

BÍLKOVINY

① Celková bílkovina

Klinický význam:

↑ koncentrace: při dehydrataci (zvracení, průjmy), při nadprodukcí bílkovin v důsledku onemocnění plazmatických buněk (např. myelom).

↓ koncentrace: nedostatek v potravě, při jejich ↑ potřebě (dlouhodobé infekce, nádorová onemocnění), při jejich ztrátě (nefrotický syndrom, silné krvácení, popáleniny).

Orientační referenční rozmezí: 65 – 85 g/l

Možnosti stanovení:

- **Kjeldahlova metoda**

Nejprve se stanoví celkový dusík plazmy a potom se vysráží bílkoviny kyselinou trichloroctovou a po centrifugaci se stanoví v supernatantu nebílkovinný dusík. Z rozdílu hodnot lze potom vypočítat bílkovinný dusík.

Metoda je časově náročná, zastaralá, nehodí se pro rutinní provoz, ale vhodná pro přesnou analýzu v kontrolních sérech.

- **Biuretova reakce**

V alkalickém prostředí dávají bílkoviny a peptidy s měďnatými ionty červenofialový komplex. Intenzita zbarvení je úměrná počtu peptidových vazeb.

Biuretovo činidlo: CuSO_4 , NaOH, KI.

KI se přidává pro stabilitu, pro zajištění stability měďnatých iontů je součástí činidla také vinnan sodnodraselný, Chelaton III nebo citrát.

Metoda běžně používaná – možnost automatizace, jednoduchá, specifická a přesná.

- **Turbidimetrická metoda**

Měření zákalu vzniklého po precipitaci bílkovin kyselinami (trichloroctová, sulfosalicylová atd.) Využívá se pro semikvantitativní stanovení **celkové bílkoviny v moči**.



Univerzita
Pardubice

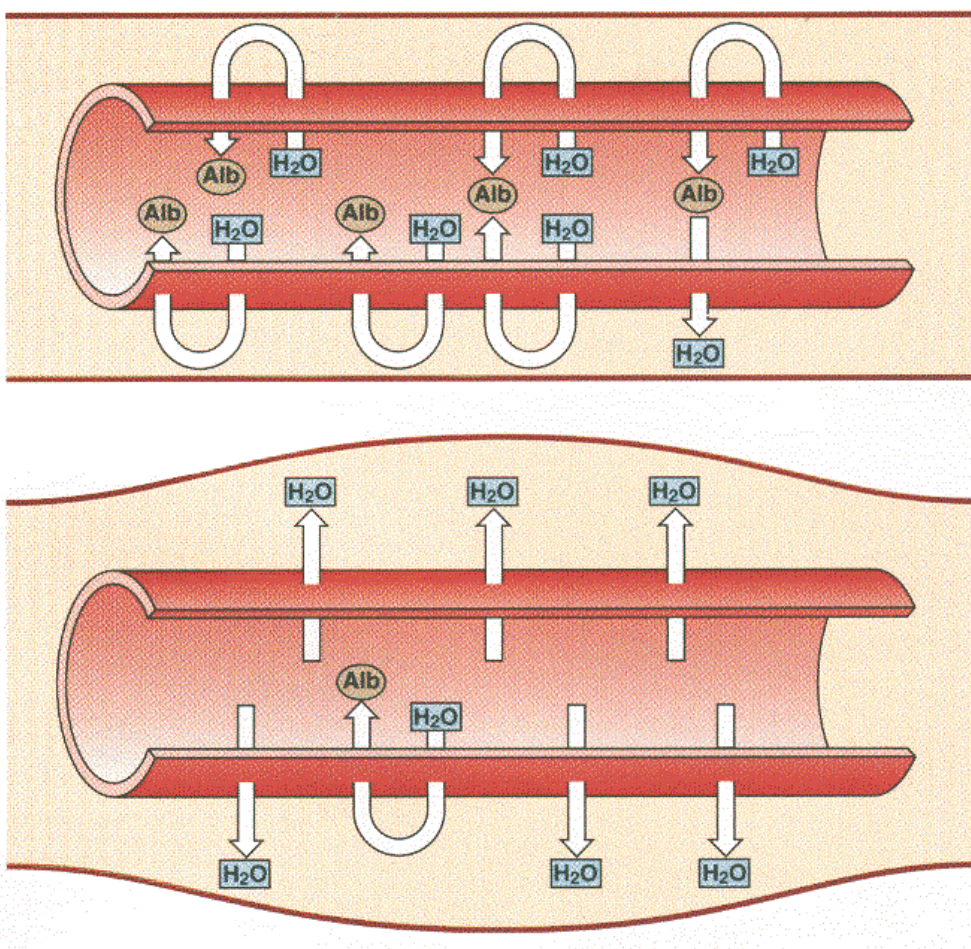
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

