

Bílkoviny v séru a moči (1. LF UK, VL)

Bílkoviny v séru

Bílkoviny v krevním séru nebo plazmě jsou zastoupeny mnoha druhy proteinů pocházejících z různých buněk. **Biosyntéza** převážné většiny plazmatických bílkovin probíhá v játrech, menší část je syntetizována na jiných místech, např. v lymfocytech (imunoglobuliny) a enterocytech (např. apoprotein B-48). **Odbourávání** se uskutečňuje v hepatocytech a v mononukleárním fagocytárním systému, kde se degradují převážně bílkoviny po vytvoření komplexů (např. komplex antigen-protilátka, hemoglobin-haptoglobin). Intracelulárně jsou peptidové vazby bílkovin hydrolyzovány pomocí proteáz a peptidáz za vzniku aminokyselin. Další způsob odstraňování sérových bílkovin se uskutečňuje exkrecí orgány, především ledvinami a gastrointestinálním traktem.

Celková koncentrace bílkovin v séru je 65-85 g/l, což odpovídá onkotickému tlaku 3,33-3,52 kPa. V plazmě je koncentrace bílkovin vyšší o koagulační faktory.^{[1][2][3][4][5][6] [7] [8] [9] [10] [11]}

Funkce plazmatických bílkovin

Funkce plazmatických bílkovin zahrnuje celou řadu oblastí:

- udržování koloidně-osmotického tlaku;
- transport důležitých látek (např. hormony, vitaminy, lipidy, bilirubin, léky);
- nutriční funkce;
- udržování acidobazické rovnováhy;
- hemokoagulace a fibrinolýza;
- obranné reakce organismu – humorální imunita:
 - specifická imunita (imunoglobuliny),
 - nespecifická imunita (složky komplementu, bílkoviny akutní fáze).

Přehled sérových bílkovin

	Bílkovina <i>Relativní molekulová hmotnost</i>	Koncentrace v séru [g/l]	Poločas [dny]	Funkce	
	Prealbumin (Transthyretin) <i>54 000</i>	0,2-0,4	2	▪ vazba hormonů štítné žlázy a retinol vázajícího proteinu	↓ malnutrice
	Albumin <i>68 000</i>	35-53	15-19	▪ nejvýznamnější transportní protein ▪ udržení koloidně-osmotického tlaku ▪ proteinová rezerva organismu	↓ katabolismus ↓ hepatopatie ↓ ztráty bílkovin
α ₁ oblast	α₁-lipoprotein <i>180 000-360 000</i>	1,0-1,6 (Apo A-I)		▪ lipoprotein o vysoké hustotě (HDL) ▪ transport cholesterolu do jater	
	α₁-antitrypsin (α ₁ -inhibitor proteáz) <i>54 000</i>	0,9-2,0	4	▪ inhibitor lyzomálních proteáz (hlavně elastázy z polymorfonukleárních leukocytů) ▪ vrozená deficeience může být příčinou onemocnění plic (emfyzém) a jater (cirhóza)	↑ akutní zánět
	α ₁ -kyselý glykoprotein (orosomukoid) <i>40 000</i>	0,5-1,2	5	▪ vazba lipofilních látek (např. progesteronu a některých léků) ▪ podílí se na regulaci imunitní odpovědi	↑ zánět
	α₁-fetoprotein <i>69 000</i>	< 7,5 µg/l	3,5	▪ fyziologicky produkován fetálními játry a žloutkovým váčkem ▪ hlavní protein fetálního séra ▪ fyziologicky přítomen v séru těhotných žen	↑ hepatom ↑ některé malignity GIT ↑ těhotenství
α ₂	Haptoglobin ^[p 1] <i>85 000-1 000 000</i>	0,3-2,0	2	▪ vychytává volný hemoglobin	↑ akutní zánět ↓ hepatopatie ↓ intravaskulární hemolýza (konzumpce haptoglobinu)
				▪ inhibitor proteáz (trombin, trypsin, chymotrypsin, pepsin) ▪ transport malých proteinů (cytokiny, růstové	

oblast	α_2-makroglobulin 800 000	1,3–3,0	5	<ul style="list-style-type: none"> faktory) a dvojmocných iontů (např. Zn^{2+}) díky velmi vysoké molekulové hmotnosti neprojde ani poškozenou glomerulární membránou 	↑ akutní zánět
	Ceruloplasmin 160 000	0,2–0,6	4,5	<ul style="list-style-type: none"> oxidoredukční aktivita (oxidace Fe^{2+} na Fe^{3+}) vazba mědi (váže až 90 % Cu v séru) 	↓ Wilsonova choroba (hepatolentikulární degenerace)
β_1 oblast	Transferrin 77 000	2,0–3,6	7	<ul style="list-style-type: none"> transport a vychytávání volného železa 	↑ nedostatek železa ↓ malnutrice ↓ hepatopatie ↓ zánět
	Hemopexin 57 000	0,5–1,1	3–7	<ul style="list-style-type: none"> vazba hemu 	
	β-lipoprotein 2 750 000	0,7–0,9 (Apo B-100)	3	<ul style="list-style-type: none"> lipoprotein o nízké hustotě (LDL) transport cholesterolu k buňkám velmi vysoká molekulární hmotnost 	
	C4 složka komplementu 206 000	0,1–0,4	1	<ul style="list-style-type: none"> součást komplementu 	↑ zánět ↓ autoimunitní stavy
β_2 oblast	C3 složka komplementu 180 000	0,8–1,4	1	<ul style="list-style-type: none"> součást komplementu 	↑ zánět ↓ autoimunitní stavy
	β_2-mikroglobulin 11 800	0,001–0,002		<ul style="list-style-type: none"> součást leukocytárních antigenů 	↑ hematologické nádory ↓ porucha tubulární resorpce
	Fibrinogen 340 000	1,5–4,5		<ul style="list-style-type: none"> součást koagulační kaskády, prekurzor fibrinu fyziologicky jen v plazmě, není v séru 	↑ zánět
	C-reaktivní protein 111 000	1,5–5 mg/l	1	<ul style="list-style-type: none"> aktivace komplementu 	↑ akutní zánět (bakteriální)
γ oblast	IgG 150 000	8,0–18,0	24	<ul style="list-style-type: none"> pozdní protilátky 	↑ (chronický) zánět
	IgA^[p 2] 160 000	0,9–3,0	6	<ul style="list-style-type: none"> protilátky slizniční imunity 	↑ záněty sliznic a jater
	IgM 900 000	0,6–2,5	5	<ul style="list-style-type: none"> časné protilátky 	↑ akutní zánět

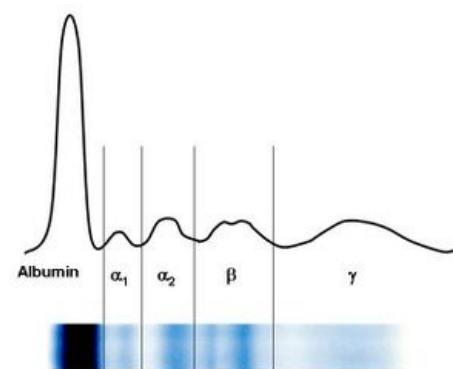
- Haptoglobin existuje ve třech fenotypech. Jeden z nich má tendenci vytvářet polymery o vysoké molekulové hmotnosti.
- Elektroforetická pohyblivost zahrnuje i β -oblast.

Podrobněji se zmíníme o albuminu a dále budeme charakterizovat skupinu bílkovin akutní fáze a imunoglobulinů.

Albumin

Albumin je sérová bílkovina, která se podílí 55–65 % na celkové bílkovině v séru (průměrná koncentrace albuminů v plazmě je 40 g/l^[12]). Je syntetizován v játrech a jeho tvorba závisí na příjmu aminokyselin.

- Albumin se podílí podstatným způsobem na udržování onkotického tlaku plazmy. Hodnoty albuminu nižší než 20 g/l jsou spojeny s výskytem edémů.
- Plní transportní funkce. Transportuje bilirubin, hem, steroidní látky, tyroxin, mastné kyseliny, žlučové kyseliny, kovy, léky a další látky.
- Vytváří proteinovou rezervu organismu a slouží jako zdroj aminokyselin, zvláště esenciálních aminokyselin pro různé tkáně. Při malnutrici se jeho koncentrace snižuje. Koncentrace albuminu v séru není však dobrým indikátorem časně proteinové malnutrice, protože při nedostatku aminokyselin se snižuje i katabolismus albuminu a albumin se přemísťuje z intersticia, aby se zachovalo adekvátní množství v plazmě. Pomalý pokles je dán rovněž delším poločasem a velkou tělesnou zásobou. Z tohoto důvodu neodráží plný rozsah nutričního deficitu.



Elektroforéza plasmatických proteinů

Reaktanty akutní fáze

Reakce akutní fáze je fyziologický děj, který se projevuje **systémovým uvolněním mediátorů zánětu**, v důsledku rozvoje patologických procesů (zánět, traumata, chirurgické výkony, infarkt myokardu, porod, nádorové procesy, stres, nadměrná fyzická zátěž).

Mediátory slouží k zajištění celkové odpovědi organismu, vzájemné **komunikaci a regulaci** probíhajících dějů. Rovněž vytváří **celkové příznaky** (horečka, únava, malátnost, bolest svalů a kloubů). Klinický význam mají látky, jejichž syntéza vzniká v důsledku známé patologie, případně když jejich koncentrace koresponduje s mírou poškození tkání. Takové látky nazýváme markery (jejich stanovením můžeme potvrdit či vyloučit diagnostiku jiného onemocnění).

