následujícími faktory:
  - ✿ charakterem dělené látky (velikost náboje, tvar a velikost molekuly, Mr)
  - ✿ vlastnostmi prostředí, ve kterém dělení probíhá (pH, iontová síla, napětí, proud)

# Elektroforéza plazmatických proteinů

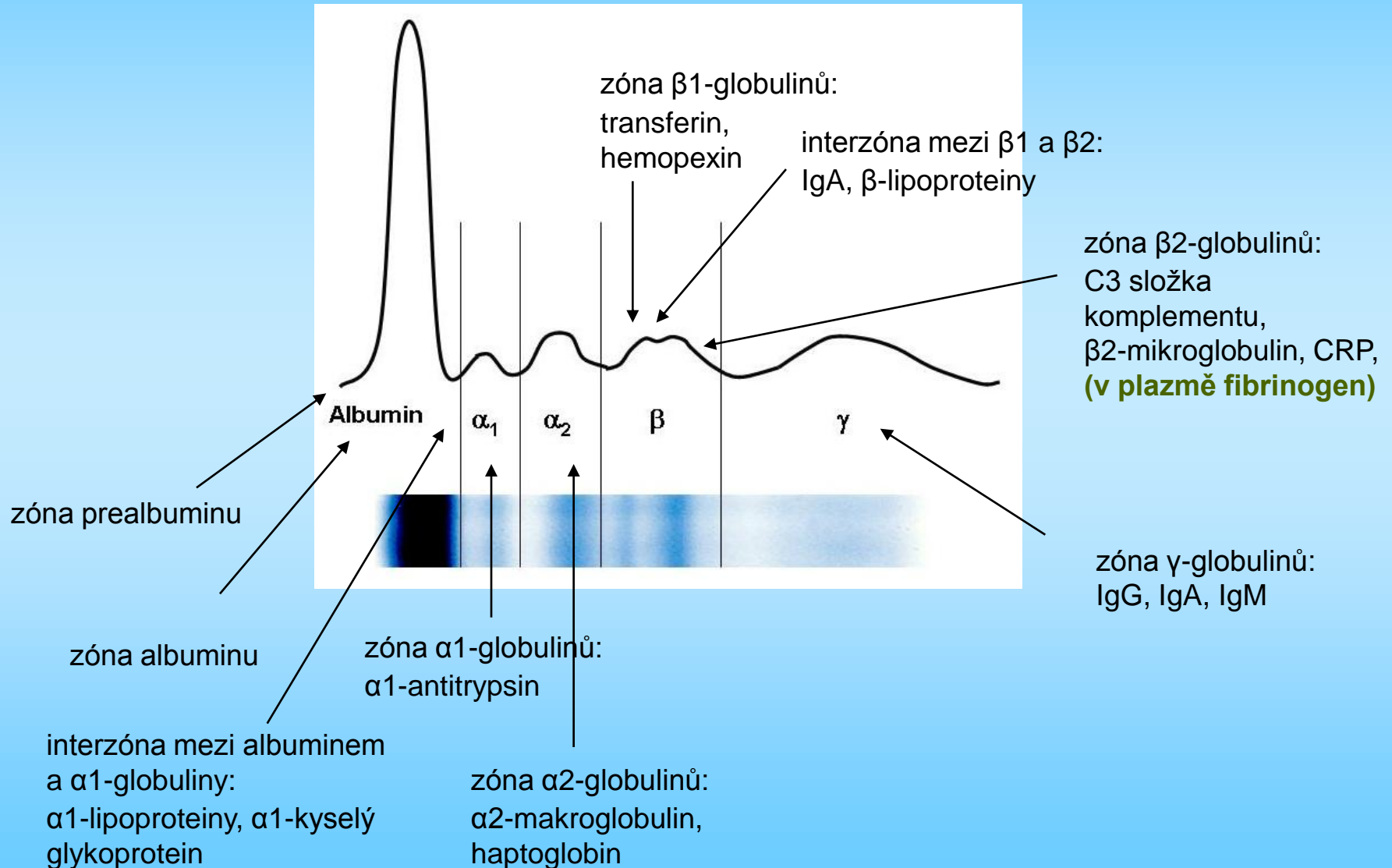
- ✿ Pozitivně nabité molekuly proteinů lépe adsorbují než negativně nabité molekuly => při ELFO využívány negativní náboje
- ✿ Izoelektrický bod většiny plazm.bílkovin: pH 5-6
- ✿ V prostředí alkalického pufru (pH 8,6) budou převažovat záporné náboje a jejich pohyb bude směřovat s různou rychlostí k anodě
- ✿ Albumin má nejvyšší negativní náboj, nejrychlejší
- ✿ Nosiče: acetátcelulózové fólie, agarózový gel
- ✿ 5-6 frakcí: albumin,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ),  $\gamma$  frakce

# Elektroforéza plazmatických proteinů

## Provedení:

- ✿ Kapka séra je přidána na sklíčko s elektroforetickým agarózovým gelem a rozprostřena na „startovací čáře“, kolmo na směr budoucího elektrického pole.
- ✿ Poté vystavena účinkům elektrického pole v elektroforetické vaně.
- ✿ Proteiny migrují v agarózovém gelu.
- ✿ Po uplynutí určité doby (např. 30 min při napětí 120 V) se bílkoviny v gelu denaturují („fixují“), např. působením alkoholu (metanolu) a kyselin (kyseliny octové), tím se zabrání jejich difuzi nebo vymytí z gelu.
- ✿ Poté se obarví vhodným organickým barvivem (např. amidočerní).
- ✿ **Poloha jednotlivých frakcí a koncentrace bílkovin v nich se hodnotí denzitometricky.**

# Elektroforéza plazmatických proteinů



# Prealbumin (transthyretin)

- ✿ Mr 54 000
- ✿ Funkce: vazba hormonů štítné žlázy a retinol vázajícího proteinu
- ✿ Poločas: 2 dny
- ✿ Referenční meze: 0,2-0,4 g/l
- ✿ Snížení: malnutriční stavy



# Albumin



- ☀ Mr 68 000
- ☀ Hlavní plazmatická bílkovina
- ☀ V játrech syntetizováno cca 12 g/d, tvorba závisí na příjmu aminokyselin
- ☀ Poločas: 15-20 dní
- ☀ Hlavní role: udržování koloidně-osmotického tlaku v těle, (hodnoty < 20 g/l => edémy)
- ☀ Nejvýznamnější transportní protein: VMK,  $\text{Ca}^{2+}$  (ovlivněno pH),  $\text{T}_3$ ,  $\text{T}_4$ , steroidní látky, bilirubinu, ŽK, Cu, léky (ATB, Warfarin), vitaminy, hem
- ☀ Proteinová rezerva organismu, zdroj Ak
- ☀ Referenční meze: 35-53 g/l (podílí se z 55-65 % na hodnotě celkové bílkoviny)
- ☀ Snížení: katabolismus, hepatopatie, ztráty bílkovin, malnutrice

**Interzóna  
mezi albuminem  
a  $\alpha_1$ -globuliny**

# $\alpha_1$ -lipoprotein

- ✿ Mr 180 000 – 360 000
- ✿ Lipoprotein o vysoké hustotě (HDL)
- ✿ Transport cholesterolu do jater
- ✿ Referenční meze Apo A-I: 1,0-1,6 g/l

# $\alpha_1$ -kyselý glykoprotein (orosomukoid)

- ✿ Mr 40 000
- ✿ Poločas: 5 dní
- ✿ Referenční meze: 0,5-1,2 g/l
- ✿ Vazba lipofilních látek (např. progesteronu a některých léků)
- ✿ Podílí se na regulaci imunitní odpovědi
- ✿ Zvýšení: zánět

**$\alpha_1$ -globuliny**

# $\alpha_1$ -antitrypsin ( $\alpha_1$ -inhibitor proteáz)

- ✿ Mr 54 000
- ✿ Poločas: 4 dny
- ✿ Referenční meze: 0,9-2,0 g/l
- ✿ Inhibitor lyzomálních proteáz  
(elastázy z polymorfonukleárních leukocytů)
- ✿ Vrozená deficiencie může být příčinou onemocnění plic  
(emfyzém) a jater (cirhóza)
- ✿ Zvýšení: akutní zánět

# $\alpha_1$ -fetoprotein

- ✿ Mr 69 000
- ✿ Poločas: 3,5 dny
- ✿ Referenční meze: < 7,5  $\mu\text{g/l}$
- ✿ Fyziologicky produkován fetálními játry a žloutkovým váčkem
- ✿ Hlavní protein fetálního séra
- ✿ Fyziologicky přítomen v séru těhotných žen
- ✿ Zvýšení: hepatom, nádory varlat a ovárií, některé malignity GIT

**$\alpha_2$ -globuliny**



# Haptoglobin

- ✿ Mr 85 000 – 1 000 000
- ✿ Existuje ve třech fenotypech, jeden z nich má tendenci vytvářet polymery o vysoké molekulové hmotnosti
- ✿ Poločas: 2 dny
- ✿ Referenční meze: 0,3 – 2,0 g/l
- ✿ Vychytává volný hemoglobin
- ✿ Zvýšení: akutní zánět
- ✿ Snížení: hepatopatie, intravaskulární hemolýza (konzumpce haptoglobinu)

# $\alpha_2$ -makroglobulin

- ✿ Mr 720 000, ze 4 subjednotek o  $M_r$  180 000, propojených do dvou párů disulfidickými vazbami, dvojice subjednotek v nativním tetrameru vázány nekovalentně
- ✿ Poločas: 5 dní
- ✿ Referenční meze: 1,3 – 3,0 g/l
- ✿ Nespecifický inhibitor proteáz (trombin, trypsin, chymotrypsin, pepsin)
- ✿ Vliv na proces srážení a fibrinolytický systém (inhibuje proteázy uvolněné z leukocytů), tím je do jisté míry schopen substituovat funkci  $\alpha_1$ -antitrypsinu
- ✿ Transport malých proteinů (cytokiny, růstové faktory) a dvojmocných iontů ( $Zn^{2+}$ )
- ✿ Díky velmi vysoké molekulové hmotnosti neprojde ani poškozenou glomerulární membránou
- ✿ Zvýšení: akutní zánět

# Ceruloplazmin

- ✿ Mr 160 000
- ✿ Poločas: 4,5 dny
- ✿ Referenční meze: 0,2 – 0,6 g/l
- ✿ Oxidoredukční aktivita (oxidace  $\text{Fe}^{2+}$  na  $\text{Fe}^{3+}$ )
- ✿ Vazba mědi (váže až 90 % Cu v séru)
- ✿ Snížení: Wilsonova choroba (hepatolentikulární degenerace)

# Wilsonova choroba

- hepatolentikulární degenerace
- AR dědičné metabolické onemocnění  
(prevalence homozygotů 1:25 000–30 000 a asi 1:90 heterozygotů)
- **abnormální střádání mědi v játrech → způsobuje poškození jaterních buněk, v mozku (poruchy funkce CNS), hemolytická anémie**
- mutace genu ATP7B na 13. chromosomu, jenž kóduje ATPázu transportující měď
- **defekt tohoto proteinu má za následek poruchu exkrece mědi do žluče a inkorporaci mědi do apoceruloplasminu v hepatocytech**
- **Dg:**
  - snížená sérová hladina ceruloplasminu
  - zvýšené vylučování mědi močí (za 24 hod)
  - Kayserův-Fleischerův prstenec na okraji rohovky
  - hemolýza
  - zvýšený obsah mědi v játrech

**$\beta_1$ -globuliny**

# Transferrin

- ✿ Mr 77 000
- ✿ Poločas: 7 dní
- ✿ Referenční meze: 2,0 – 3,6 g/l
- ✿ Transport a vychytávání volného železa
- ✿ Zvýšení: nedostatek železa
- ✿ Snížení: malnutrice, hepatopatie, zánět

# Hemopexin

- ✿ Mr 57 000
- ✿ Poločas: 3 – 7 dní
- ✿ Referenční meze: 0,5 – 1,1 g/l
- ✿ Vazba hemu

# C4 složka komplementu

- ✿ Mr 206 000
- ✿ Poločas: 1 den
- ✿ Referenční meze: 0,1 – 0,4 g/l
- ✿ Součást komplementu
- ✿ Zvýšení: zánět
- ✿ Snížení: autoimunitní stavy