② Albumin

Klinický význam:

↓ koncentrace: infekce, jaterní onemocnění, nefrotický syndrom, stres, nádorová onemocnění, poruchy výživy atd. Důsledkem jeho ↓ koncentrace v krvi mohou být otoky způsobené poklesem onkotického tlaku – obrázek č.1.



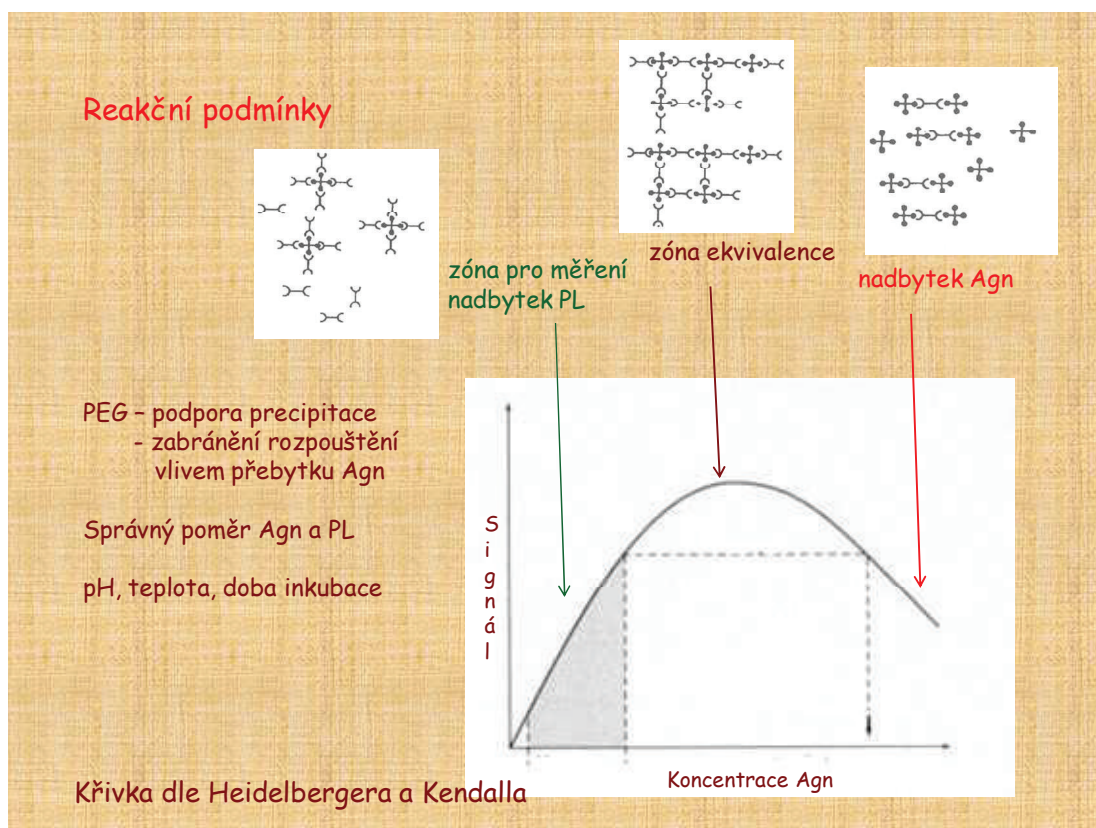
Obrázek č. 1. Vznik otoků při poklesu onkotického tlaku při snížené koncentraci albuminu v krvi (převzato z *Clinical Biochemistry, An Illustrated Colour Text, 5th edition, Gaw A a kol., 2008*).