Význam pozitivních reaktantů akutní fáze

Soubor proteinů akutní fáze je značně různorodý. Přesto lze podle účinku většinu z nich zařadit do některé z následujících skupin:

Složky imunitní reakce

Některé reaktanty akutní fáze se přímo podílejí na likvidaci noxy, která způsobila zánět. Další bílkoviny mají úlohu při odstraňování poškozených buněk, nebo modulují imunitní reakci. Patří sem např.

- C-reaktivní protein,
- složky komplementu, zejména C3 a C4,
- tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 1 (IL-1) a interleukin 6 (IL-6).



Struktura albuminu

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. Jsou to hlavně proteolytické enzymy a reaktivní formy kyslíku. Účinek těchto látek je třeba omezit, aby působily jen tam, kde mají – tj. aby tzv. *kolaterální poškození tkáně* bylo co nejmenší. Mezi reaktanty akutní fáze proto najdeme

inhibitory proteáz

- α_1 -antitrypsin,
- α_1 -antichymotrypsin,
- α_2 -makroglobulin,

bílkoviny, které snižují tvorbu a dostupnost reaktivních forem kyslíku

Jde nejen o scavengery reaktivních forem kyslíku v pravém slova smyslu, ale také o bílkoviny, které váží a stabilizují přechodné kovy a jejich komplexy. Tím snižují tvorbu ROS ve Fentonově reakci a podobných pochodech. Patří mezi ně

- haptoglobin,
- hemopexin,
- ferritin,
- ceruloplasmin.

Transport odpadních látek vznikajících během zánětu

Kromě hemoglobinu a hemopexinu uvedených výše sem pravděpodobně patří

- sérový amyloid A (SAA).

Koagulační faktory a bílkoviny podílející se na regeneraci tkáně, např.

- fibrinogen.

Význam některých pozitivních reaktantů akutní fáze zůstává **neznámý**, přestože se může jednat o bílkoviny klinicky významné (používají se jako zánětlivé parametry). Zmíníme například prokalcitonin (PCT).

Rychlost změn koncentrace reaktantů akutní fáze

Plazmatická koncentrace různých reaktantů akutní fáze se mění různě rychle. Podle doby od začátku onemocnění, za níž se změní, rozdělujeme reaktanty akutní fáze do tří skupin:

Časné proteiny akutní fáze

jsou bílkoviny s velmi krátkým biologickým poločasem. Změny jejich plazmatické koncentrace jsou patrné již za 6–10 hodin po začátku onemocnění. Vzestup vrcholí obvykle v průběhu druhého a třetího dne. Hlavními představiteli jsou především **C-reaktivní protein (CRP)** a **sérový amyloid A (SAA)**. Nověji se v klinické praxi používá **prokalcitonin (PCT)**.

C-reaktivní protein

C-reaktivní protein (CRP) je hlavní bílkovina reaktantů akutní fáze. Je to látka, která hraje úlohu opsoninu. Své jméno získal díky tomu, že precipituje s tzv. *C-polysacharidem pneumokoků*^[13]. Je součástí vrozené imunity.

Plazmatická koncentrace CRP se zvyšuje již za **4 hodiny** po navození reakce akutní fáze a v průběhu prvních dvou dnů jeho koncentrace vzroste i více než 100krát. Maximální koncentrace je dosaženo za 24–48 hodin, přibližně 24 hodin je i poločas CRP^[14].

Fyziologicky bývá plazmatická koncentrace do **8–10 mg/l**^[15]. Rychlý a vysoký vzestup CRP (typicky na hodnoty nad **50 mg/l**) doprovází především **akutní bakteriální infekce**, méně obvykle také mykotické infekce. Virové infekce naproti tomu bývají charakterizovány relativně malým vzestupem CRP (zpravidla pod **25 mg/l**)^[16]. Stanovení plazmatické koncentrace CRP proto napomáhá v rozhodnutí, zda zahájit léčbu antibiotiky^[13]. Úspěšná antibiotická terapie se pak projeví rychlým poklesem CRP, naopak při neúspěšné léčbě přetrvává zvýšení.

Stanovením CRP lze odhalit riziko **pooperační infekce**. Třetí den po operaci má jeho koncentrace rychle klesat k normě. Přetrvávající zvýšení nebo jen částečný pokles, následovaný dalším zvýšením, naznačuje přítomnost infekce nebo jiné zánětlivé komplikace.

Mírný vzestup CRP provází i infarkt myokardu. Obecně lze také říci, že mírně elevované hladiny CRP (obvykle nad **10 mg/l**) patří mezi známky vysokého kardiovaskulárního rizika^[17]. Sledování koncentrací CRP je užitečné i při monitorování autoimunitních onemocnění^[18].

Nevýhodou CRP je jeho **nízká specifita**. Na rozdíl od prokalcitoninu neinformuje o závažnosti orgánového poškození, nýbrž pouze o přítomnosti infekce. Vzájemně se tyto dva markery nenahrazují, ale doplňují.

Struktura

Molekula CRP je tvořena **5 nekovalentně spojenými jednotkami**, z nichž každá je tvořena jednoduchým neglykosylovaným polypeptidovým řetězcem. CRP patří do skupiny **pentraxinů**.

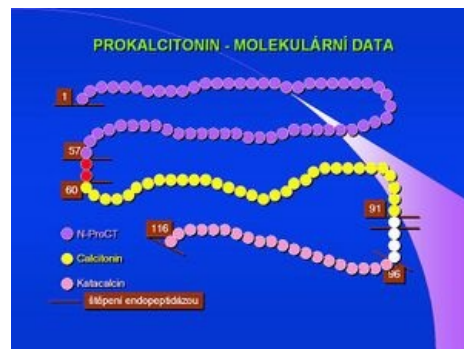
Funkce

Mezi hlavní funkce CRP patří:

- **Opsonizace**, jejíž princip spočívá ve vazbě CRP na fosfatidylcholin, který je součástí bakteriálních stěn.
- Aktivace **komplementu**,
- **stimulace fagocytujících buněk**,
- schopnost vázat **C-polysacharid** buněčné stěny *Streptococcus pneumoniae*.

Prokalcitonin

V posledních letech se ve výzkumu i v klinické praxi začíná jako reaktant akutní fáze využívat **prokalcitonin (PCT)**. Tuto bílkovinu o 116 aminokyselinách a molekulové hmotnosti 13 000 fyziologicky tvoří C buňky štítné žlázy jako prekurzor hormonu kalcitoninu. Zejména při generalizovaných bakteriálních infekcích jej však začnou produkovat i další buňky, hlavně neuroendokrinní buňky plic a střeva, ale i buňky parenchymatózních orgánů a při sepsi prakticky všechny tkáně a typy buněk^[19]. Koncentrace této bílkoviny pak v plazmě prudce stoupá. PCT uvolněný při sepsi není konvertován na kalcitonin.^[20] Přesný fyziologický význam prokalcitoninu není zdaleka objasněn; předpokládá se, že se podílí na regulaci zánětu a má analgetické účinky. Poločas prokalcitoninu je 1 den a po imunitní stimulaci vzrůstá jeho sérová koncentrace již během 2–3 hodin asi dvacetinásobně. Zvýšení lze pozorovat jen při **generalizovaných bakteriálních, mykotických a protozoárních infekcích**, neobjevuje se u virových infekcí. S méně výrazným vzestupem se lze setkat u polytraumat, popálenin a po rozsáhlých břišních operacích.



Prokalcitonin – molekulární data

 **Podrobnější informace naleznete na stránce Prokalcitonin.**

Proteiny akutní fáze se střední dobou odpovědi

jsou proteiny, jejichž koncentrace se mění 12–36 hodin po začátku onemocnění a maxima je dosaženo ke konci prvního týdne. Patří k nim α_1 -kyselý glykoprotein (orosomukoid), α_1 -antitrypsin, haptoglobin a fibrinogen.

Pozdní proteiny akutní fáze

jsou zastoupeny složkami komplementu C3 a C4 a ceruloplazminem, u nichž se změny rozvíjí až po 48–72 hodinách po začátku onemocnění. Vzestup koncentrací je ve srovnání s oběma předchozími skupinami proteinů méně vyjádřen a vrcholu dosahují až po 6–7 dnech.

Negativní reaktanty akutní fáze

Negativní reaktanty akutní fáze jsou bílkoviny, jejichž hladiny se v průběhu akutní zátěže snižují. Hlavními zástupci jsou albumin, prealbumin a transferin. Pro sledování a hodnocení průběhu reakce na zátěž mají menší význam než pozitivní reaktanty. Často jsou však využívány jako kritérium syntézy bílkovin v játrech a jako ukazatelé malnutrice.