# Interzóna mezi $\beta_1$ a $\beta_2$ globuliny

# $\beta$ -lipoprotein

- ✿ Mr 2 750 000 (velmi vysoká molekulární hmotnost)
- ✿ Poločas: 3 dny
- ✿ Referenční meze Apo B-100: 0,7 – 0,9 g/l
- ✿ Lipoprotein o nízké hustotě (LDL)
- ✿ Transport cholesterolu k buňkám

**$\beta_2$ -globuliny**

# C3 složka komplementu

- ✿ Mr 180 000
- ✿ Poločas: 1 den
- ✿ Referenční meze: 0,8 – 1,4 g/l
- ✿ Součást komplementu
- ✿ Zvýšení: zánět
- ✿ Snížení: autoimunitní stavy

# $\beta_2$ -mikroglobulin

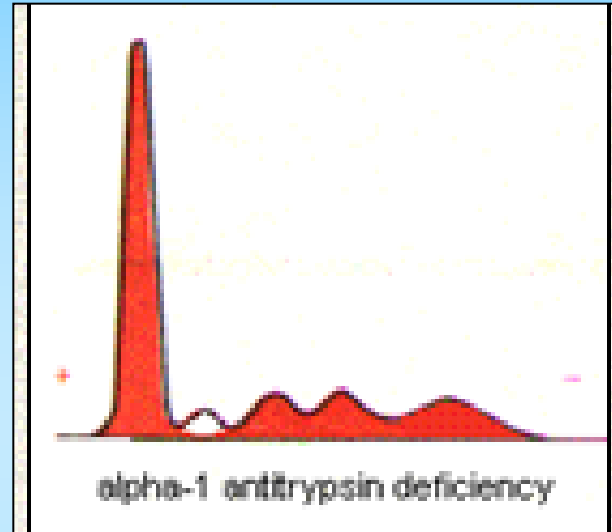
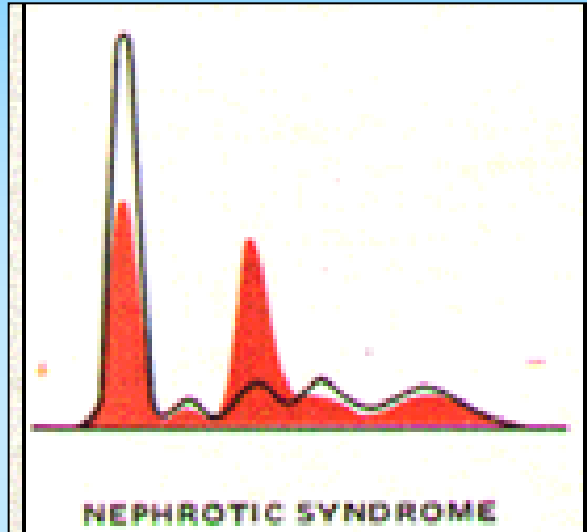
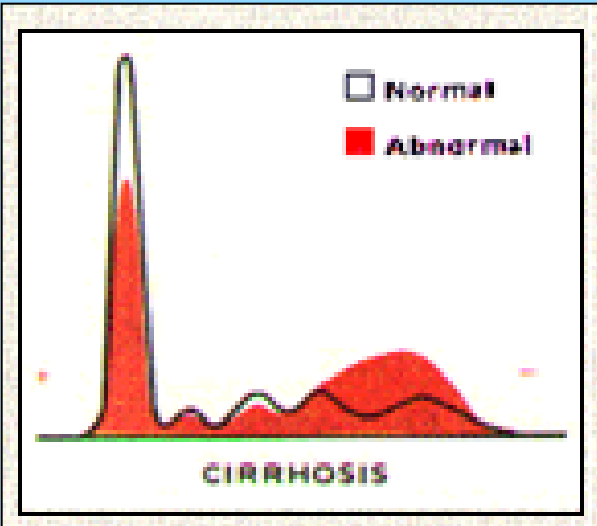
- ✿ Mr 11 800
- ✿ Referenční meze: 0,001 – 0,002 g/l
- ✿ Součást leukocytárních antigenů
- ✿ Zvýšení: hematologické malignity
- ✿ Snížení: porucha tubulární resorpce

# Fibrinogen

- ✿ Mr 340 000
- ✿ Referenční meze: 1,5 – 4,5 g/l
- ✿ Součást koagulační kaskády, prekurzor fibrinu
- ✿ **fyziologicky jen v plazmě, není v séru**
- ✿ Zvýšení: zánět

# C-reaktivní protein

- ✿ Mr 111 000
- ✿ Poločas: 19 – 24 hodin
- ✿ Referenční meze: do 6,5 mg/l
- ✿ Aktivace komplementu, úloha opsoninu
- ✿ Precipituje s tzv. C-polysacharidem pneumokoků
- ✿ Koncentrace se zvyšuje již za 4 hod po navození reakce akutní fáze, v průběhu prvních 2 dnů jeho koncentrace vzroste i >100krát, max koncentrace za 24 – 48 h
- ✿ Zvýšení: **akutní bakteriální (event. mykotické) infekce:** rychlý a vysoký vzestup (nad 60 mg/l), **virové infekce:** relativně malý vzestup (do 40 mg/l), **infarkt myokardu,** **autoimunitní onemocnění:** mírný vzestup, *mírně elevované CRP (kolem 10 mg/l): známka vysokého kardiovaskulárního rizika*





**$\gamma$ -globuliny**

# IgG

- ✿ Mr 150 000
- ✿ Poločas: 24 dny
- ✿ Referenční meze: 8 – 18 g/l
- ✿ Pozdní protilátky
- ✿ Zvýšení: (chronický) zánět

# IgA

- ✿ Mr 160 000
- ✿ Poločas: 6 dní
- ✿ Referenční meze: 0,9 – 3,0 g/l
- ✿ Protilátky slizniční imunity
- ✿ Zvýšení: záněty sliznic a jater

elektroforetická pohyblivost zahrnuje i  $\beta$ -oblast

# IgM

- ✿ Mr 900 000
- ✿ Poločas: 5 dní
- ✿ Referenční meze: 0,6 – 2,5 g/l
- ✿ Časné protilátky
- ✿ Zvýšení: akutní zánět

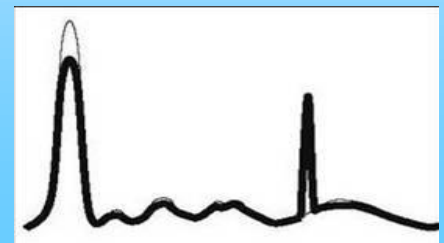
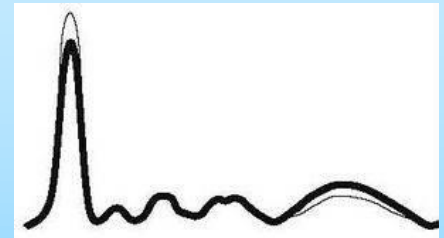
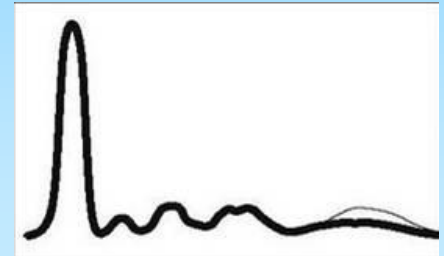
# Změny množství imunoglobulinů

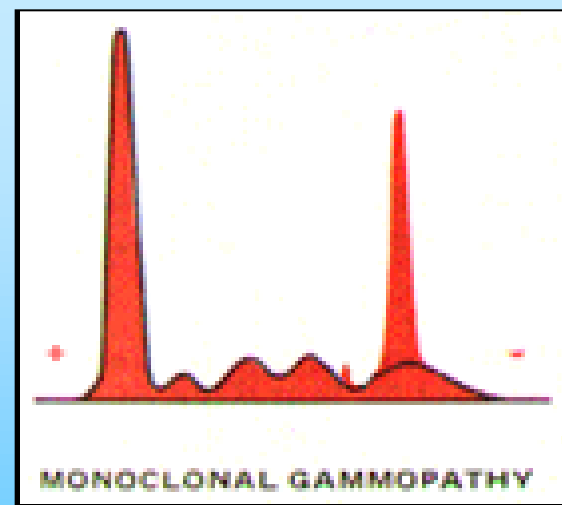
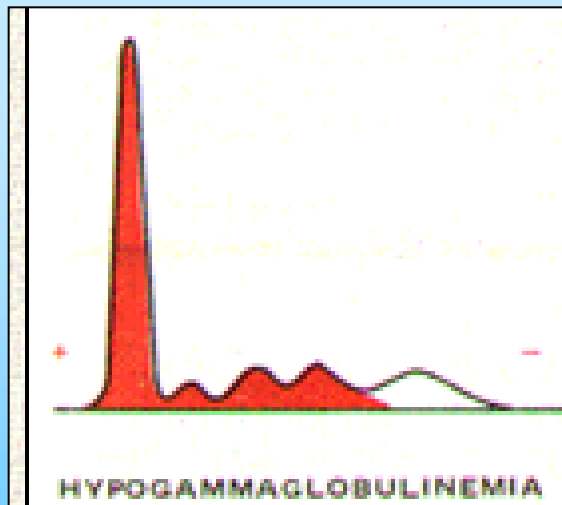
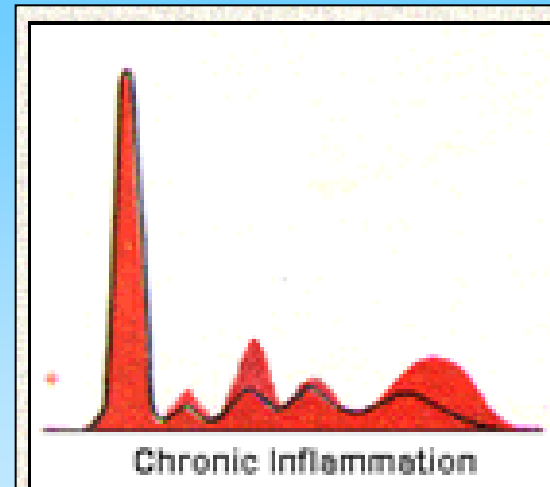
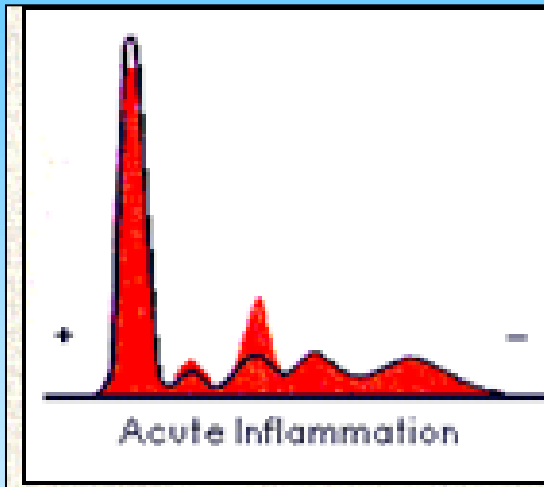
✿ Hypogamaglobulinémie (snížení vrcholu v oblasti  $\gamma$ )

✿ Hypergamaglobulinémie

- Polyklonální (zvýšení vrcholu  $\beta$ - $\gamma$  globulinu o široké bázi)

- Monoklonální (úzký vrchol v oblasti  $\beta$ - $\gamma$  globulinů)





# Hypogamaglobulinémie

- ✿ v důsledku zvýšených ztrát Ig močí nebo střevem
- ✿ nebo poklesu tvorby Ig (primární nebo sekundární imunodeficience)  
opakované infekce s těžkým průběhem

# Polyklonální hypergamaglobulinémie

- ✿ odpověď na antigenní stimulaci
- ✿ aktivace více klonů plazmatických buněk: zvýšení koncentrace 1 nebo více tříd Ig
- ✿ chronické infekce, jaterní, autoimunitní onemocnění
- ✿ široký, neostře ohraničený pruh v oblasti  $\gamma$ -globulinů



# Monoklonální hypergamaglobulinémie

- ✿ Monoklonální imunoglobuliny = paraproteiny, M-komponenta
- ✿ Imunoglobuliny nebo fragmenty imunoglobulinů produkované jediným klonem plazmatických buněk
- ✿ ELFO: úzký vrchol v oblasti  $\beta$ - $\gamma$  globulinů
- ✿ Nejčastěji třída: IgG, IgM
- ✿ Tvořeny kompletní molekulou Ig, samotnými volnými lehkými řetězci (Bence-Jonesova bílkovina), samotnými těžkými řetězci
- ✿ Plasmocytom (mnohočetný myelom), MGUS