Orientační referenční rozmezí: 35 – 53 g/l



Možnosti stanovení:

- Metoda s **bromkresolovým purpurem**
Měříme fotometricky intenzitu zbarvení červeného komplexu vznikajícího vazbou bromkresolového purpuru na albumin ve slabě kyselém prostředí
- Metoda s **bromkresolovou zelení**
Ve slabě kyselém prostředí dává bromkresolová zeleň s albuminem zeleně zbarvený komplex. Nutné přesně dodržet inkubační dobu. V případě překročení inkubační doby metoda poskytuje falešně vyšší výsledky.
- **Imunochemické metody**
Jsou založeny na principu reakce antigenu (Agn) a protilátky (PL) za vzniku imunokomplexu. Pokud probíhá reakce v roztoku – Agn je v rozpustné formě – vzniká imunokomplex zvaný precipitát, který se projeví zákalem roztoku. Pro správný průběh reakce je nutné pracovat tak, aby byl poměr koncentrací Agn a PL optimální (obrázek č.2). Zákal měříme na principu nefelometrie či turbidimetrie.



Obrázek č. 2. Princip vzniku precipitátu v optimálním poměru Agn a PL. Upraveno dle *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii, Doležalová V a kol., 1995.*



Bílkoviny akutní fáze

① C-reaktivní protein (CRP)

Akutní fáze – nespecifická obranná reakce na poškození organismu akutním zánětem. Koncentrace bílkovin akutní fáze rychle stoupá. Tvorbu bílkovin akutní fáze v játrech vyvolávají cytokiny.

Klinický význam:

↑ koncentrace: záněty, nekrózy tkání atd.

U zdravých jedinců se vyskytuje pouze ve velmi malé koncentraci.

Orientační referenční hodnoty: 0 – 5 mg/l, 0-10 mg/l (závislost na použité metodě)

Možnosti stanovení:

- Imunonefelometrie, imunoturbidimetrie. Další možností je vzhledem k poměrně nízké koncentraci některá z citlivějších izotopových či neizotopových imunochemických metod. Principem těchto metod je značení Agn či PL značkou – radioizotopem, fluoreskující látkou či enzymem atd. Neměříme již zákal, ale v závislosti na použité značce měříme např. fluorescenci.

② Transferin

Patří mezi β_1 – globuliny. Slouží jako transportní bílkovina pro železo.

Patří mezi tzv. bílkoviny s krátkým poločasem, jejichž hladiny v katabolických stavech klesají a jsou proto někdy označovány jako negativní reaktanty akutní fáze.

Klinický význam:

↓ koncentrace: u dlouhodobých a těžkých chorob (zhoubné nádory, nefrotický syndrom, jaterní cirhóza atd.) Jak již bylo zmíněno, mírný pokles doprovází reakci organismu na akutní zátěž.

↑ koncentrace: u anémie z nedostatku železa, akutní hepatitidy, v posledním období těhotenství atd.

Orientační referenční hodnoty: 2-4 g/l

Možnosti stanovení:

- Imunoturbidimetrie a imunonefelometrie.