Imunoglobuliny

 *Podrobnější informace naleznete na stránce Protilátka.*

Protilátky (imunoglobuliny) jsou specifické globuliny krevní plazmy s elektroforetickou pohyblivostí β - γ . Vznikají v plazmatických buňkách jako humorální součást imunitní reakce na určitý antigen. Molekula imunoglobulinu má schopnost specificky vázat příslušný antigen, proti kterému se vytvořila. Po vazbě vzniká imunitní komplex. Kromě toho imunoglobuliny plní další funkce zahrnující např. vazbu komplementu, vazbu na neutrofilní leukocyty a makrofágy, aktivaci fagocytózy. Imunoglobuliny dělíme na **5 tříd** - **IgG, IgM, IgA, IgD a IgE**. U třídy IgG byly popsány ještě podtřídy - IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-4, jejichž funkce se liší. Rovněž třída IgA není jednotná, tvoří ji podtřídy IgA-1 a IgA-2. Základní struktura molekuly imunoglobulinu je tvořena **dvěma stejnými těžkými řetězci (H-řetězce)**, označovaných podle jednotlivých tříd γ , μ , α , δ a ϵ , a **dvěma lehkými řetězci (L-řetězce)** κ a λ , které jsou pro jednotlivé třídy společné. Každá molekula imunoglobulinu obsahuje buď κ nebo λ řetězce. Při první infekci bakteriemi či protozoy nastupuje v průběhu 2–3 dnů tvorba protilátek IgM, která je později během 5–7 dnů vystřídána tvorbou IgG se stejnou specifitou. Opakovaná infekce způsobí rychlé zvýšení hodnot IgG a malé zvýšení koncentrace IgM. Výrazné změny množství imunoglobulinů se projeví při elektroforetickém vyšetření jako:

- hypogamaglobulinemie (snížení vrcholu v oblasti γ);
- hypergamaglobulinemie;
 - polyklonální (zvýšení vrcholu β - γ globulinu o široké bázi);
 - monoklonální (úzký vrchol v oblasti β - γ globulinů).

Hypogamaglobulinemie

Hypogamaglobulinemie vzniká v důsledku zvýšených ztrát imunoglobulinů močí nebo střevem. Jinou závažnou příčinou je pokles tvorby imunoglobulinů, který může postihovat všechny nebo pouze jednotlivé třídy. Tyto defekty humorální imunity mohou být primární nebo sekundární a jsou příčinou závažných imunodeficitních stavů projevujících se opakovanými infekcemi s těžkým průběhem.

Hypergamaglobulinemie

Polyklonální hypergamaglobulinemie

Polyklonální hypergamaglobulinemie se vyvíjí jako odpověď na antigenní stimulaci, při níž dochází k aktivaci *více klonů plazmatických buněk*, a tím i ke zvýšení koncentrace imunoglobulinů, které postihuje jednu nebo více tříd imunoglobulinů – mluvíme o **polyklonální gamapatii**.

- Setkáváme se s ní při **chronických infekcích, jaterních a autoimunitních onemocněních**.
- Při elektroforetickém vyšetření zjišťujeme zvýšení frakce gamaglobulinů vytvářející široký neostře ohraničený pruh v oblasti γ -globulinů.

Monoklonální hypergamaglobulinemie

Monoklonální imunoglobuliny (paraproteiny) jsou imunoglobuliny nebo fragmenty imunoglobulinů produkované **jediným klonem plazmatických buněk**. Jejich znakem je homogennost molekuly se stejnou primární strukturou; jsou zastoupeny imunoglobuliny se stejnou specifitou, tvořené pouze jedním typem těžkého řetězce a rovněž jedním typem lehkého řetězce.

- Fyzikálně-chemická homogenita paraproteinu se při elektroforéze projeví úzkým vrcholem, obvykle v oblasti β - γ globulinů.
- Monoklonální imunoglobuliny jsou nejčastěji třídy IgG a IgM. Jsou tvořeny buď kompletní molekulou imunoglobulinu, samotnými volnými lehkými řetězci (**Bence-Jonesova bílkovina**) nebo samotnými těžkými řetězci.
- Bence-Jonesova bílkovina snadno přechází glomerulárním filtrem do moči.
- Nález monoklonálních imunoglobulinů je příznakem maligního onemocnění **plazmocytomu (= mnohočetný myelom)**, který je vyvolán nádorovým bujením jednoho klonu plazmatických buněk, nebo **benigní monoklonální gamapatie**.

Metody stanovení bílkovin v séru

Základním vyšetřením proteinů v séru nebo plazmě je stanovení jejich souhrnné koncentrace – tzv. **celkové bílkoviny**. Při nálezů patologických hodnot a v dalších indikovaných případech následuje podrobnější vyšetření, které zahrnuje **elektroforézu sérových bílkovin, imunofixaci a cílené stanovení koncentrace vybraných sérových proteinů**.

Celková bílkovina

Stanovení celkové bílkoviny v séru je běžná a dostupná metoda. Vyšetření koncentrace celkové bílkoviny v séru nám poskytuje orientační informaci o biosyntéze, utilizaci a exkreci bílkovin. Změnu ve složení sérových bílkovin vyvolávají různá onemocnění, ale pouze některé se projeví odchylkou v hodnotách celkové bílkoviny.

Koncentrace celkové bílkoviny v séru může být ovlivněna těmito základními faktory:

- hydratací organismu;
- změnou biosyntézy jednoho nebo více specifických proteinů;
- rychlostí ztrát jednoho nebo více specifických proteinů.

Hypoproteinemie

Hypoproteinemie je označení pro *sníženou koncentraci bílkoviny v séru*.

Absolutní hypoproteinemie vzniká v důsledku *sníženého množství bílkoviny v séru* při:

- zvýšených ztrátách;
 - ledvinami;
 - gastrointestinálním traktem (např. záněty střeva);
 - kůží (popáleniny);
 - krvácením;
 - do „3. prostoru“ (např. do břišní dutiny při ascitu);
- snížené proteosyntézy v játrech (chronická jaterní onemocnění);
- nedostatečném příjmu bílkoviny potravou při poruchách výživy.

U **relativní hypoproteinemie** je zachováno normální množství bílkovin, které jsou ale v důsledku retence vody a elektrolytů „naředěné“ (stav *hyperhydratace*). Koncentrace individuálních proteinů jsou sníženy ve stejném poměru.

Hyperproteinemie

Hyperproteinemií rozumíme *zvýšenou koncentraci celkové bílkoviny v séru*.

Absolutní hyperproteinemie je *zvýšení koncentrace bílkoviny* vyvolané obvykle zvýšenou syntézou některých specifických proteinů, např. imunoglobulinů (plazmocyty).

Relativní hyperproteinemie vzniká jako následek *dehydratace organismu* při nedostatečném příjmu či nadměrných ztrátách tekutin (těžké průjmy, zvracení). Celkové množství bílkovin je zachováno a koncentrace jednotlivých proteinů je zvýšená proporcionálně.

Princip stanovení celkové bílkoviny

Celkovou bílkovinu v séru stanovujeme **biuretovou reakcí**.

V **alkalickém prostředí v přítomnosti měďnatých solí** dávají bílkoviny fialové zbarvení, vhodné k fotometrickému stanovení^{[22][23]}. Zjednodušeně se dá říci, že se vytvářejí komplexní sloučeniny Cu^{2+} s ionty peptidových vazeb^[21]. Vzniklý komplex silně absorbuje světlo v oblasti 540–560 nm. Intenzita zbarvení komplexu se měří fotometricky a je přímo úměrná koncentraci bílkovin. Biuretovou reakci obecně poskytují látky obsahující v molekule alespoň dvě peptidové vazby ($-\text{CO}-\text{NH}-$) nebo dvě skupiny $-\text{CO}-\text{NH}_2$. Reakce tedy není specifická pouze pro bílkoviny. Nejjednodušší sloučeninou reagující s měďnatými solemi v alkalickém prostředí je **biuret** obsahující dvě peptidové vazby. Aminokyseliny a dipeptidy nereagují.

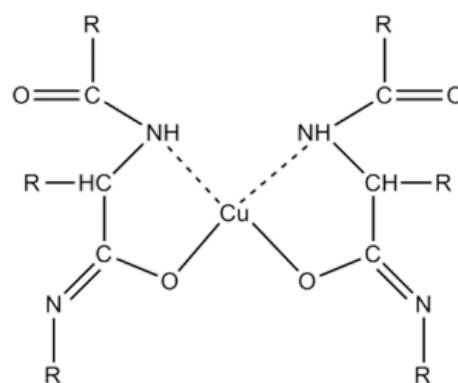
Součástí biuretového činidla je **síran měďnatý**, který poskytuje Cu^{2+} pro tvorbu komplexů s peptidovými vazbami, a alkalizující složka (hydroxid), který převede peptidovou vazbu na enolformu a umožní tak účast atomů kyslíku v komplexu. Dalšími složkami činidla jsou **vinan draselno-sodný**, který zabráňuje jako komplexotvorná látka srážení Cu^{2+} na $\text{Cu}(\text{OH})_2$, a **jodid draselný**, který chrání Cu^{2+} před autoredukci. Citlivost biuretové metody se pohybuje kolem 1–10 g bílkoviny/l.

Referenční rozmezí: Koncentrace celkové bílkoviny v séru (S-celková bílkovina): **65–85 g/l**

Albumin

Stanovení koncentrace albuminu v séru patří mezi rozšířená biochemická vyšetření, vhodná zejména u onemocnění jater, ledvin a hodnocení nutričního stavu. Snížení albuminu může doprovázet chronické záněty a zvýšení katabolismu u některých chorobných stavů. Ostatní příčiny snížení nebo zvýšení koncentrace albuminu jsou podobné jako u celkové bílkoviny.

Princip stanovení albuminu



Komplex bílkoviny s měď v alkalickém prostředí (zjednodušeno podle ^[21])

Ve slabě kyselém prostředí se albumin chová jako kation. Může reagovat s aniontovými barvivy a vzniká **komplex albumin-barvivo**. Navázání barviva je provázáno změnou jeho zbarvení. K vazbě dochází v mírně kyselém prostředí za přítomnosti povrchově aktivních látek.