# DIAGNOSTIKA MONOKLONÁLNÍCH GAMAPATIÍ

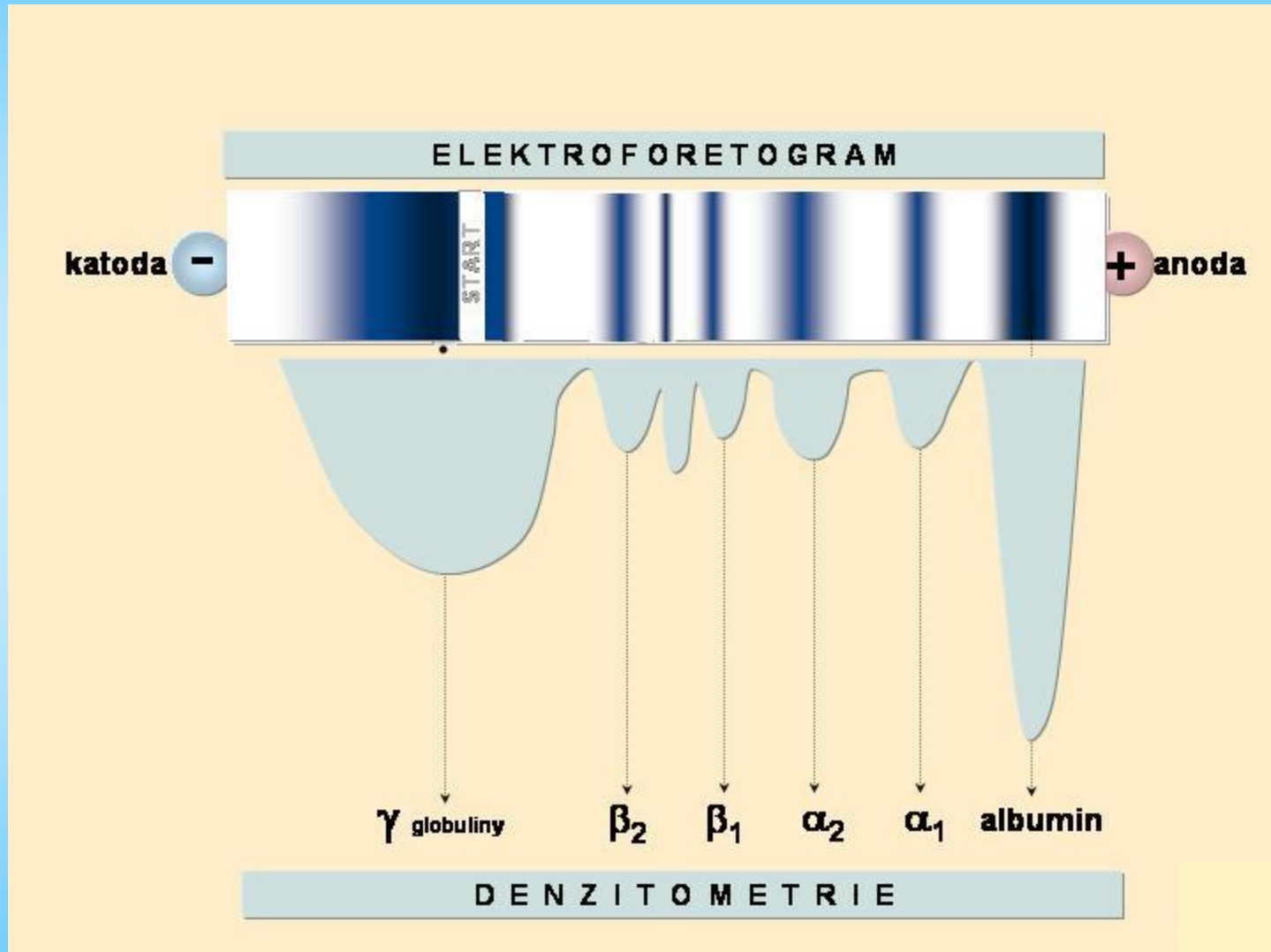
## SCREENING

- **elektroforéza séra** – detekce přítomnosti paraproteinu (M komponenty) – zóny s vysokou denzitou

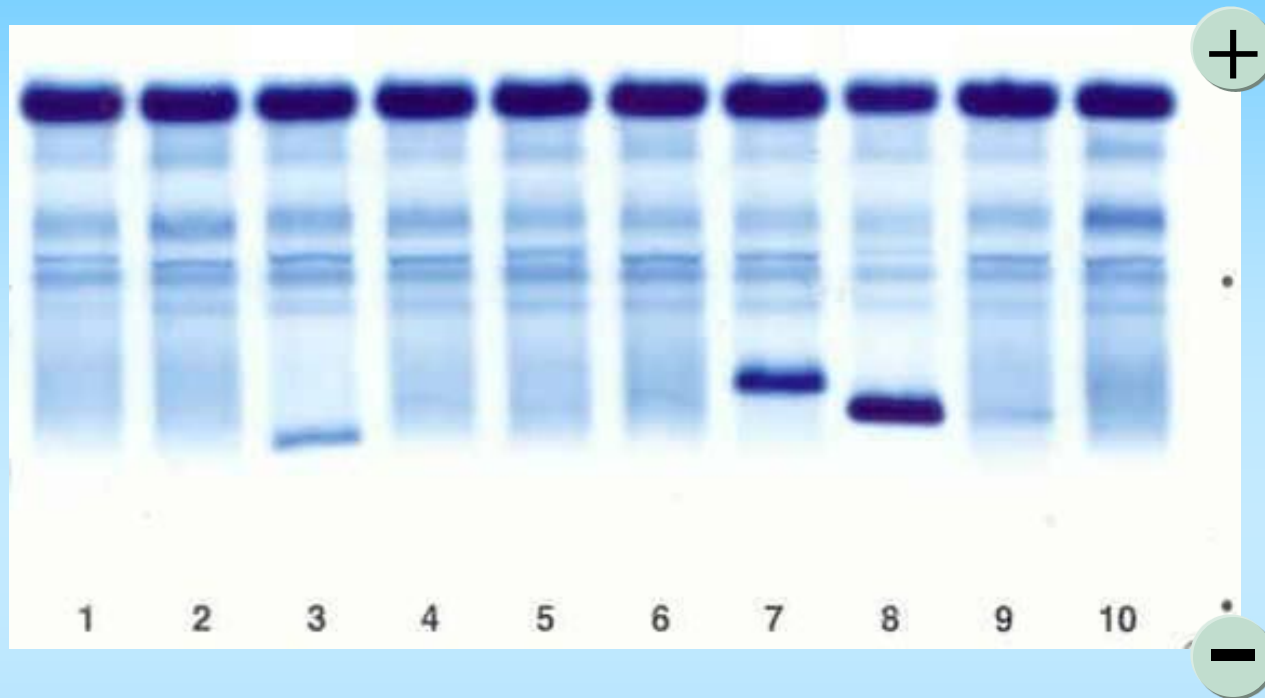
## KVANTIFIKACE

- **denzitometrické měření z elektroforézy**
- **relativní podíl paraproteinu z celkového elektroforetického obrazu v %**
- **měření celkového proteinu v séru**
- **výpočet koncentrace paraproteinu v g/l**

# ELEKTROFORÉZA



# ELEKTROFORÉZA VZORKŮ SÉRA



**LEGENDA:** vzorek č. 3:            susp. paraprotein  
                  vzorek č. 7, 8:        susp. paraprotein  
                  ostatní vzorky:    polyklonální imunoglobuliny (norm. nález)

# IMUNOFIXACE

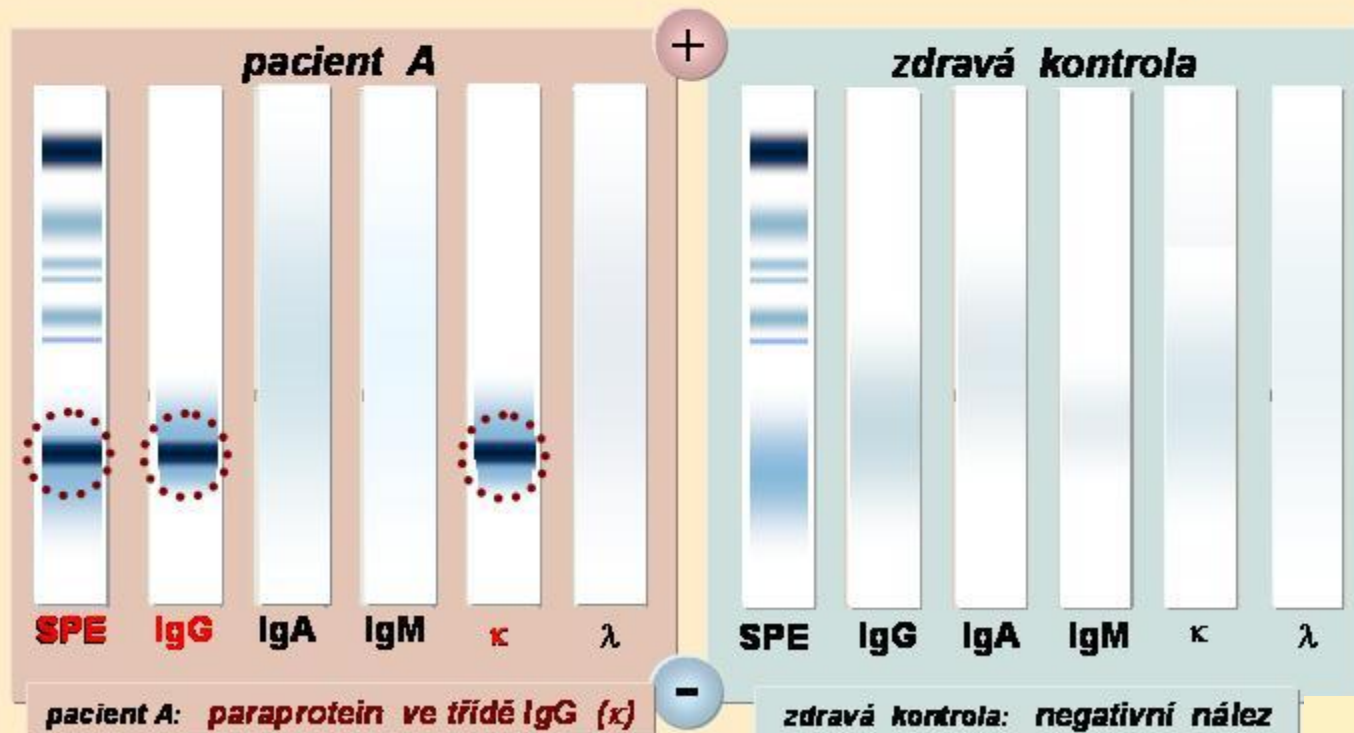
- sérum je elektroforeticky rozděleno v gelu v několika drahách
- na povrch gelu je nanášeno do každé dráhy jiné monospecifické antisérum  
(*proti IgG, IgA, IgM, kappa, lambda*)
- imunoglobuliny ze séra tvoří s monospecifickým antisérem imunokomplex (*precipitát*), který po odmytí nezreagovaných komponent je možno barvit a hodnotit