Elektroforéza bílkovin

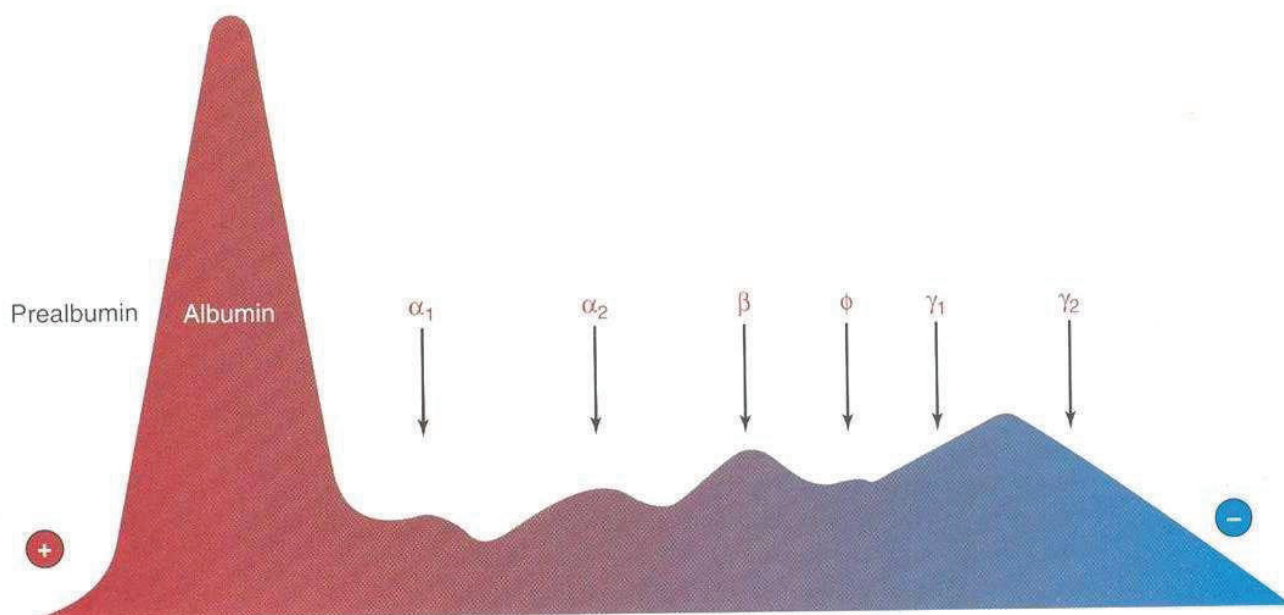
Separční metoda sloužící k dělení látek nesoucích elektrický náboj. Dělení probíhá na základě rozdílné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Pohyblivost závisí na velikosti náboje, velikosti molekuly, pH prostředí, iontové síle pufru, vlastnostech nosiče, tvaru částic atd.

Elektroforézou se bílkoviny dělí na frakce: albumin, α_1 , α_2 , β a γ (obrázky č. 3 a 4)

Z elektroforézy lze rozpoznat některé významné patologické změny v organismu. Například prokázat paraprotein (obrázek č.5). Jde o monoklonální imunoglobulin vznikající klonální proliferací B-lymfocytů. Přítomnost paraproteinu může signalizovat mnohočetný myelom.



Obrázek č. 3. Jednotlivé frakce bílkovin po rozdělení elektroforézou – záznam gelu.