Používají se organická barviva, která s albuminem reagují podstatně rychleji než s ostatními sérovými bílkovinami. Nejčastěji obsahují skupinu -SO₃H. Příkladem může být **bromkresolový purpur nebo bromkresolová zeleň**.

Referenční rozmezí: Koncentrace albuminu v séru (S-albumin): **35-53 g/l**

Pro stanovení albuminu v jiných tekutinách, např. v moči nebo v mozkomíšním moku, se obvykle používají citlivější imunochemické metody (nejčastěji imunoturbidimetrie).

Elektroforéza bílkovin v séru

Princip elektroforézy sérových bílkovin

 Podrobnější informace naleznete na stránce [Elektroforéza](#).

Elektroforéza (ELFO) je založena na pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Stanovované látky musí mít charakter iontů nebo amfolytů. Bílkoviny patří mezi amfolyty, které mohou nabývat kladného i záporného náboje v závislosti na pH pufru, při kterém elektroforéza probíhá. Je-li směs nabitých částic vystavena působení elektrického pole, začnou se molekuly látek pohybovat. Pohyblivost bílkovin je ovlivněna těmito faktory:

- charakterem dělené látky (velikost náboje, tvar a velikost molekul, relativní molekulová hmotnost);
- vlastnostmi prostředí, ve kterém dělení probíhá (hodnota pH, iontová síla, napětí, proud).

Pozitivně nabitě molekuly proteinů se lépe adsorbují než negativně nabitě molekuly, a proto při elektroforéze proteinů jsou využívány negativní náboje. Izoelektrický bod většiny sérových bílkovin je v oblasti slabě kyselé při pH 5–6. Proto v prostředí alkalického pufru, nejčastěji pH 8,6, budou u sérových bílkovin převažovat záporné náboje a jejich pohyb bude s různou rychlostí směřovat k anodě. Albumin vykazuje nejvyšší negativní náboj a tím i nejrychlejší pohyblivost k anodě.

Elektroforéza může probíhat na různých nosičích. Historicky nejstarším byl chromatografický papír. V klinicko-biochemické praxi se nejčastěji setkáváme s elektroforézou **na acetátcelulózových foliích nebo na agarózovém gelu**. Při elektroforéze, která využívá jako nosič papír nebo acetátcelulózu, putují molekuly bílkovin roztokem pufru, který je vně nosiče. Molekuly se tedy dělí především podle svého náboje. Podobně se budou dělit bílkoviny i v málo koncentrovaném agarózovém gelu.

Pomocí elektroforézy se bílkoviny krevního séra rozdělí obvykle na 5–6 frakcí – **albuminovou, α_1 , α_2 , β , γ frakce** se někdy rozliší na β_1 a β_2 . S výjimkou albuminů jsou další frakce tvořeny vždy skupinou bílkovin, které mají přibližně stejnou elektroforetickou pohyblivost.

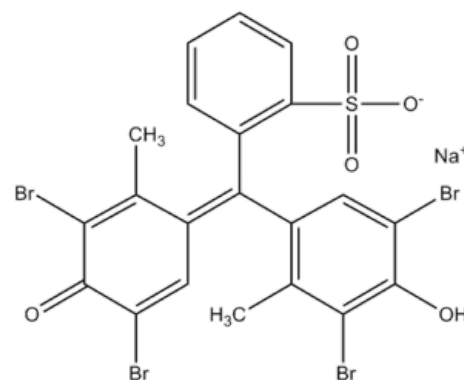
Provedení

Kapka séra je přidána na sklíčko s elektroforetickým **agarózovým gelem** a rozprostřena po „startovní čáře“, kolmo na směr budoucího elektrického pole. Poté je vystavena účinkům **elektrického pole** v elektroforetické vaně. Vlivem elektrického pole začínají proteiny **migrovat** v agarózovém gelu.

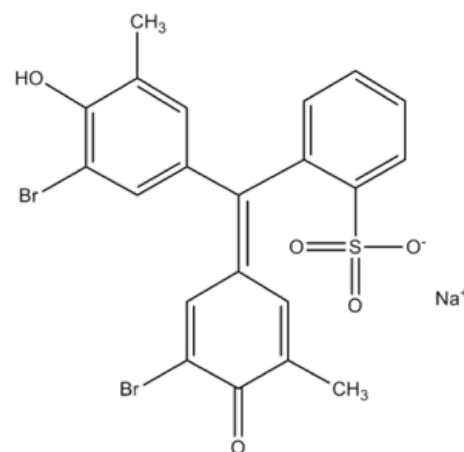
Po uplynutí určité doby (např. 30 minut při napětí 120 V) se bílkoviny v gelu denaturují („fixují“), zpravidla působením alkoholů (metanolu) a kyselin (kyseliny octové). Tím se zabrání jejich difuzi nebo vymytí z gelu v dalších krocích. Poté se bílkoviny obarví vhodným organickým barvivem (např. amidočerní). Poloha jednotlivých frakcí a koncentrace bílkovin v nich se poté hodnotí pomocí denzitometrie.

Více informací o elektroforéze formou on-line videa najdete např. na stránkách Masarykovy Univerzity (http://portal.med.muni.cz/player_ext.php?lid=17&link=elfo_pro_480.flv%7CLF).

Hodnocení elektroforézy sérových bílkovin



Bromkresolová zeleň



Bromkresolový purpur

Rerenční hodnoty jednotlivých elektroforetických frakcí

Název frakce	Hodnoty v relativních %	Hodnoty v g/l
Albumin	55-69	35-44
α_1	1,5-4	1-3
α_2	8-13	5-8
β	7-15	4-10
γ	9-18	5-12

Charakteristika jednotlivých frakcí

Zóna prealbuminu

V této oblasti se pohybuje prealbumin (transthyretin), jehož zóna je však velmi diskrétní a těžko hodnotitelná.

Zóna albuminu

Albumin vytváří poměrně širokou a z obou stran dobře ohraničenou zónu. Při poklesu koncentrace albuminu pod 30 g/l je patrné její oslabení. Vzácně pozorované zdvojení frakce je projevem genetické strukturní odchylky albuminu u heterozygotů – bisalbuminémie nebo vzniká při navázání cizorodé substance na albumin, např. penicilinu.

Interzóna mezi albuminem a α_1 -globuliny

Slabé homogenní zbarvení této oblasti je podmíněno α_1 -lipoproteiny. Podobnou elektroforetickou pohyblivost vykazuje také α_1 -kyselý glykoprotein, ale zbarvení zóny ovlivňuje minimálně.

Zóna α_1 -globulinů

Zónu α_1 -globulinů ovlivňuje především α_1 -antitrypsin. Při akutních zánětech je zřetelné zesílení. Klinicky významná je genetická variabilita α_1 -antitrypsinu, která se v elektroforéze může často zřetelně projevit oslabením, někdy až vymizením jeho zóny se současnou změnou pohyblivosti.

Interzóna mezi α_1 a α_2 -globuliny

Obvykle je celá slabě homogenně zbarvená.

Zóna α_2 -globulinů

Na vytváření této zóny se podílejí především dvě bílkoviny – α_2 -makroglobulin a haptoglobin. Změny koncentrace α_2 -makroglobulinu nemají velký diagnostický význam. Haptoglobin vytváří 6 fenotypů, které se liší elektroforetickou pohyblivostí. Elektroforetické vyšetření neumožňuje rozlišení fenotypů haptoglobinu.

Interzóna mezi α_2 a β_1 -globuliny

Normálně se barví pouze slabě. Při hemolýze vznikají komplexy hemoglobin-haptoglobin, které v této oblasti vytvářejí samostatnou zónu.

Zóna β_1 -globulinů

Tvar a intenzita zbarvení zóny β_1 -globulinů je ovlivněna prakticky pouze transferinem. Intenzita zóny dobře koreluje s celkovou vazebnou kapacitou plazmy pro železo. Při anemii z nedostatku železa a v těhotenství se zvyšuje syntéza transferinu a intenzita zóny se zesílí. Další protein s β_1 -elektroforetickou pohyblivostí, hemopexin, se špatně barví používanými barvivy a změny v jeho koncentraci se v elektroforéze neprojeví.

Interzóna mezi β_1 a β_2 -globuliny

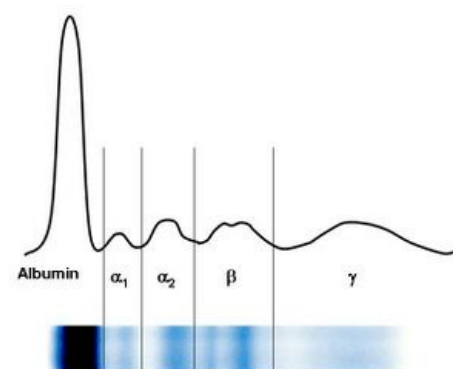
V této oblasti nalézáme imunoglobulin IgA, který podmiňuje homogenní zbarvení zóny. Dále zde vytváří typickou linii β -lipoprotein, jejíž přítomnost závisí na jeho koncentraci.

Zóna β_2 -globulinů

Na vytváření zóny β_2 -globulinů se podílí C3 složka komplementu. Podle intenzity zbarvení se dá těžko odhadnout koncentrace C3.