# I M U N O F I X A C E

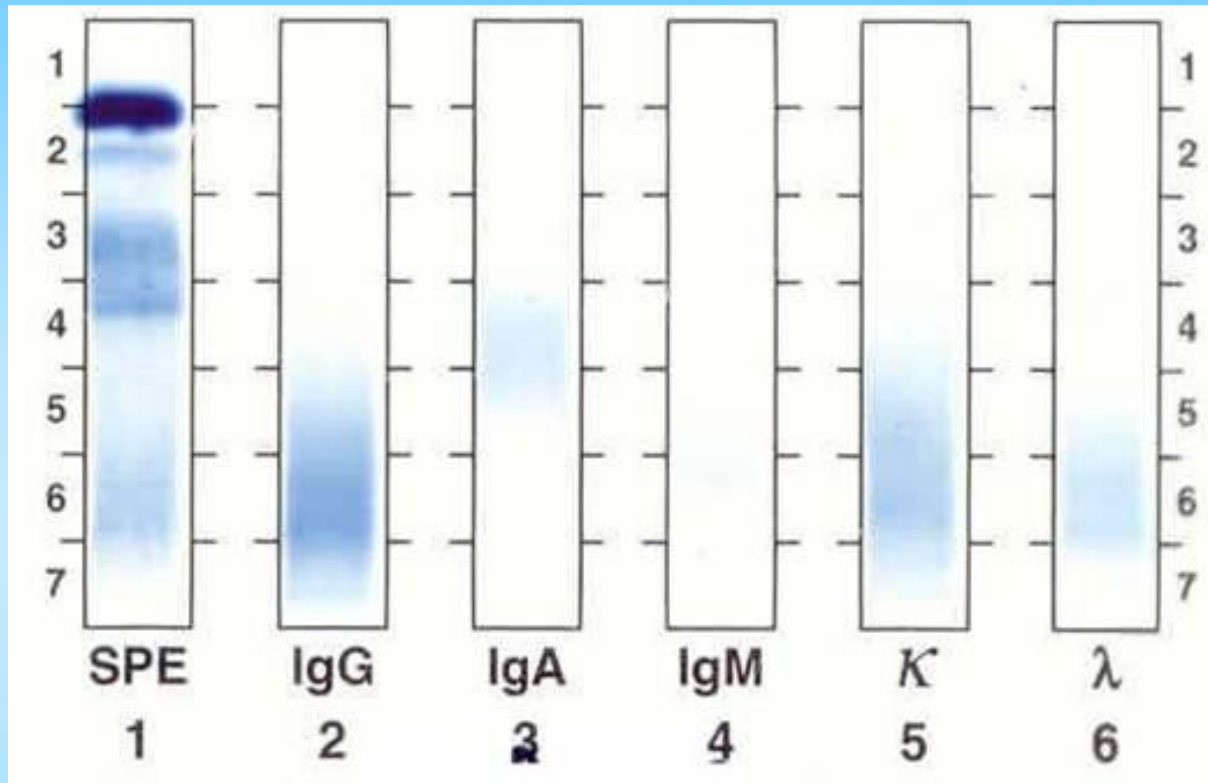
1. elektroforetické rozdělení sérových Ig

2. imunofixace - reakce sérových Ig s anti Ig

3. promytí, barvení

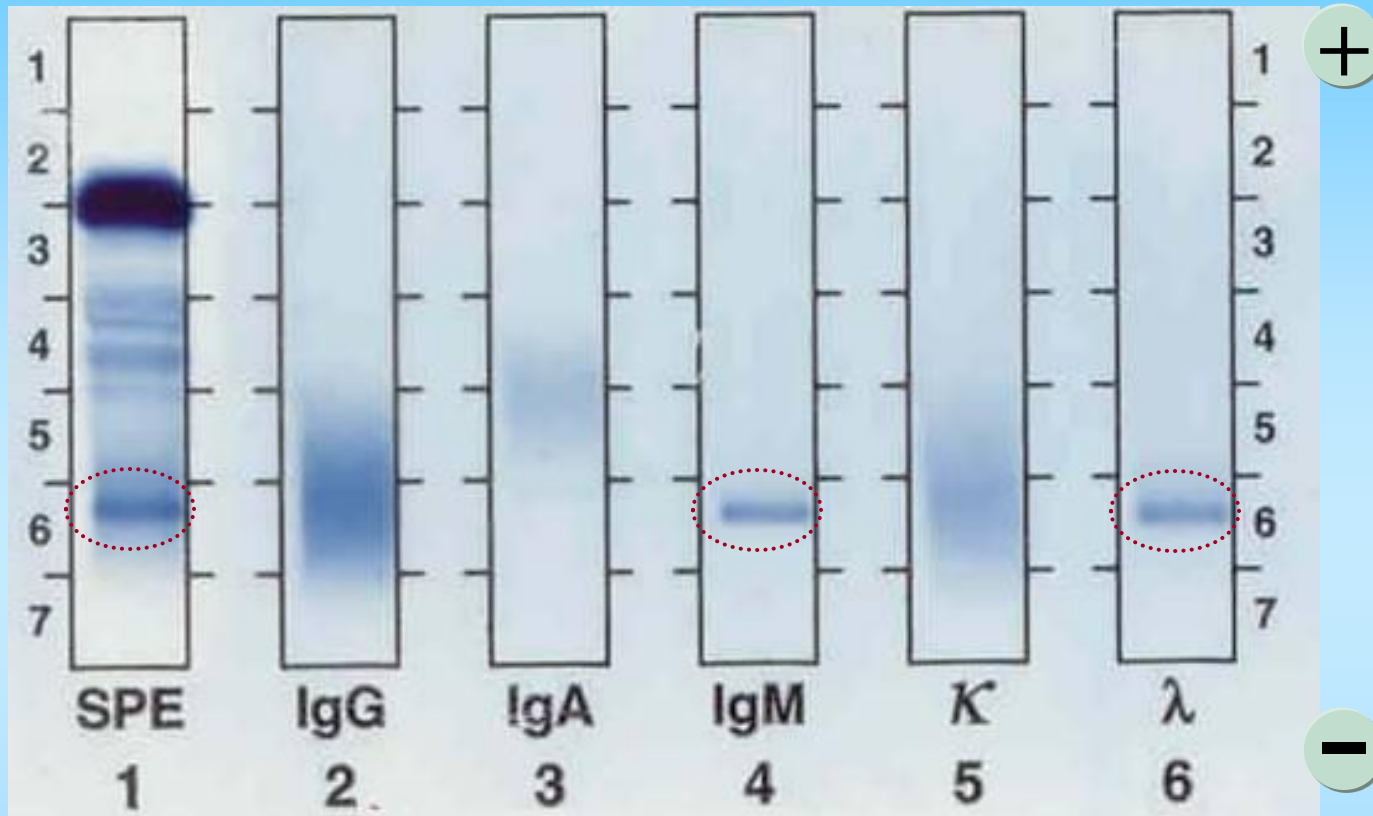


# IMUNOFIXACE VZORKU SÉRA ZDRAVÉ OSOBY



**LEGENDA:**    sloupec č. 1:    elektroforéza séra  
další sloupce:    imunochemický průkaz jednotlivých  
těžkých a lehkých řetězců  
imunoglobulinů,  
je zřetelná polyklonální produkce

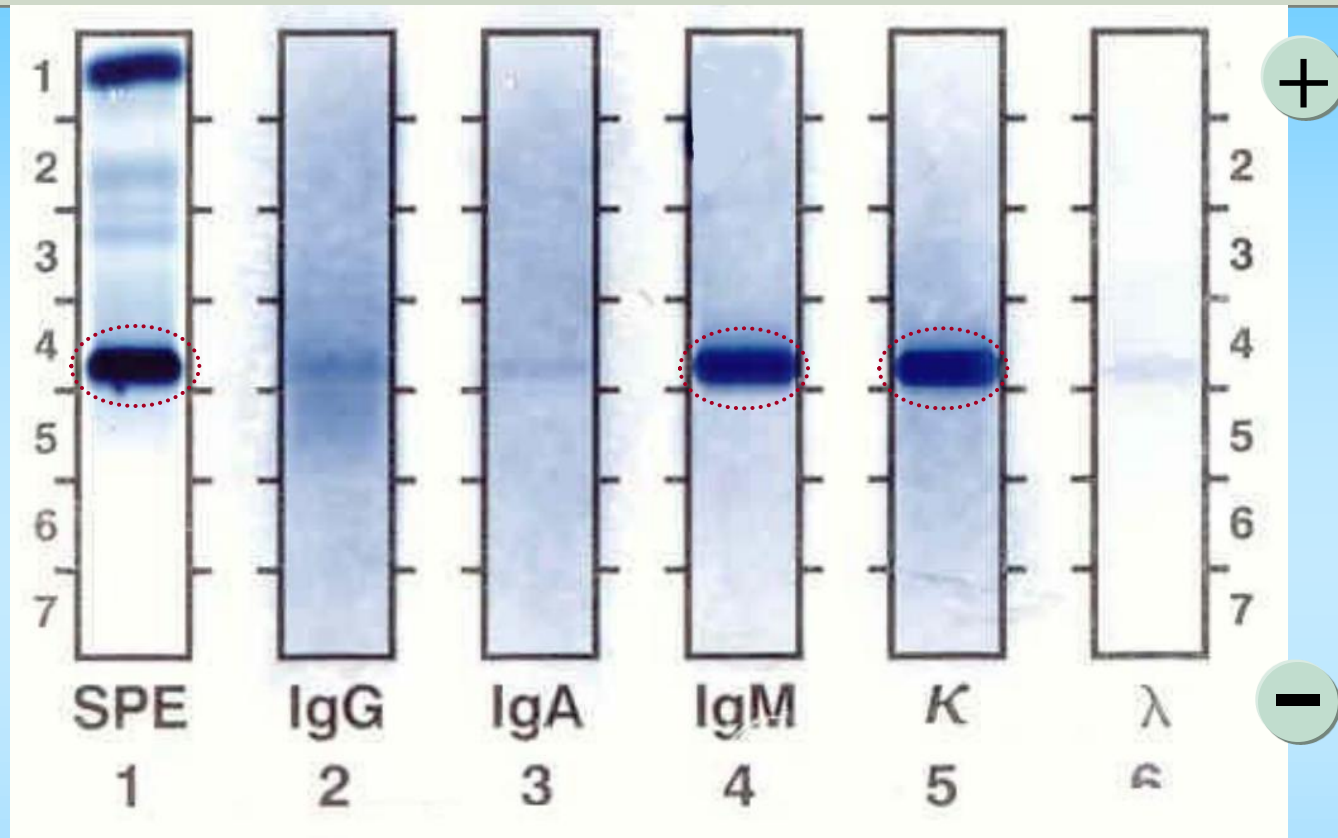
# IMUNOFIXACE VZORKU SÉRA NEMOCNÉHO S PARAPROTEINEM IgM $\lambda$



**LEGENDA:** sloupec č. 1: monoklonální pruh na pozici 6  
sloupec č. 4 a 6: imunochemický důkaz  
přítomnosti paraproteinu IgM  $\lambda$

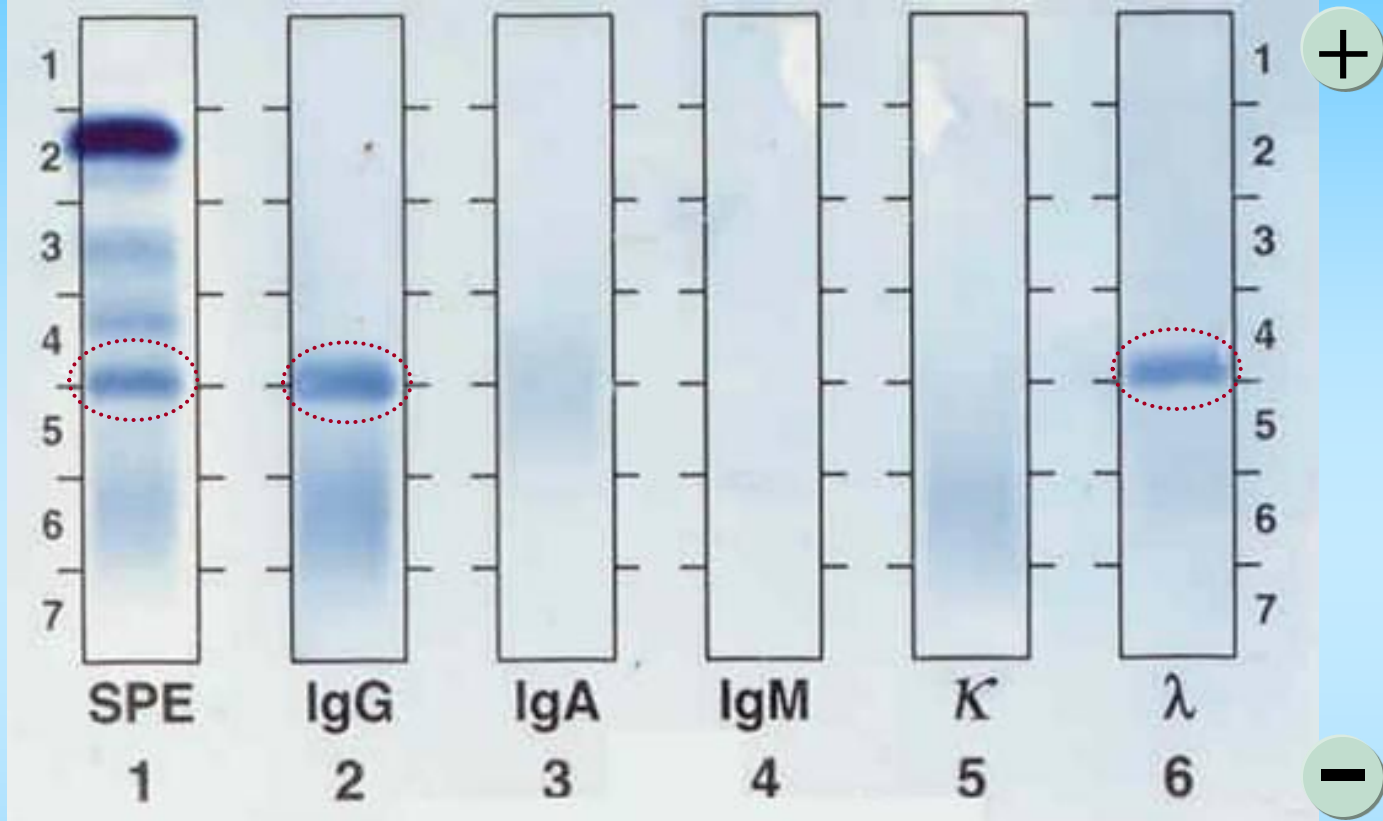


# IMUNOFIXACE VZORKU SÉRA NEMOCNÉHO S PARAPROTEINEM IgM $\kappa$



**LEGENDA:**    sloupec č. 1:            monoklonální pruh na pozici 4  
                  sloupec č. 4 a 5:    imunochemický důkaz  
  přítomnosti paraproteinu IgM $\kappa$