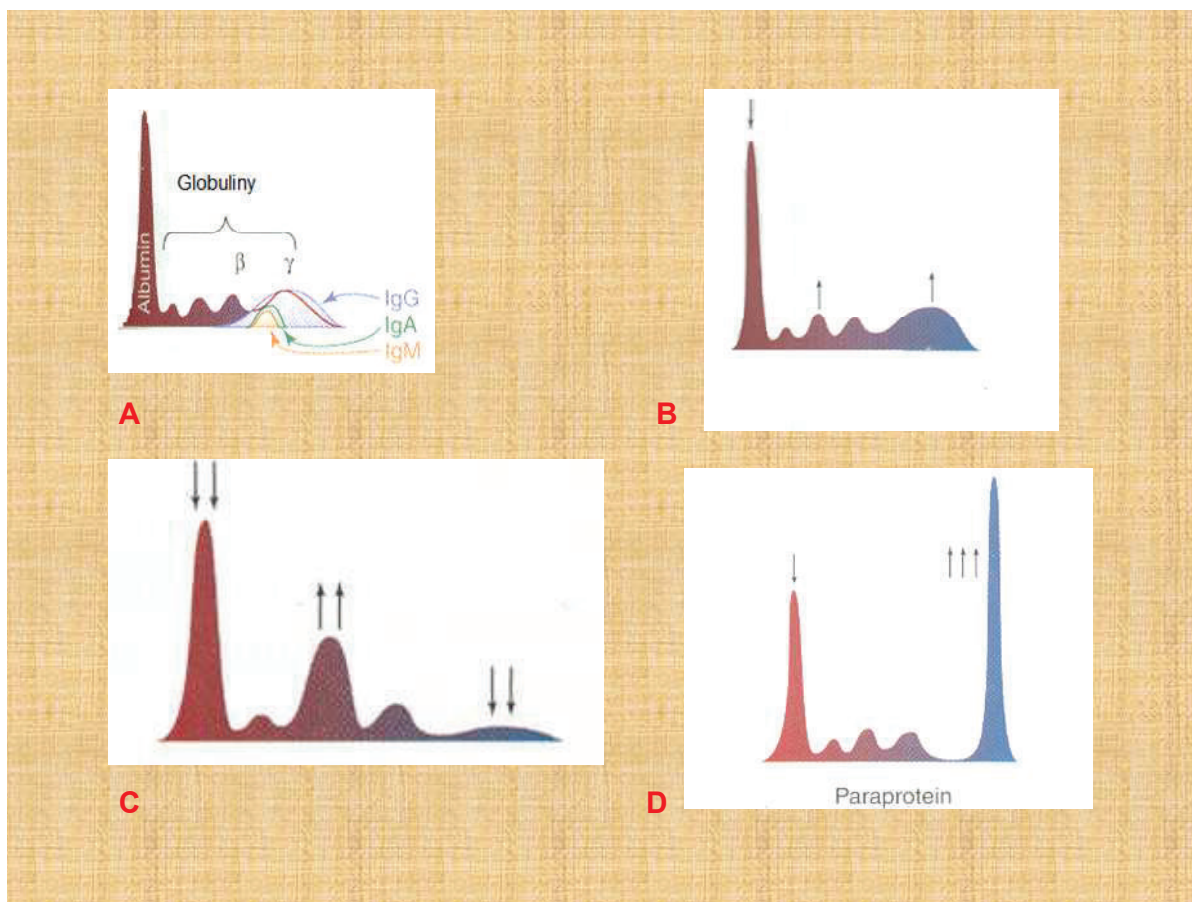


Obrázek č. 4. Jednotlivé frakce bílkovin po rozdělení elektroforézou – denzitometrický záznam. Upraveno dle Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, TM Devlin a kol, 2006.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



Obrázek č. 5. Jednotlivé typy nálezu po rozdělení elektroforézou – denzitometrický záznam. A- normální nálezn, B – chronický zánět, C – nefrotický syndrom, D- paraprotein. Upraveno dle *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, TM Devlin a kol, 2006.

Použitá literatura:

Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, TM Devlin a kol, 2006

Clinical Biochemistry, 8 th edition, Beckett G a kol., 2010.

Clinical Biochemistry, An Illustrated Colour Text, 5 th edition, Gaw A a kol., 2008.

Clinical Biochemistry: Techniques and Instrumentation, A Practical Course, Varcoe JS, 2001.

Klinická biochemie, Racek J a kol. 2006.

Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii, Doležalová V a kol., 1995.