Zóna γ -globulinů

Charakter zóny γ -globulinů je ovlivněn koncentracemi čtyř podtříd imunoglobulinu IgG. Zvýšení IgG se projeví intenzivnějším zbarvením a rozšířením zóny v obou směrech. Imunoglobulin IgM leží blíže startu. Samostatné nebo současné zvýšení koncentrace IgM pomocí elektroforézy nerozpoznáme.



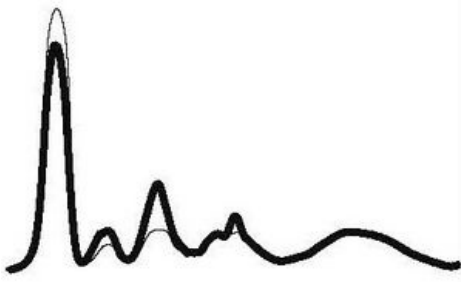
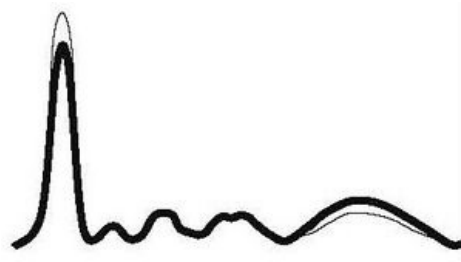
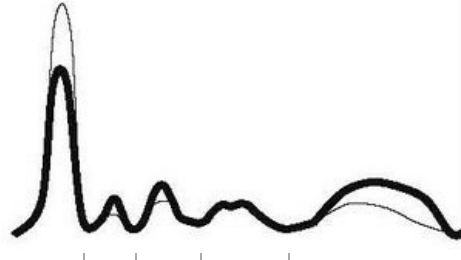
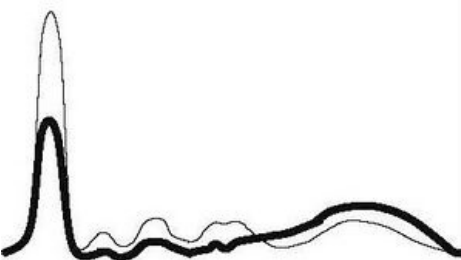
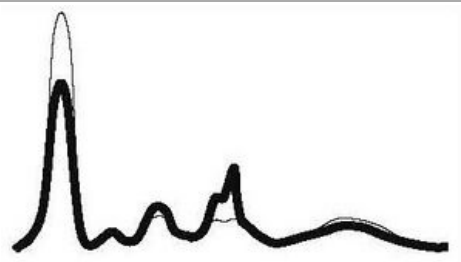
Elektroforéza plazmatických bílkovin a denzitometrický záznam

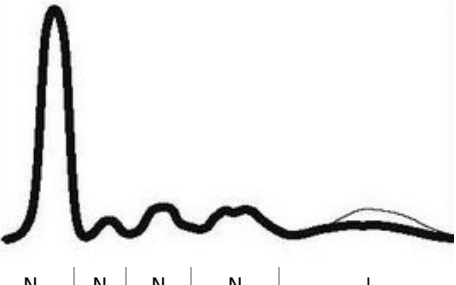
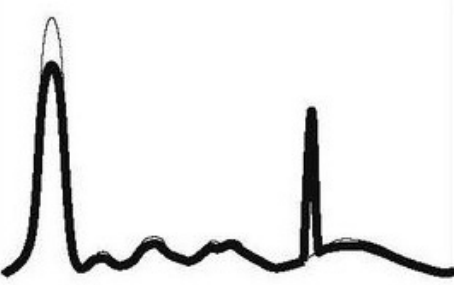
Klinické využití

Elektroforéza sérových bílkovin (ELFO) se provádí zejména, zjistíme-li patologický výsledek celkové bílkoviny, nebo potřebujeme-li podrobnější informaci o sérových bílkovinách. Zvláště cenné je pro průkaz:

- **dysproteinemie** – změna koncentrace a kvalitativního složení jednotlivých bílkovin v séru,
- **paraproteinemie** – charakterizována přítomností monoklonálních imunoglobulinů.

ELFO u některých patologických stavů

Typ elektroforeogramu	Komentář	Alb	α_1	α_2	β	γ	Výskyt (příklad)	
Akutní zánět	<ul style="list-style-type: none">▪ zvýšení pozitivních reaktantů akutní fáze (α_1-antitrypsinu, orosomukoidu, haptoglobinu, ceruloplazminu, CRP, C3)▪ pokles negativních reaktantů akutní fáze		↓ nebo N	↑	↑	N	<ul style="list-style-type: none">▪ akutní fáze infekčních onemocnění▪ akutní poškození tkáně (infarkt myokardu, chirurgický výkon)▪ větší popáleniny	
Chronický zánět	<ul style="list-style-type: none">▪ polyklonální zmnožení imunoglobulinů		↓ nebo N	N	N	N	↑	<ul style="list-style-type: none">▪ rekonvalescence po infekčním onemocnění▪ některá revmatická onemocnění
Chronický aktivní zánět	<ul style="list-style-type: none">▪ zvýšení α-globulinů svědčí o reaktivaci procesu		↓	↑	↑	N	↑	<ul style="list-style-type: none">▪ chronická aktivní revmatoidní artritida
Hepatální typ	<ul style="list-style-type: none">▪ vážné proteosyntéza v hepatocytech▪ nadměrná tvorba imunoglobulinů▪ někdy se neoddělí β a γ frakce (tzv. β-γ můstek – při zvýšení IgA)		↓	↓	↓	↓	↑	<ul style="list-style-type: none">▪ chronická jaterní onemocnění – jaterní fibróza a cirhóza
Nefrotický typ	<ul style="list-style-type: none">▪ výrazné ztráty bílkovin močí (převládají renální ztráty albuminu)▪ zvýšení bílkovin s největší Mr – α_2-makroglobulinu a β-lipoproteinu		↓	N	↑	↑	↓ nebo N	<ul style="list-style-type: none">▪ nefrotický syndrom
Hypogamaglobulinemie	<ul style="list-style-type: none">▪ pokles v oblasti γ globulinů							<ul style="list-style-type: none">▪ primární deficit tvorby protilátek▪ sekundární deficit tvorby

		 <p>N N N N ↓</p>	protilátek ■ ztráty imunoglobulinů
Monoklonální gamapatie	■ homogenní vrchol kdekoli v oblasti β až γ ¹	 <p>↓ ↓ ↓ ↑ ↑</p>	■ benigní monoklonální gamapatie ■ maligní monoklonální gamapatie (myelom)

Bílkoviny v moči

Fyziologicky obsahuje moč velmi malé množství bílkovin, které není detekovatelné základními srážecími nebo kolorimetrickými technikami – mluvíme o tzv. **fyziologické proteinurii**. Vyskytne-li se v moči bílkovin větší množství, jde o **proteinurii** v užším slova smyslu.

Fyziologická proteinurie

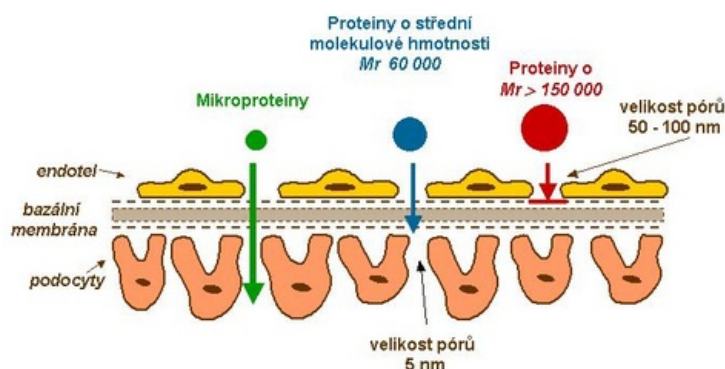
Zdravý dospělý člověk vyloučí moči při běžné fyzické aktivitě obvykle asi **50-80 mg bílkovin, maximálně 96 mg/m² (tj. asi 150 mg) za 24 hodin** („fyziologická proteinurie“). Asi 40 % těchto bílkovin představují **plazmatické bílkoviny** a zbývajících 60 % připadá na **bílkoviny z ledvin** (Tamm-Horsfallův uromukoid) a z **vývodných cest močových** (sekreční IgA a blíže nedefinované glykoproteiny a glykopeptidy).

Množství a složení bílkovin v moči závisí na jejich filtraci stěnou glomerulární membrány, na resorpci v tubulárních buňkách a na renální hemodynamice.

Za normálních okolností zabraňuje glomerulární membrána exkreci látek s molekulovou hmotností $M_r > 60\,000$.

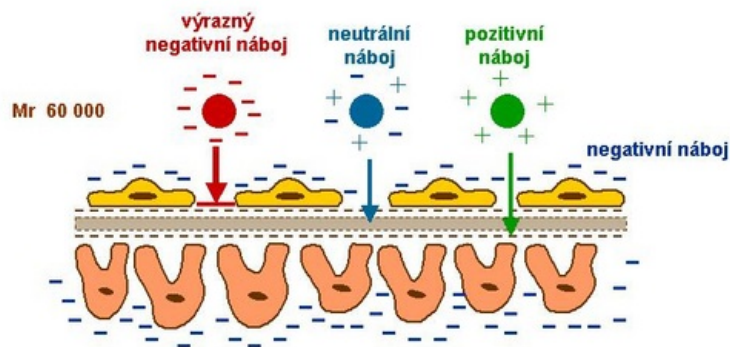
Při glomerulární ultrafiltraci se uplatňují **dva podstatné faktory**:

1. **Mikroporézní struktura glomerulární bazální membrány** brání průniku plazmatických bílkovin o M_r větší než 100 000–150 000 (např. IgG a IgA). Mluvíme o **selektivě podle velikosti**.