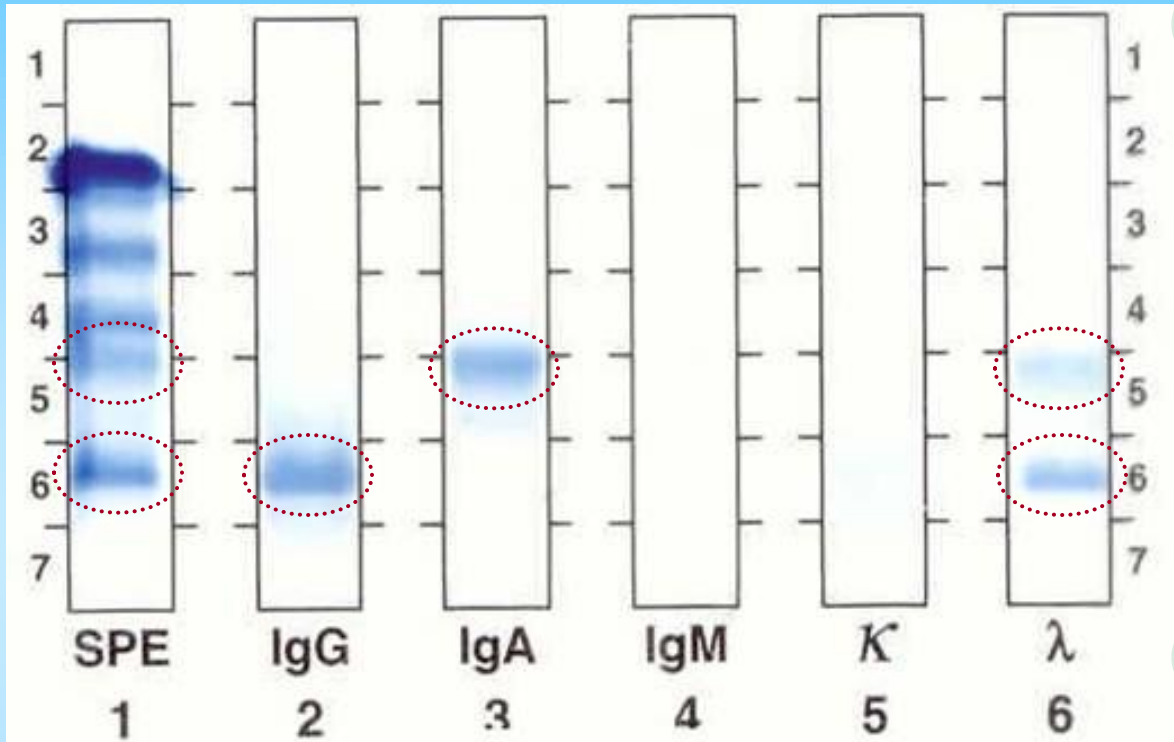
# IMUNOFIXACE VZORKU SÉRA NEMOCNÉHO S PARAPROTEINEM IgG $\lambda$



**LEGENDA:**    sloupec č. 1:    monoklonální pruh na pozici 4  
                  sloupec č. 2 a 6: imunochemický důkaz  
                                  přítomnosti paraproteinu IgG  $\lambda$

**INTERPRETACE:**    paraprotein IgG  $\lambda$

# IMUNOFIXACE VZORKU SÉRA NEMOCNÉHO S PARAPROTEINY IgG $\lambda$ a IgA $\lambda$



**LEGENDA:** sloupec č. 1: monoklonální pruhy na pozici 4 a 6  
sloupec č. 2 a 6: imunochemický důkaz přítomnosti paraproteinu IgG  $\lambda$   
sloupec č. 3 a 6: imunochemický důkaz přítomnosti paraproteinu IgA  $\lambda$

**INTERPRETACE:** dva paraproteiny IgG  $\lambda$ , IgA  $\lambda$

**KOMENTÁŘ:** přítomnost dvou klonů myelomových buněk

# REAKTANTY AKUTNÍ FÁZE

- ✿ **Reakce akutní fáze:** rozvíjí se při lokálním nebo systémovém zánětu, při traumatickém poškození tkáně, při nádorovém bujení, (po extrémní fyzické zátěži, v období kolem porodu, při akutním infarktu myokardu)
- ✿ Buňky aktivně produkují a do okolí uvolňují celé spektrum mediátorů a signálních molekul, které navozují v játrech (nebo v jiných tkáních) rychlé změny v syntéze bílkovin
- ✿ Proteiny, jejichž koncentrace v plazmě se mění významně (> 25 %) = **proteiny (reaktanty) akutní fáze**
  - ↙ **pozitivní:** jejich plazmatická koncentrace se zvyšuje
  - ↘ **negativní:** jejich plazmatická koncentrace se snižuje

# POZITIVNÍ REAKTANTY AKUTNÍ FÁZE

## Dělení podle účinků:

### 1) Složky imunitní reakce

přímo se podílejí na likvidaci noxy, která způsobila zánět, odstraňování poškozených buněk, modulace imunitní odpovědi:

- CRP
- složky komplementu: hlavně C3, C4
- TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6

## 2) Ochrana před kolaterálním poškozením tkáně

během akutní fáze se především z fagocytů a rozpadajících se buněk uvolňují **látky**, které mají zničit noxu, jež vyvolala zánět a „rozpustit“ poškozenou tkáň: **proteolytické enzymy a reaktivní formy kyslíku**

**účinek těchto látek je třeba omezit, aby působily jen tam, kde mají – aby tzv.kolaterální poškození tkáně bylo co nejmenší**

- Inhibitory proteáz:  $\alpha_1$ -antitrypsin,  $\alpha_1$ -antichymotrypsin,  $\alpha_2$ -makroglobulin
- Bílkoviny, které snižují tvorbu a dostupnost reaktivních forem kyslíku (scavengery reaktivních forem kyslíku, bílkoviny vázající a stabilizující přechodné kovy a jejich komplexy): haptoglobin, hemopexin, ferritin, ceruloplazmin

## 3) Transport odpadních látek vznikajících během zánětu

- sérový amyloid A (SAA), hemoglobin, hemopexin

## 4) Koagulační faktory a bílkoviny podílející se na regeneraci tkáně: fibrinogen

## Dělení podle rychlosti změn koncentrace:

- 1) Časné
- 2) Se střední dobou odpovědi
- 3) Pozdní

# Časné proteiny akutní fáze

- ✿ bílkoviny s velmi krátkým biologickým poločasem
- ✿ změny koncentrace již za 6-10 hodin po začátku onemocnění
- ✿ vrchol vzestupu: 2.-3.den
- ✿ CRP, SAA, prokalcitonin



# Prokalcitonin

- ✿ Mr 13 000, 116 Ak
- ✿ Fyziologicky tvořen C buňkami štítné žlázy jako prekurzor kalcitoninu
- ✿ Při generalizovaných bakteriálních infekcích produkován i monocyty, makrofágy a neuroendokrinními buňkami
- ✿ Funkce: pp.se podílí na regulaci zánětu, analgetické účinky
- ✿ Poločas: 1 den
- ✿ po imunitní stimulaci koncentrace vzrůstá již během 2-3 h 20krát
- ✿ zvýšení: generalizované bakteriální, mykotické, protozoální infekce, (ne u virových infekcí)

# Prokalcitonin

## Referenční rozmezí a kritické hodnoty

Hranicí positivity hodnota **0,5 µg/l** (muži, ženy i děti (s výjimkou těžce nezralých novorozenců))

- > **0,1 µg/l** v závislosti na klinickém pozadí může indikovat přítomnost bakteriální infekce vyžadující antibiotickou léčbu
- > **0,5 µg/l** pacient ohrožen sepsí nebo septickým šokem
- > **2,0 µg/l** pacient ohrožen těžkou sepsí nebo septickým šokem

# Sérový amyloid A

- skupina proteinů patřící mezi reaktanty akutní fáze
- proteiny z rodiny apoproteinů

## Funkce SAA:

- omezení transportu cholesterolu do jater
- chemotaxe
- indukce enzymů degradujících extracelulární matrix

## Podílí se na rozvoji celé řady patologií:

- dlouhodobě zvýšená hladina SAA představuje **rizikový faktor aterosklerózy**
- dlouhodobá nadprodukce SAA může vést ke vzniku **sekundární amyloidózy**

# Proteiny akutní fáze se střední dobou odpovědi

- ✿ jejich koncentrace se mění 12-36 hodin po začátku onemocnění, maxima dosaženo ke konci 1.týdne
- ✿  $\alpha_1$ -kyselý glykoprotein,  $\alpha_1$ -antitrypsin, haptoglobin, fibrinogen

# Pozdní proteiny akutní fáze

- ✿ změny se rozvíjejí po 48-72 hodinách po začátku onemocnění, vzestup méně vyjádřen, vrchol: po 6-7 dnech
- ✿ C3, C4 složka komplementu, ceruloplazmin

# NEGATIVNÍ REAKTANTY AKUTNÍ FÁZE

- ✱ albumin
- ✱ prealbumin
- ✱ transferin

využívány též jako kritérium jaterní proteosyntézy,  
ukazatelé malnutrice

# Stanovení bílkovin

## ✿ Celková bílkovina:

- ✿ poskytuje orientační informaci o biosyntéze, utilizaci a exkreci bílkovin
- ✿ Ovlivnění:
  - ✿ hydratací organismu
  - ✿ změnou biosyntézy jednoho nebo více specifických proteinů
  - ✿ rychlostí ztrát jednoho nebo více specifických proteinů

# Hypoproteinemie

- ✿ zvýšené ztráty: ledvinami, GIT (záněty střeva), krvácením, kůží (popáleniny), do 3.prostoru (ascites)
- ✿ snížená proteosyntéza v játrech (chronická jaterní onemocnění)
- ✿ nedostatečný příjem potravou

## **Relativní hypoproteinemie:**

- ✿ zachováno normální množství bílkovin
- ✿ v důsledku retence vody jsou ale „naředěné“ (stav hyperhydratace)



# Hyperproteinémie

- ✿ zvýšená syntéza některých specifických proteinů (např. Ig při plasmocytomu)

## Relativní hyperproteinémie:

- ✿ zachováno normální množství bílkovin
- ✿ následek dehydratace organismu při nedostatečném příjmu či nadměrných ztrátách tekutin (těžké průjmy, zvracení)

# Stanovení bílkovin

- ✿ **Celková bílkovina** – kolorimetricky, biuretová reakce
- ✿ **Albumin** – kolorimetricky, reakce s bromkrezolovou zelení
- ✿ **Jednotlivé frakce** elektroforeticky: albumin,  $\alpha_1$ -globulin,  $\alpha_2$ -globulin,  $\beta$ -globulin,  $\gamma$ -globuliny (jejich poměr se vyjadřuje v %)
- ✿ **Jednotlivé bílkoviny:** imunochemicky

# Stanovení celkové bílkoviny kolorimetricky biuretovou metodou

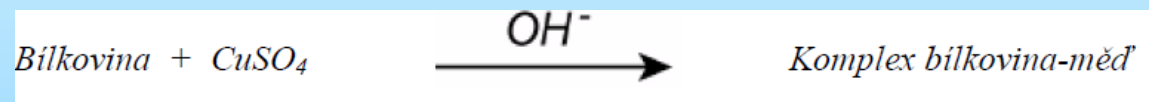
## Princip metody:

Stanovení je založeno na metodě Weichselbauma s využitím biuretova činidla (síran měďnatý v alkalickém prostředí).

Bílkoviny a peptidy tvoří s měďnatými ionty v alkalickém prostředí červenofialové komplexy, jejichž absorbance se měří při 545 nm. Intenzita zbarvení je přímo úměrná počtu peptidických vazeb.

## Referenční rozmezí:

do 6 týdnů:	40 - 68 g/l
6 týdnů – 1 rok:	50 - 71 g/l
1 – 15 let:	58 - 77 g/l
<b>15 – 60 let :</b>	<b>65 - 85 g/l</b>
60 – 90 let:	62 - 77 g/l
nad 90 let:	60 – 80 g/l



# Stanovení albuminu kolorimetricky s bromkrezolovou zelení

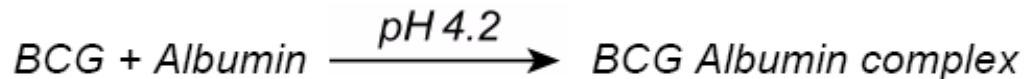
## Princip metody:

Stanovení je založeno na metodě Doumase, Watsona a Biggse s využitím bromkresolové zeleni (BCG), na kterou se albumin váže.

**Albumin ze vzorku se ve slabě kyselém prostředí chová jako kation a kvantitativně se váže na bromkrezolovou zeleň (aniontové barvivo)** za vzniku zeleně zbarveného komplexu. Absorbance komplexu se měří při 596 nm a je úměrná obsahu albuminu ve vzorku.

## Referenční rozmezí:

do 6 týdnů:	27 – 33 g/l
6 týdnů – 1 rok:	35 – 53 g/l
1 – 15 let:	35 – 53 g/l
<b>15 - 60 let:</b>	<b>35 – 53 g/l</b>
60 – 90 let:	32 – 46 g/l
nad 90 let:	29 – 45 g/l



# **Metabolismus železa a specifické proteiny**

# Metabolismus železa

Přítomnost železa nezbytná pro funkci buněk:

- jako součást hemu se účastní transportu kyslíku
- jako součást cytochromů podmiňuje přenos elektronů v dýchacím řetězci

**Nežádoucím účinkem železa** jako přechodného a velmi reaktivního prvku je **účast v radikálových reakcích**, při nichž vznikají reaktivní formy kyslíku (mohou poškozovat buněčné membrány, proteiny a DNA)

Fentonova reakce:



# Metabolismus železa

Železo se absorbuje jako  $\text{Fe}^{2+}$  aktivním transportem v duodenu a v horní části jejunu dvěma způsoby:

- na porfyrin vázané Fe ve formě stabilního lipofilního komplexu;
- $\text{Fe}^{II+}$  – cheláty rozpustné ve vodě.

Jen nepatrná část se vstřebává v ionizované formě.

Ve stravě bývá průměrně 10–50 mg železa/den, ale vstřebá se pouze 10–15 %.

Ve sloučeninách hemu (maso) se absorbuje lépe, nehemové Fe v rostlinné stravě hůře (kromě toho rostliny obsahují oxaláty, fytáty, taniny a jiné fenolické sloučeniny, jež tvoří s Fe nerozpustné nebo chelátové komplexy, které se těžko vstřebávají)

Askorbová kyselina absorpci železa zlepšuje

# Metabolismus železa

Po vychytání střevní mukózou se část železa inkorporuje do zásobní formy – feritinu v intestinálních buňkách.

Část absorbovaného železa přestupuje do plazmy, kde je transportováno ve vazbě na transferin.

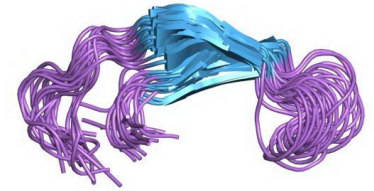
Důležitou roli při přenosu železa přes bazolaterální membránu enterocytů má protein ferroportin (nachází se i v membráně makrofágů a hepatocytů). Je to hlavní místo regulace homeostázy železa v organismu.

Klíčovým faktorem regulace je protein hepcidin, který je syntetizován v játrech. Vazbou na ferroportin inhibuje transport železa z buněk a tím přispívá k jeho sekvestraci v nich.

*Hepcidin se zvyšuje při **zánětu**, je částečně zodpovědný i za **anémii chronických chorob**, mutace genu pro hepcidin → **juvenilní hemochromatóza typu 2B***

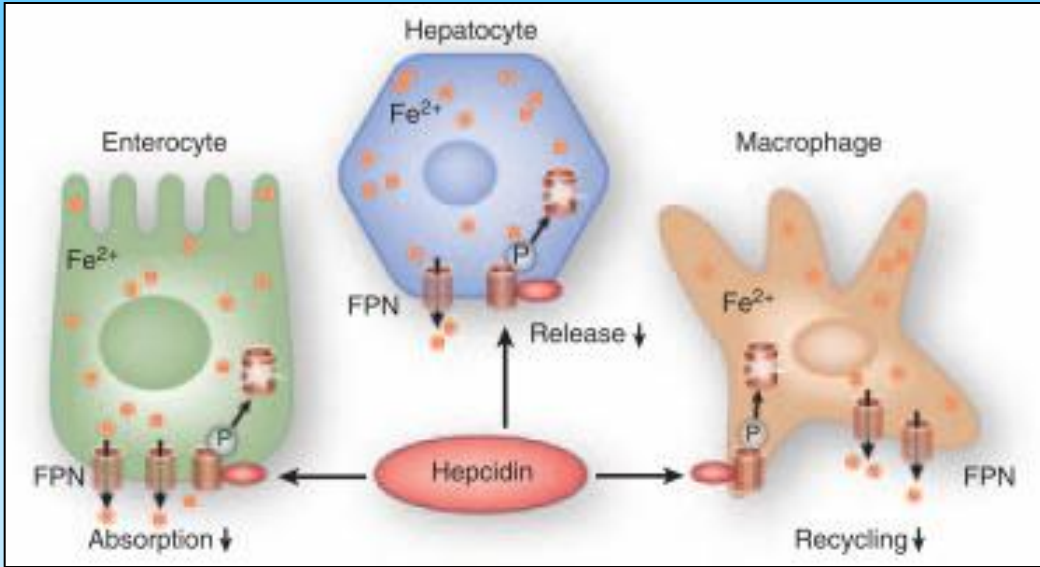


# Hepcidin

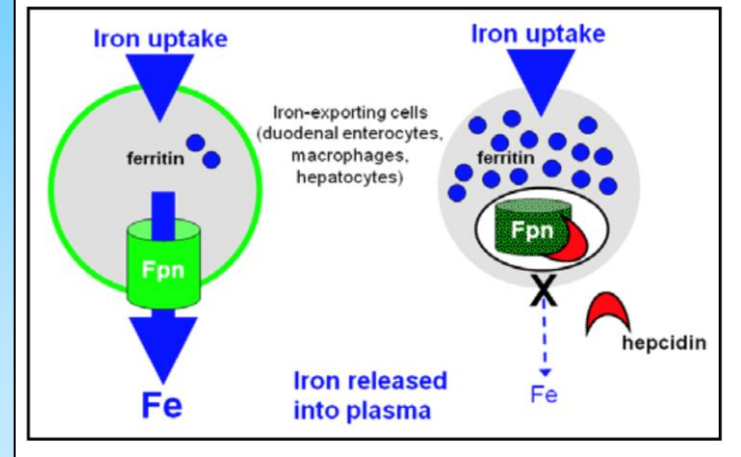


25 Ak hepcidin

- objeven v roce 2000
- peptidový hormon syntetizovaný v játrech
- hlavním regulátorem metabolismu železa
- skládá se z 84, 60 nebo 25 Ak, v moči hepcidin, který má 20 nebo 22 Ak
- 25-Ak hepcidin: hlavní regulátor absorpce železa a jeho distribuce do tkání
  - syntéza především v hepatocytech, ale také v makrofázích, adipocytech a mozku, může být důležitý pro autokrinní a parakrinní regulaci železa na lokální, tkáňové úrovni
- **nedostatek hepcidinu znamená přetížení železem (hemochromatóza), přebytek způsobuje anémii**
- **přebytek železa stimuluje produkci hepcidinu a zvýšená produkce hormonu zamezí další absorpci železa**
- **přímo inhibuje protein ferroportin**, který transportuje železo z buňky a skladuje ho
- regulován koncentrací železa a mírou erythropoesy

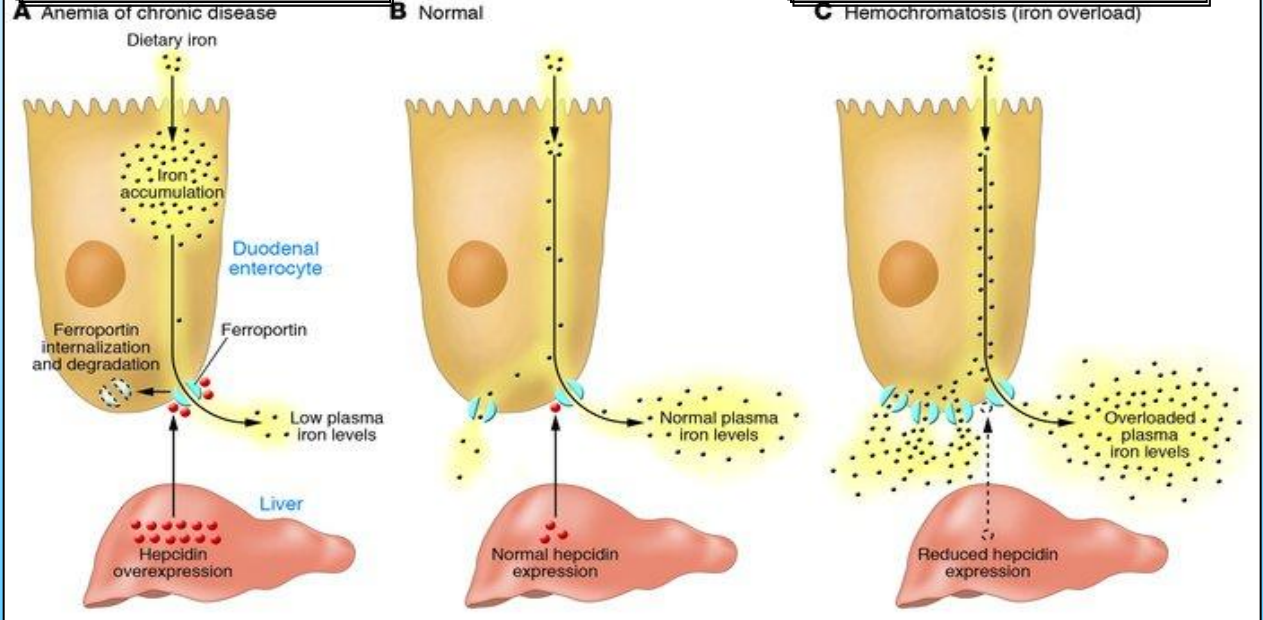


Serum iron	Low	High
Hepcidin	Low	High
Ferroportin	High	Low
Iron mobilization	High	Low



### Nadbytek hepcidinu

### Nedostatek hepcidinu



# Ferroportin

- transmembránový protein, který čerpá železo z buněk
- na povrchu buněk, kde transportuje nebo skladuje železo:
  - enterocyty
  - makrofágy
  - hepatocyty
- inhibován hepcidinem (hlavní regulátor metabolismu železa)