Glomerulární membrána propouští plazmatické bílkoviny s malou molekulovou hmotností, které jsou pak v proximálních tubulech reabsorbovány a katabolizovány.

2. **Elektrostatická bariéra** je dána povrchem všech strukturních složek glomerulární stěny. Hydratované polyanionické makromolekuly struktur glomerulární stěny vykazují převažující negativní náboj. Většina plazmatických bílkovin má rovněž negativní náboj, který způsobuje, že jsou odtlačovány. Tímto mechanismem je zabraňováno prostupu bílkovin i s molekulovou hmotností kolem 60 000–70 000 (např. albumin a transferin). Neutrální nebo dokonce pozitivně nabitě molekuly procházejí glomerulárním filtrem mnohem snadněji. Jedná se o **selektivitu podle náboje**.



Klasifikace proteinurií

Klasifikace proteinurií má značnou diagnostickou hodnotu. Proteinurie můžeme rozdělit do tří základních skupin, které se dále třídí:

- **Prerenální.**
- **Renální:**
 - **glomerulární proteinurie,**
 - selektivní,
 - neselektivní,
 - **tubulární proteinurie,**
 - **smíšená proteinurie.**
- **Postrenální.**

Prerenální proteinurie

Prerenální proteinurie (proteinurie z „přetékání“, overflow proteinurie) vzniká při vysokých plazmatických koncentracích nízkomolekulárních bílkovin, které i za fyziologických okolností mohou procházet do ultrafiltrátu. Glomerulární permeabilita bílkovin nemusí být porušena. Tubulární resorpce může být rovněž normální, ale vzhledem ke zvýšené náloži část bílkovin uniká do moči, protože je překročena resorpční kapacita proximálního tubulu.

Prerenální proteinurie vzniká např. při nadměrné **intravaskulární hemolýze**, kdy se v moči objevuje *hemoglobin* (hemoglobinurie), nebo při **crush syndromu** a **rabdomyolýze** v moči prokazujeme *myoglobin* (myoglobinurie). Přítomnost lehkých řetězců imunoglobulinů v moči (tzv. *Bence-Jonesova bílkovina*) svědčí o **myelomu**. Prerenální proteinurie často doprovází začátek některých **akutních zánětlivých a nekrotizujících onemocnění**. Jsou podmíněny vylučováním tkáňových degradačních produktů a v určité míře i některých *nízkomolekulárních bílkovin* **akutní fáze** (např. orosomukoid).

Renální proteinurie

Renální proteinurii rozdělujeme podle postižené části nefronu na **glomerulární, tubulární a smíšenou**.

Glomerulární proteinurie

je projevem zvýšené propustnosti glomerulární stěny pro bílkoviny. Při **selektivní** glomerulární proteinurii, kdy zaniká negativní náboj glomerulární membrány, jsou ve zvýšené míře do moče vylučovány bílkoviny o středně velkých molekulách s Mr mezi 70 000–100 000 (zejména *albumin a transferin*), zatímco bílkoviny s vysokou molekulovou hmotností jsou zadržovány. V moči převažuje albumin, který má nejvyšší negativní náboj. Při těžším poškození glomerulární membrána ztrácí schopnost rozlišovat při filtraci bílkoviny podle velikosti, do moči pronikají kromě bílkovin o střední velikosti i proteiny o Mr nad 100 000 jako je např. *IgG*. Hovoříme o **neselektivní** glomerulární proteinurii. Při glomerulární proteinurii většinou denní ztráty bílkovin přesahují 2 g.

Tubulární proteinurie

je podmíněná sníženou tubulární resorpcí normálně profiltrovaných bílkovin. Je charakterizována zvýšeným vylučováním nízkomolekulárních bílkovin (*mikroproteinů*), které jsou za fyziologických podmínek v tubulech resorbovány (β_2 -mikroglobulin, α_1 -mikroglobulin, volné lehké řetězce imunoglobulinů). Velmi častou příčinou je **poškození tubulů některými nefrotoxicky působícími léky** (cytostatika, některá antibiotika, řada analgetik a protizánětlivých látek) **nebo těžkými kovy** (Hg, Pb, Cd). Tubulární proteinurie může doprovázet některé prerenální proteinurie (paraproteinurii, myoglobinurii), neboť dochází ke kompetitivní relativní nedostatečné tubulární resorpci ostatních volně filtrovatelných proteinů. Ztráty proteinů při tubulární proteinurii nebývají velké, obvykle 0,3–1,5 g/24 hodin.

Smíšená proteinurie je kombinací neselektivní glomerulární proteinurie a tubulární proteinurie. Bývá projevem zániku většiny nefronů.

Postrenální proteinurie

Postrenální proteinurie vzniká **při krvácení, nádorech a zánětech vývodných cest močových**, kdy dochází k přímému průniku plazmy nebo exsudaci bílkovin do moči. Spolehlivě se identifikuje průkazem plazmatických makromolekulárních bílkovin o vysoké molekulové hmotnosti (α_2 -makroglobulin, IgM), které ani při neselektivní proteinurii nepronikají stěnou glomerulární kapiláry.

Charakteristika jednotlivých typů proteinurií		
Typ proteinurie	Charakteristické bílkoviny v moči	Poznámky
RENÁLNÍ		
Glomerulární selektivní	<ul style="list-style-type: none"> albumin transferin (Mr 70 000–100 000)	<ul style="list-style-type: none"> malé zvýšení albuminu v moči, tj. 30–300 mg/den je časnou laboratorní známkou poškození ledvin u diabetes mellitus nebo u hypertenze
Glomerulární neselektivní	<ul style="list-style-type: none"> albumin transferin IgA, IgG (Mr > 70 000)	<ul style="list-style-type: none"> plazmatické mikroproteiny nejsou zvýšené
Tubulární	<ul style="list-style-type: none"> α_1-mikroglobulin β_2-mikroglobulin lehké řetězce Ig (Mr 10 000–70 000)	<ul style="list-style-type: none"> celé spektrum mikroproteinů s Mr 10 000–70 000
Smíšená (tj. glomerulotubulární)	<ul style="list-style-type: none"> albumin transferin IgG, IgA α_1-mikroglobulin β_2-mikroglobulin 	<ul style="list-style-type: none"> všechny typy plazmatických proteinů, kromě největších bílkovin (α_2-makroglobulin, IgM, LDL)
PRERENÁLNÍ	<ul style="list-style-type: none"> lehké řetězce Ig v monomerní nebo dimerní formě → monoklonální gamapatie hemoglobin → intravaskulární hemolýza myoglobin → crush syndrom, rabdomyolýza 	<ul style="list-style-type: none"> přítomnost bílkovin, které se v plazmě normálně nevyskytují
POSTRENÁLNÍ	<ul style="list-style-type: none"> hemoglobin všechny typy plazmatických bílkovin, včetně plazmatických makroproteinů (α_2-makroglobulin, IgM) 	<ul style="list-style-type: none"> průnik plazmy nebo exsudace bílkovin do vývodných cest močových

Funkční proteinurie

Funkční (též *benigní*) proteinurie je zvláštní formou glomerulární proteinurie. Vysvětluje se změnami průtoku krve glomerulem. Setkáváme se s ní po velké fyzické námaze, prochladnutí, při horečkách nebo městnavém srdečním selhání^[24]. Ztráty bílkovin nepřesahují 1 g/den. U některých mladistvých se objevuje proteinurie pouze ve vztyčené poloze, tzv. posturální (ortostatická) proteinurie, která bývá vysvětlována vazokonstrikcí při bederní hyperlordóze a je nejčastější příčinou proteinurie u dětí^[25]. V tomto případě mohou denní ztráty bílkovin přesáhnout i 1 g. Většina těchto proteinurií se spontánně upraví po odeznění vyvolávající příčiny. Také v těhotenství se odpad bílkovin do moči zvyšuje na 200–300 mg/den.

Albuminurie

Močová exkrece albuminu fyziologicky nepřesahuje 30 mg/24 hodin (tj. 20 µg/min nebo asi 15–20 mg/l)^[26]. Běžnými testy na proteinurii (pomocí diagnostických proužků, zkouškou s kyselinou sulfosalicylovou) však lze prokázat bílkovinu, až když koncentrace albuminu přesáhne asi 150 mg/l, tj. když je prakticky 10× zvýšená^[27]. Ztráty menších množství albuminu (30–300 mg/24 hod) jsou prokazatelné imunochemickými metodami.

Ve starší literatuře se pro malé ztráty albuminu, které jsou prokazatelné imunochemicky, ale nikoli běžnými testy na proteinurii, používal termín **mikroalbuminurie**.

Screeningové vyšetření albuminurie je cenné zejména u pacientů trpících diabetem mellitus 2. typu, ale i u ostatních poruch metabolismu glukózy a u hypertoniků. Nález malých množství albuminu v moči je časnou známkou komplikací těchto onemocnění, zejména diabetické či hypertenzní nefropatie a vaskulopatie, a bývá důvodem k zintenzivnění léčby.