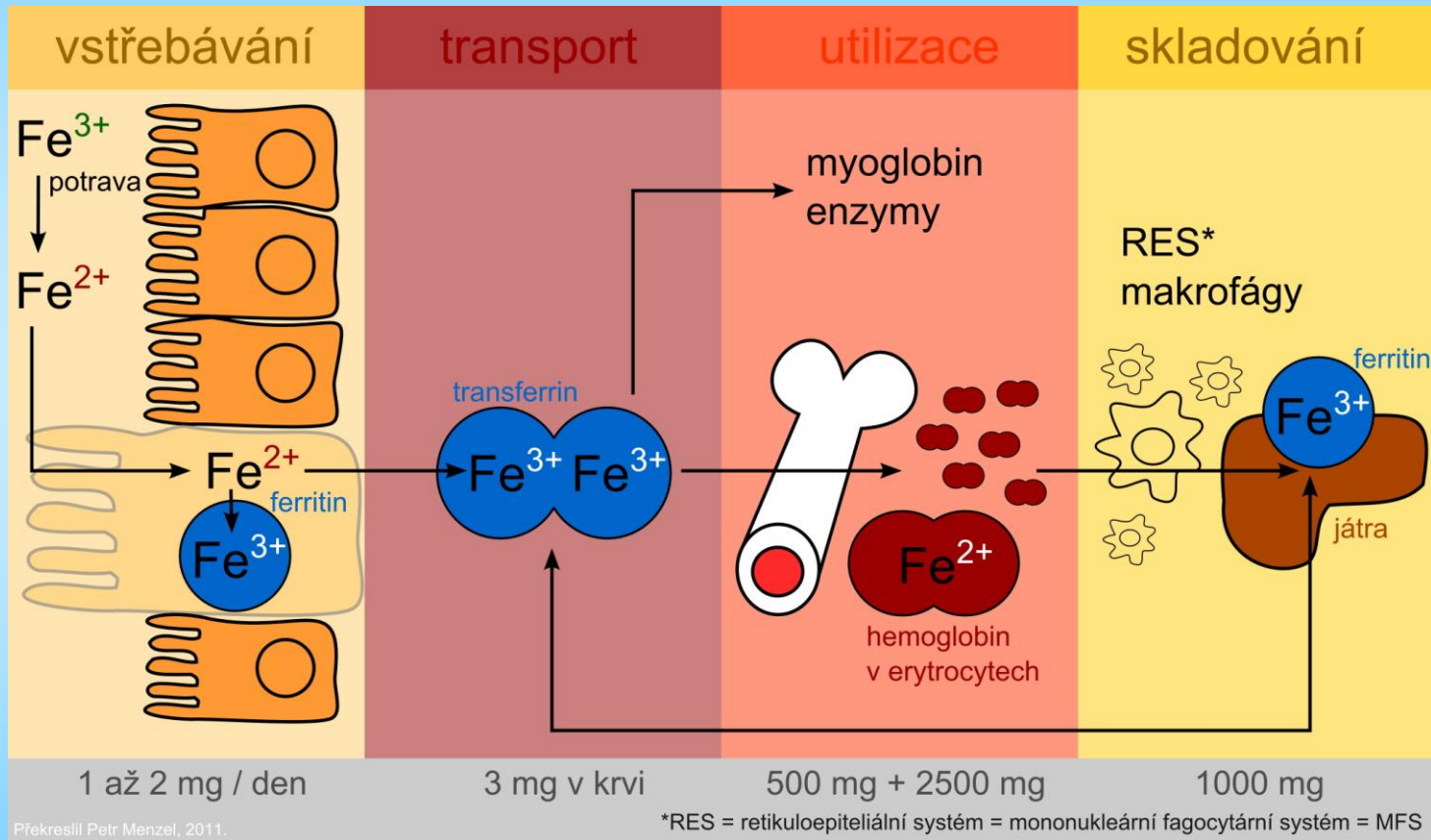
# Metabolismus železa

Plazmatické železo zachycováno buňkami cílových tkání prostřednictvím receptoru pro transferin a buď je **zabudováno do hemu** nebo **uloženo do zásoby ve formě feritinu**.

Využití transportní bílkoviny transferinu a zásobního proteinu feritinu pro uskladnění železa představuje **ochranné mechanismy**, které mají zamezit toxickému působení oxidoredukčně aktivního železa.

Při deskvamaci odumřelých slizničních buněk odchází nezužitkované železo stolicí spolu s nevstřebaným železem.

# Metabolismus železa



# Vyšetření metabolismu železa

- železo v séru
- sérový transferin a vazebná kapacita pro železo
- sérový feritin
- transferinový receptor

# Koncentrace sérového železa

- podléhají cirkadiánnímu rytmu a jsou ovlivněny i dalšími faktory (to omezuje diagnostický význam)
- špatným ukazatelem tkáňových zásob železa, nutné vždy posuzovat v kombinaci se sérovým transferinem a vazebnou kapacitou pro železo
- snížené koncentrace doprovázejí nedostatek železa (způsobený např. velkými nebo opakovanými krevními ztrátami, nedostatečným příjmem železa potravou nebo narušenou absorpcí, též u akutních infekcí nebo chronických zánětlivých onemocněních (přesun železa do tkání))
- vysoké hladiny železa se vyskytují u hemochromatózy, při předávkování nebo intoxikaci železem, při zvýšeném rozpadu erytrocytů a u některých jaterních onemocnění

## Referenční hodnoty

muži: 9–29  $\mu\text{mol/l}$

ženy: 7–28  $\mu\text{mol/l}$



# Sérový transferin a vazebná kapacita pro železo

Rychlost tvorby transferinu nepřímo úměrná zásobám železa v organismu; zvyšuje se při nedostatku železa a při nadbytku klesá.

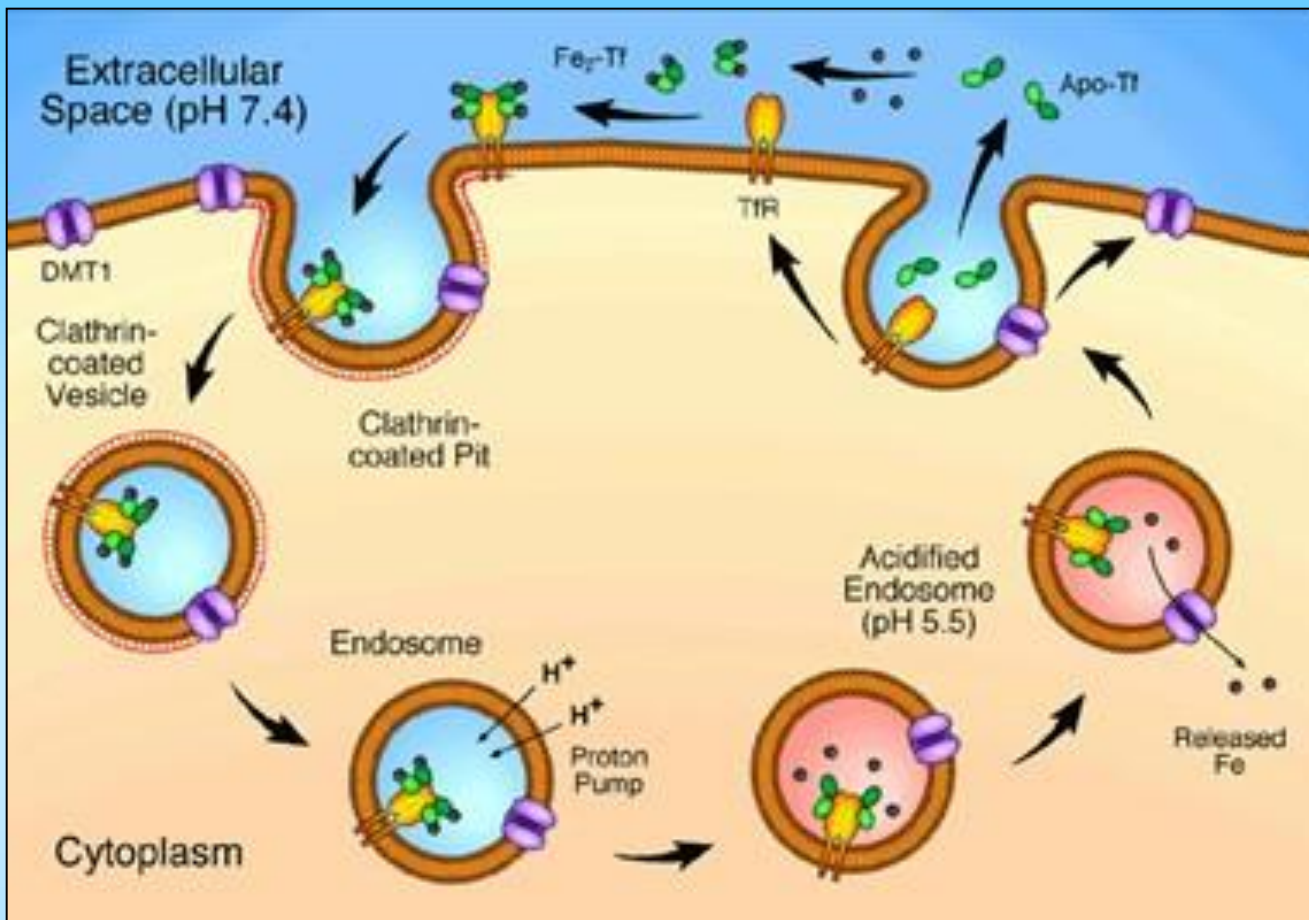
Biologická funkce: schopnost snadno tvořit netoxické komplexy se železem a přenášet Fe absorbované sliznicí tenkého střeva do kostní dřeně nebo do zásobních forem (feritinu nebo hemosiderinu)

Každá molekula transferinu váže dva atomy  $\text{Fe}^{3+}$   
(1 g transferinu váže 25,2  $\mu\text{mol}$  železa)

Transferin může být stanoven:

- přímo pomocí imunochemických metod
- nepřímo jako schopnost transferinu vázat železo – tzv. **vazebná kapacita pro železo**





Receptory pro transferin (TfR) – na povrchu mnoha buněk (prekurzory krevní řady v kostní dřeni)

→ vazba Tf – dochází k endocytóze, komplex je internalizován do endozomu

Kyselý pH lysosomu → následná disociace železa a transferinu (redukce  $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ ) – Fe se dostává do cytoplazmy

Železo je dopraveno do místa potřeby v buňce resp. navázáno na feritin ( $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ ) a uskladněno

Apotransferin (apoTf) není degradován, ale vrací se do plazmat. membrány, uvolňuje se z receptoru a vstupuje zpět do plazmy → Tf může znovu vázat Fe a transportovat ho k buňkám

# Sérový transferin a vazebná kapacita pro železo

**Celková vazebná kapacita pro železo** (TIBC – *total iron binding capacity*)  
= množství železa, které je transferin schopen vázat v případě, že všechna vazebná místa jsou obsazena

Obvykle je železem nasycena pouze 1/3 transferinu – **vázaná kapacita**

Volný transferin bez navázaného železa = **volná vazebná kapacita**  
(2/3 transferinu), která je k dispozici pro transport železa při zvýšených požadavcích

Přepočet mezi koncentrací transferinu a celkovou vazebnou kapacitou:

$$\text{Celková vazebná kapacita } [\mu\text{mol/l}] = \text{transferin } [\text{g/l}] \cdot 25,2.$$

Referenční rozmezí: S-transferin 2,0–3,6 g/l

celková vazebná kapacita 50–70  $\mu\text{mol/l}$

## Saturace transferinu (TfS)

poměr sérové koncentrace železa k celkové vazebné kapacitě transferinu pro železo

citlivý parametr pro odhalení latentního nedostatku železa

## Hodnocení saturace transferinu

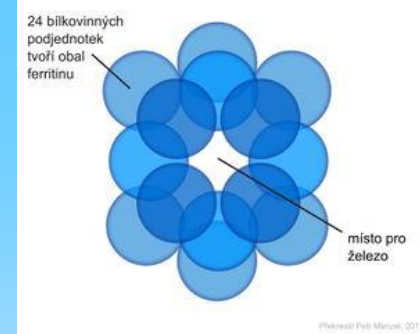
$$\text{Saturace transferinu } [\%] = \frac{\text{S-železo } [\mu\text{mol/l}]}{\text{S-transferin } [\text{g/l}] \times 25,2} \times 100$$

fyziologické hodnoty: 25–50 %

snížení saturace při nedostatku železa: < 15 %

zvýšení saturace při nadbytku železa: > 50 %

# Feritin



- nejdůležitější zásobní protein pro železo
- normálně kapacita využita asi z 20 %, ukládá se do buněk v játrech, slezině, kostní dřeni a střevní sliznici
- malý podíl se uvolňuje do krevního oběhu, hladina v krevním séru odráží tkáňové zásoby železa, její hodnota klesá dříve, než roste hladina transferinu
- molekula feritinu přizpůsobena vázat velké množství  $\text{Fe}^{3+}$  v rozpustné a netoxické formě pro organismus
- tvořen vnějším proteinovým obalem z 24 podjednotek – **apoferitinem** (Mr 440 000), ohraničující dutinu, ve které může být až **4500 atomů železa** ve formě oxyhydroxidu železitého  $(\text{FeO}\cdot\text{OH})_n$  v mikrokrytalické podobě s fosfáty  $(\text{FeO}\cdot\text{OPO}_3\text{H}_2)$ .
- vstup a výstup atomů železa umožňují póry mezi jednotlivými podjednotkami obalu molekuly feritinu
- **měřítkem zásob železa** v organismu (**nízké koncentrace:** vyčerpání celkové tělesné rezervy železa → časný odhalení anémie z nedostatku železa ještě v prelatentní fázi, **zvýšené koncentrace:** doprovodným jevem vysokých tkáňových zásob železa, u pacientů s onemocněním jater, některými malignitami (nádorový marker) nebo zánětlivými onemocněními (pozitivní reaktant akutní fáze))

*Referenční rozmezí S-feritin: M 30–300  $\mu\text{g/l}$ , Ž 20–120  $\mu\text{g/l}$*

# Hemosiderin

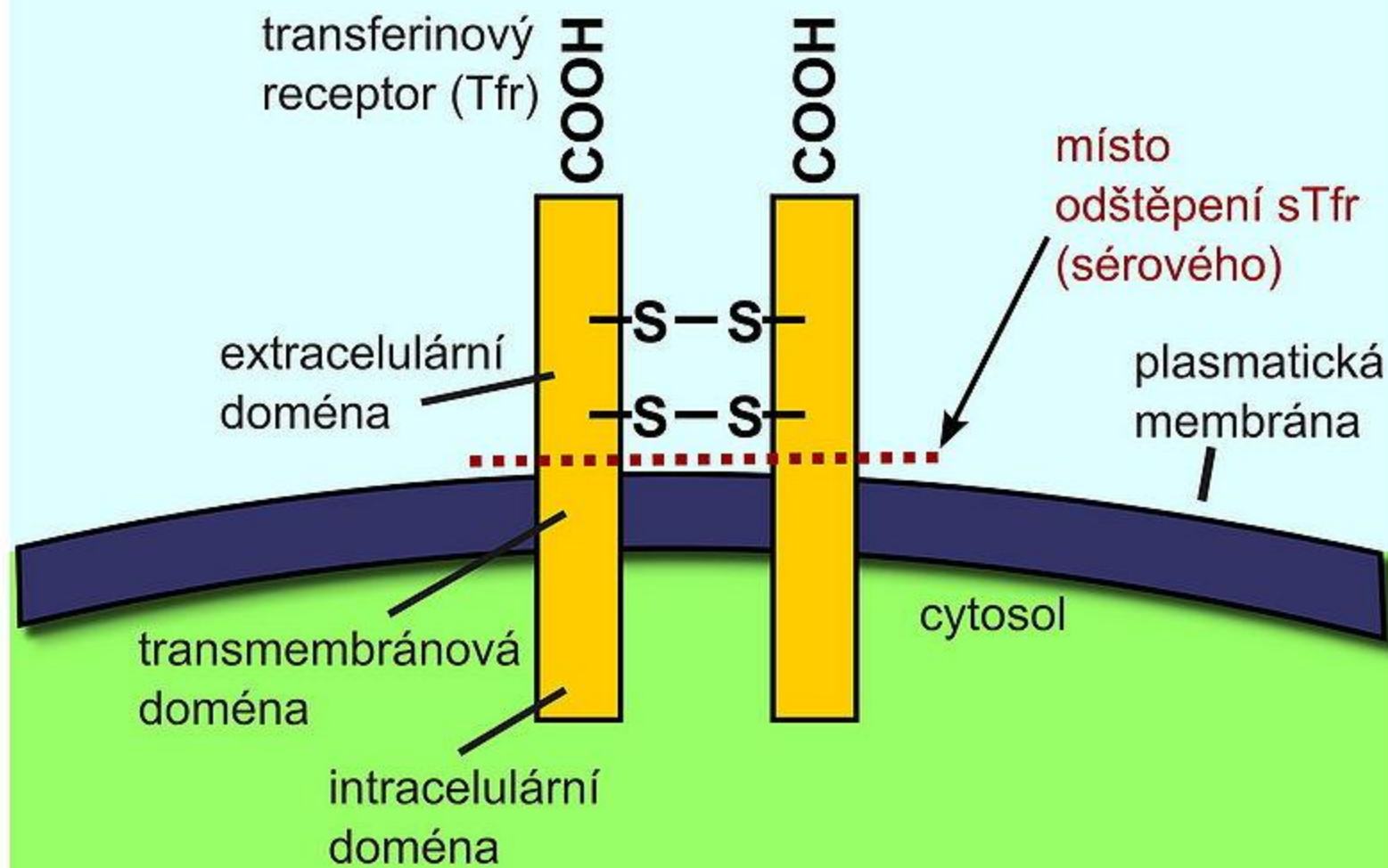
- dalším zásobním proteinem pro železo
- vzniká agregací denaturovaného feritinu s dalšími komponentami
- vytváří partikule o velikosti 1 až 2  $\mu\text{m}$ , které jsou při použití barvení na železo viditelné ve světelném mikroskopu
- obsahuje větší množství železa než feritin, ale vzhledem ke špatné rozpustnosti ve vodě je obtížně dostupné
- tvoří se za situace, kdy množství železa v organismu převyší skladovací kapacitu feritinu

# Transferinový receptor

- železo transportované krví transferinem je zachycováno buňkami prostřednictvím specifického transferinového receptoru (TfR)
- v určitém stádiu vývoje se nachází na povrchu všech buněk, nejvíce však exprimován na povrchu **prekursorů buněk červené řady v kostní dřeni**
- transmembránový protein, tvořen dvěma identickými podjednotkami, spojenými disulfidovou vazbou, oddělením extracelulárních domén receptoru se do cirkulace uvolňuje tzv. **solubilní frakce transferinového receptoru (sTfR)**, který může být v podobě dimeru nebo monomeru
- buňky reagují na snížení zásob železa syntézou zvýšeného množství transferinových receptorů
- zvýšení sTfR = spolehlivý **ukazatel nedostatku železa pro krvetvorbu** (u ***anemií z nedostatku železa*** nebo u ***hemolytických anemií***)
- *Cenné je stanovení sTfR u anemických pacientů, u nichž je zvýšen feritin z důvodů reakce akutní fáze*
- *Stanovení sTfR je možno využít i u pacientů s transplantovanou kostní dření pro sledování průběhu erythropoézy*

Ke stanovení se používají imunochemické metody





# Nedostatek železa (sideropenie)

nedostatečné vstřebávání ze střeva nebo chronické ztráty krve

→ **sideropenická anémie (hypochromní mikrocytární)**

3 stupně nedostatku Fe:

## **Prelatentní nedostatek železa**

- postupný pokles zásob, ale ještě není ovlivněna dodávka železa do erytroblastů kostní dřeně
- cca u poloviny nemocných hladiny feritinu < 12 µg/l

## **Latentní nedostatek železa**

- zásoby Fe v podstatě vyčerpány
- feritin snížen pod dolní hranici normy, snížení hladiny železa v séru a snížená dodávka do erytroblastů kostní dřeně
- zvyšuje se vazebná kapacita pro železo
- pokles saturace transferinu pod 15 %
- nerozvíjí se však ještě anémie

## **Manifestní nedostatek železa**

- rozvoj anémie s poklesem hodnot hemoglobinu pod dolní hranici normy
- anémie z nedostatku železa: nízké železo a feritin, zvýšená koncentrace transferinu (vazebná kapacita pro železo)
- Hemolytické anémie nebo při nadbytku železa: sérové železo zvýšené, snížená celková vazebná kapacita pro železo.

# Laboratorní nálezy u nedostatku železa

<b>Prelatentní nedostatek</b>	<b>Latentní nedostatek</b>	<b>Manifestní nedostatek</b>
snižování zásobního železa – pokles feritinu	nedostatek zásobního železa – pokles feritinu	nedostatek zásobního železa – pokles feritinu
	snížení sérového železa	snížení sérového železa
	pokles saturace transferinu pod 15 %	pokles transferinu pod 10 %
	zvýšení celkové vazebné kapacity pro železo	zvýšení celkové vazebné kapacity pro železo
	zvýšení sTfR	zvýšení sTfR
		snížení koncentrace hemoglobinu – anémie



# Nadbytek železa

- Organismus není vybaven exkreční cestou pro železo, a proto se za určitých okolností může přebytečné železo hromadit ve tkáních.
- Včasná diagnostika může zabránit poškození tkání nadbytkem železa.
- Přetížení železem se rozvíjí většinou velmi pomalu.

Rozlišujeme 3 stádia:

## **Prelatentní nadbytek železa**

- zvyšuje jeho obsah v orgánech, ale bez překročení jejich zásobní kapacity

## **Latentní stádium přetížení železem**

- překročena zásobní kapacita buněk, ale ještě není poškozena funkce orgánů
- zvyšuje se hladina feritinu i hladina železa v séru a stoupá saturace transferinu nad 55 %

## **Manifestní nadbytek železa**

- poškozeny některé orgány

# Laboratorní nálezy u nadbytku železa

Prelatentní nadbytek	Latentní nadbytek	Manifestní nadbytek
zvyšování zásob železa – zvýšení feritinu	zvyšování zásob železa – zvýšení feritinu nad 300 µg/l	zvyšování zásob železa – zvýšení feritinu (při těžkém postižení nad 2000 µg/l)
	zvýšení železa v séru	výrazné zvýšení železa v séru
	zvýšení saturace transferinu nad 55 %	zvýšení saturace transferinu (při těžkém postižení může převýšit 90 %)

# Hemochromatóza

Hromadění železa v tkáních

## Primární hemochromatóza

- dědičné onemocnění způsobené zvýšenou resorpcí železa ze střeva
- přebytečné železo se ukládá v parenchymatózních orgánech jako jsou játra, srdce, pankreas, nadledviny
- v postižených orgánech působí toxicky a narušuje jejich funkci tím, že může katalyzovat chronické reakce vedoucí k tvorbě volných radikálů
- hlavními klinické projevy: hyperpigmentace kůže, hepatosplenomegalie a diabetes mellitus

## Sekundární hemochromatóza

- následek např. opakovaných transfúzí, nadbytečného příjmu přípravků obsahujících železo nebo hemolytické anémie
- V biochemickém obraze: zvyšující se hladiny feritinu a železa v séru, stoupá saturace transferinu při jeho současném poklesu

# Haptoglobin

- plazmatický glykoprotein (tetramer  $\alpha_2\beta_2$  )
- tvořený v játrech, velmi pevně váže extrakorpulární molekulu hemoglobinu
- cca 10 % degradovaného Hb je každý den uvolněno do oběhu a tak vzniká extrakorpulární Hb (zbylých 90 % je přítomno ve starých erythrocytech, které jsou degradovány v buňkách RES)
- komplex haptoglobin-hemoglobin je z krevního oběhu rychle vychytáván buňkami retikuloendotelové soustavy
- volný Hb prochází glomeruly ledvin do tubulů a má tendenci zde precipitovat, komplex Hb-Hp je dostatečně velký, takže neprochází glomeruly → funkce Hp = zamezení ztráty volného Hb ledvinami
- nízké hladiny Hp u pacientů s **hemolytickými anémiemi** (poločas Hp je asi 5 dní, poločas komplexu Hb-Hp asi 90 min → komplex je mnohem rychleji odstraňován hepatocyty → **když je Hp vázán s Hb, mizí z plasmy asi 80x rychleji než samotný Hp**)
- Sérová koncentrace haptoglobinu **stoupá při akutních stavech** (protein akutní fáze) a **klesá při poruchách proteosyntézy v játrech.**

# Hemopexin

- Fyziologicky je uvolněný Hb (2+) vázán na Hp a transportován k makrofágům a hepatocytům
- Po masivní hemolýze (když je pufrovací schopnost Hp vyčerpána) je Hb rychle oxidován na ferihemoglobin, který uvolní volný hem
- **Ferihem** se poté váže na albumin a následně je **přenášen na hemopexin** → **poté hemopexin uvolní hem do jater**
- **sérová hladina hemopexinu klesá u hemolytické anémie a stoupá u akutních stavu (protein akutní fáze)**