Zvýšení albuminurie je velmi citlivým ukazatelem poškození glomerulárního aparátu. Je to dáno tím, že albumin v malém množství prochází glomerulární membránou i fyziologicky. Za normálních okolností je ovšem téměř zcela resorbován v proximálních tubulech. Kapacita tubulární resorpce albuminu je však prakticky vyčerpána už při fyziologické filtraci albuminu; jakékoliv zvýšení koncentrace této bílkoviny v glomerulárním filtrátu proto vede k rychlému nárůstu koncentrace albuminu v definitivní moči^[27].

Albuminurie			
	mg/24 hod	µg/min	mg/mmol kreatininu
norma	< 30	< 20	< 3,5
zvýšená albuminurie	30–300	20–200	3,5–35
detekovatelná proteinurie	> 300	> 200	> 35

Pro monitorování progresu onemocnění a řízení léčby je třeba albuminurii kvantifikovat přesněji. Stanovuje se albumin v **moči sbírané přes noc** a ztráty se přepočítávají na µg albuminu za minutu. Hodnoty menší než 100 µg/min obvykle odpovídají reverzibilnímu poškození, které může být ovlivněno pečlivou kompenzací diabetu a arteriální hypertenze^[26].

Jinou možností je stanovení albuminu v prvním vzorku ranní moči a vypočítání **poměru albumin/kreatinin**. Fyziologicky se tento index pohybuje kolem 2,8–22,8 g albuminu na mol kreatininu^[27].

Aby mělo vyšetření albuminurie výpovědní hodnotu, je třeba vyloučit uroinfekci.

Kvalitativní stanovení bílkoviny v moči

K průkazu patologické proteinurie se používají diagnostické proužky. V některých laboratořích se vyšetření proužkem kombinuje se zkouškou s kyselinou sulfosalicylovou.

Diagnostické proužky

Princip stanovení bílkovin v moči pomocí diagnostických proužků je založen na tzv. **bílkovinné chybě acidobazického indikátoru**, např. tetrabromfenolové modři, etylesteru tetrabromfenolftaleinu či 3',3'',5',5''-tetrachlorfenol-3,4,5,6-tetrabromsulftaleinu. Jako každý acidobazický indikátor tyto látky při určitém pH mění svou barvu (chovají se jako slabé kyseliny, přičemž protonovaná forma má jiné zbarvení než disociovaná forma): při pH nižším než 3,5 jsou žluté, při vyšším pH jsou zelené až modré. V reakční zóně testovacího proužku je kromě indikátoru i pufr, který udržuje pH v rozmezí 3,0 až 3,5, indikátor tedy má žlutou barvu. Jsou-li ve vzorku bílkoviny, naváží se svými aminoskupinami na indikátor. Tím ovšem změní jeho vlastnosti – přechodová oblast se posune směrem ke kyslejšímu pH. Znamená to, že při uvedeném konstatním pH mezi 3,0 až 3,5 bude mít indikátor s navázanou bílkovinou zelenou barvu, jako kdyby byl v alkaličtějším prostředí (proto *bílkovinná chyba indikátoru*). Intenzita zbarvení závisí na koncentraci bílkoviny, kolísá od zelené až po modrou a hodnotí se vizuálně nebo instrumentálně.

U výrazně alkalických močí (pH nad 8) nebo je-li moč velmi koncentrovaná, může test dávat *falešně pozitivní* výsledky (dojde k vyčerpání pufru v reakční zóně). V těchto případech moč okyselíme několika kapkami zředěné kyseliny octové na pH 5–6 a test opakujeme. Falešnou pozitivitu mohou také způsobit vysoké koncentrace některých látek s aminoskupinami (kontaminace odběrové nádoby některými dezinfekčními prostředky), jež se na indikátory váží podobně jako bílkoviny.

Nevýhodou testovacích proužků je jejich rozdílná citlivost vůči jednotlivým bílkovinám. Proužky reagují velmi dobře s albuminem a jeho přítomnost indikují v moči od 0,1 až 0,5 g/l. Podstatně nižší citlivost vykazují vůči globulinům, glykoproteinům a Bence-Jonesově bílkovině. Těmito diagnostickými proužky nelze prokázat zvýšení albuminurie na hodnoty do asi 200 mg/l, resp. denní ztráty albuminu v rozmezí 30 až 300 mg/24 hodin, které provází zejména časnější fáze některých nefropatií. Pro skřínink zvýšení albuminurie je možno použít imunochemických metod, např. speciálních diagnostických proužků založených na imunochromatografickém principu nebo imunoturbidimetrie.

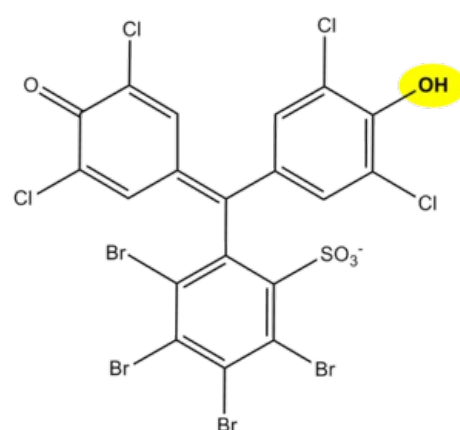
Zkouška s kyselinou sulfosalicylovou

Princip zkoušky spočívá v **denaturaci bílkoviny** kyselinou sulfosalicylovou, která se projevívá vznikem opalescence až zákalu.

Reakce je citlivá, prokáže 0,1–0,2 g/l celkové proteinurie. Rozdíly v detekci jednotlivých bílkovin nejsou tak výrazné jako u diagnostických proužků. Kyselina sulfosalicylová sráží i globuliny.

Falešně pozitivní výsledky dává tato zkouška při vylučování některých rentgen-kontrastních látek, penicilinu, sulfonamidů, kyseliny salicylové a antidiabetik.

Pro hodnocení se používá semikvantitativní stupnice:



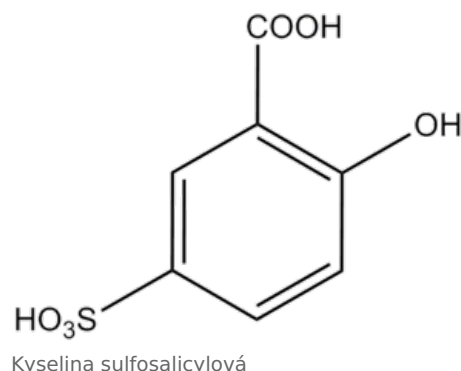
3',3'',5',5''-tetrachlorfenol-3,4,5,6-tetrabromsulftalein; v alkaličtějším prostředí nebo po navázání bílkoviny označená hydroxylová skupina disociuje a barva sloučeniny se změní ze světle žluté na tmavě zelenomodrou

Nález	Hodnocení	Přibližná koncentrace bílkoviny v g/l
Opalescence	stopy	0,05–0,1
Lehký zákal (průhledný, lze číst podložený text)	+	0,1–0,2
Mléčný zákal (nepřůhledný, bez vloček)	++	0,5–1,0
Mléčný zákal s tvorbou vloček	+++	2,0–5,0
Vločkovitá sraženina	++++	≥ 5,0

Kvantitativní stanovení bílkovin v moči

Kvantitativní stanovení bílkoviny v moči je metodicky poměrně obtížné. V klinicko-biochemické praxi se pro stanovení proteinurie používají metody, které můžeme podle principu rozdělit do tří skupin:

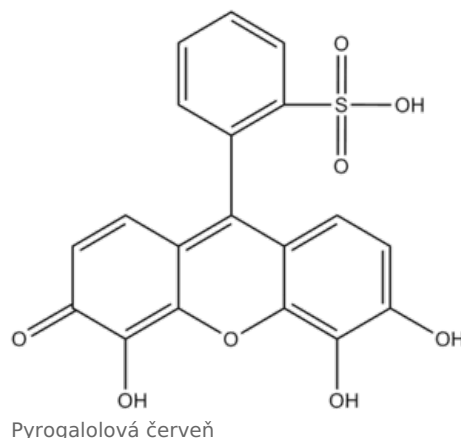
1. metody založené na denaturaci s následným **turbidimetrickým stanovením** intenzity zákalu (např. metody s kyselinou trichloroctovou nebo kyselinou sulfosalicylovou);
2. *kolorimetrické metody* s nebo bez předchozí denaturace bílkovin (např. biuretová reakce);
3. metody založené na **vazbě barviv na bílkoviny** (např. metoda s Coomassie brilliant blue G 250 dle Bradfordové, s pyrogallolovou červení a další).



Dnes se dává přednost technikám, které lze automatizovat – turbidimetrii a barevné reakci s pyrogallolovou červení.

Stanovení proteinurie pomocí pyrogallolové červeně

Pyrogallolová červeň vytváří s molybdenanem růžový komplex s absorpčním maximem při 470 nm. Po navázání bílkoviny na tento komplex v kyselém prostředí dojde k posunu absorpčního maxima do oblasti 600 nm. Absorbance vzniklého komplexu činidla s bílkovinou je v koncentračním rozmezí 0,06–2,0 g/l lineárně závislá na koncentraci bílkoviny ve vyšetřovaném vzorku.



Hodnocení velikosti proteinurie

Hodnocení velikosti proteinurie

< 0,150 g/24 hod	fyzilogická proteinurie
< 1 g/24 hod	malá proteinurie (většinou tubulární)
1,0–3,5 g/24 hod	střední proteinurie
> 3,5 g/24 hod	velká proteinurie
> 10 g/24 hod	proteinurie zpravidla spojená s těžkým nefrotickým syndromem

Typizace proteinurie

Pro stanovení typu proteinurie je nutné znát spektrum proteinů vylučovaných močí. K tomu se používají **elektroforetické metody**. Elektroforetické rozdělení močových bílkovin podle jejich molekulové hmotnosti umožňuje semikvantitativní hodnocení jednotlivých diagnosticky významných proteinů a **klasifikaci proteinurií**. Metodou volby pro analýzu bílkovin v moči se postupně stala elektroforéza v agaróze nebo v polyakrylamidovém gelu.

Aby se bílkoviny rozdělily podle velikosti (a nikoliv podle náboje), lze použít polyakrylamidového gelu, jehož hustota se směrem od katody k anodě zvyšuje (tj. postupně se zmenšují „oka“ či „póry“ v gelu). Malé molekuly v takovém gelu doputují dál než velké molekuly.

Jinou, častěji využívanou možností, je ošetření vzorku detergentem **laurylsíranem sodným** (dodecylsíranem sodným – SDS), který bílkovinu „obklopí“ a svým záporným nábojem nahradí její vlastní náboj. Vzniklé komplexy mají přibližně stejný náboj (přesněji: mají stejnou povrchovou hustotu náboje). Provádí-li se pak elektroforéza v poměrně hustém gelu, dělí se **v závislosti na relativní molekulové hmotnosti**: menší molekuly putují gelem rychleji než velké (technika molekulového síta). Nejrychleji se pohybuje β_2 -mikroglobulin, albumin leží asi uprostřed dělicí dráhy; mezi startem a albuminem jsou lokalizovány bílkoviny o M_r vyšší než 70 000.

Hodnocení elektroforézy bílkovin v moči

U **glomerulárních proteinurií** nalézáme v elektroforeogramu proteiny mezi startem a albuminem včetně (tj. $M_r > 70\,000$).

Bílkoviny pozorované u glomerulárních proteinurií

	Mr		
Albumin	68 000	selektivní	neselektivní
Transferin	77 000	selektivní	neselektivní
IgG	150 000		neselektivní
IgA	160 000		neselektivní
Haptoglobiny	85 000–1 000 000		neselektivní

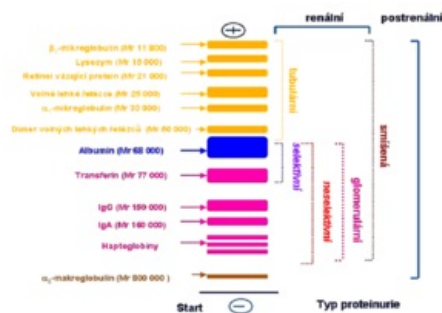
Tubulární proteinurie jsou charakterizované přítomností bílkovin mezi albuminem a anodovým koncem elektroforeogramu (tj. Mr < 70 000).

Bílkoviny pozorované u tubulárních proteinurií

	Mr
β ₂ -mikroglobulin	11 800
Lysozym	15 000
Retinol vázající protein (RBP)	21 000
Volné lehké řetězce Ig	25 000
α ₁ -mikroglobulin	33 000
Dimer volných lehkých řetězců Ig	50 000
Albumin	68 000

Smíšené proteinurie jsou charakterizovány přítomností bílkovin prokazovaných u glomerulárních i tubulárních proteinurií, lokalizovaných katodovým i anodovým směrem od proužku albuminu.

Přítomnost **α₂-makroglobulinu** (Mr = 800 000) s ostatním nálezem podobným smíšené proteinurii svědčí pro **postrenální proteinurii**.



Typizace proteinurie pomocí elektroforézy na agarózovém gelu v přítomnosti SDS

Odkazy

Reference

- BURTIS, Carl A a Edward R ASHWOOD. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2. vydání. Philadelphia : Saunders, 1994. 2326 s. ISBN 0-7216-4472-4.
- BURTIS, Carl A, Edward R ASHWOOD a David E BRUNS. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 4. vydání. St. Luis : Elsevier Saunders, 2006. 2412 s. ISBN 0-7216-0189-8.
- DZURIK, Rastislav, et al. *Štandardná klinickobiochemická diagnostika*. 1. vydání. Martin : Osveta, 1990. 443 s.
- HOMOLKA, Jiří. *Klinická biochemie pro praxi : stručná patobiochemie, indikace vyšetření a jejich interpretace*. 1. vydání. Praha : Avicenum, 1982. 401 s.
- KOLEKTIV AUTORŮ,. *Lékařská chemie a biochemie : celost. vysokošk. učebnice pro stud. lékařských fakult v ČSFR, stud. obor všeobecné lékařství, dětské lékařství a hygiena. [Díl 2], Praktikum*. 1. vydání. Praha, Bratislava : Avicenum, Osveta, 1991. 237 s. ISBN 80-201-0114-4.
- KRAML, J, et al. *Návody k praktickým cvičením z lékařské chemie a biochemie*. přepracované vydání. Praha : Karolinum, 1991. ISBN 80-7066-453-3.
- MASOPUST, J. *Klinická biochemie. Požadování a hodnocení biochemických vyšetření I. a II. část*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-650-3.
- MURRAY, R. K, et al. *Harperova biochemie*. 2. vydání. Jinočany : H+H, 1998. ISBN 80-85787-38-5.
- RACEK, J, et al. *Klinická biochemie*. 2. vydání. Praha : Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9.
- SCHNEIDERKA, P, et al. *Stanovení analytů v klinické biochemii 1. část*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-761-5.
- SCHNEIDERKA, P, et al. *Vybrané kapitoly z klinické biochemie*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 1998. 119 s. ISBN 80-7184-505-1.
- ŠVÍGLEROVÁ, Jitka. *Albumin* [online]. Poslední revize 2009-02-18, [cit. 2010-10]. <<https://web.archive.org/web/20160416224413/http://wiki.lfp-studium.cz/index.php/Albumin>>.
- RACEK, Jaroslav, et al. *Klinická biochemie*. 2. vydání. Praha : Galén, 2006. 329 s. s. 71. ISBN 80-7262-324-9.
- ZIMA, Tomáš, et al. *Laboratorní diagnostika*. 2. vydání. Praha : Galén a Karolinum, 2007. 906 s. ISBN 978-80-246-1423-6.
- ZIMA, Tomáš, et al. *Normální hodnoty* [online]. Velký lékařský slovník online, [cit. 2020-02-13]. <<http://lekarske.slovniky.cz/normalni-hodnoty>>.
- KESSLER, Siegfried. *Laboratorní dagnostika*. 1. vydání. Praha : Scientia medica, 1993. 252 s. Memorix; s. 52. ISBN 80-85526-12-3.
- GREGOR, Pavel a Petr WIDIMSKÝ, et al. *Kardiologie*. 2. vydání. Praha : Galén, 1999. 595 s. s. 168. ISBN 80-7262-021-5.
- KLENER, Pavel, et al. *Vnitřní lékařství*. 3. vydání. Praha : Galén a Karolinum, 2006. 1158 s. ISBN 80-7262-430-X.
- LIU, H. H., J. B. GUO a Y. GENG. Procalcitonin: present and future. *Irish Journal of Medical Science* (1971 -). 2015, roč. 3, vol. 184, s. 597-605, ISSN 0021-1265. DOI: 10.1007/s11845-015-1327-0 (<http://dx.doi.org/10.1007/s11845-015-1327-0>).

20. ÚKBLD 1. LF a VFN Praha. *Procalcitonin : vývoj názorů na interpretaci* [online]. ©2009. [cit. 2011-06-30]. <<http://www.cskb.cz/res/file/akce/sjezdy/2009-Pha/ppt/B1/Kazda.pdf>>.
21. STRICKLAND, RD, ML FREEMAN a FT GURULE. Copper binding by proteins in alkaline solution. *Analytical chemistry* [online]. 1961, vol. 33, no. 4, s. 545-552, dostupné také z <<https://pubs.acs.org/action/cookieAbsent>>. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac60172a019 (<http://dx.doi.org/10.1021%2Fac60172a019>).
22. DOUMAS, B T. Standards for total serum protein assays--a collaborative study. *Clin Chem* [online]. 1975, vol. 21, no. 8, s. 1159-66, dostupné také z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1169135>>. ISSN 0009-9147.
23. DOUMAS, B T, D D BAYSE a R J CARTER, et al. A candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and validation. *Clin Chem* [online]. 1981, vol. 27, no. 10, s. 1642-50, dostupné také z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6169466>>. ISSN 0009-9147.
24. BURTIS, Carl A, Edward R ASHWOOD a David E BRUNS. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 4. vydání. St. Louis, Mo : Elsevier Saunders, 2006. 2412 s. s. 576. ISBN 978-0-7216-0189-2.
25. MUNTAU, Ania Carolina. *Pediatric*. 4. vydání. Praha : Grada, 2009. s. 420. ISBN 978-80-247-2525-3.
26. ZIMA, Tomáš, et al. *Laboratorní diagnostika*. 2. vydání. Praha : Galén a Karolinum, 2007. 906 s. s. 106-7, 121-2. ISBN 978-80-246-1423-6.
27. RACEK, Jaroslav, et al. *Klinická biochemie*. 2. vydání. Praha : Galén, 2006. 329 s. s. 170. ISBN 80-7262-324-9.
28. KRAML, Jiří, et al. *Návody k praktickým cvičením z lékařské chemie a biochemie*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 1991. 312 s. s. 243. ISBN 80-7066-453-3.