Лабораторная диагностика нарушений обмена белков

- Антуан Франсуа де Фуркруа

основоположник изучения белков

(XVIII век)

Белки были выделены в отдельный

класс биологических молекул.

Было отмечено свойство белков коагулировать (денатурировать) под воздействием нагревания или кислот. В то время были исследованы такие белки, как альбумин («яичный белок»), фибрин (белок из крови) и глютен из зерна пшеницы.

Якоб Берцелиус ввел термин протеин (от греческого proteus в первом ряду). Он полагал, что существует только один протеин во всех видах живой материи, включая растения и животных.

1950 г. идентифицировано 10 белков плазмы
1980 г. описано 100 белков плазмы человека
2004 г. охарактеризовано 1000 белков
В настоящее время около 40 используются для диагностики

Истинно плазменные белки (ИПБ):

- Синтезируются в печени, РЭС, лимфоидной ткани;
- сразу попадают в кровь;
- наибольшая концентрация в плазме;
- главная функция в плазме;
- во время периода полураспада находятся в крови.

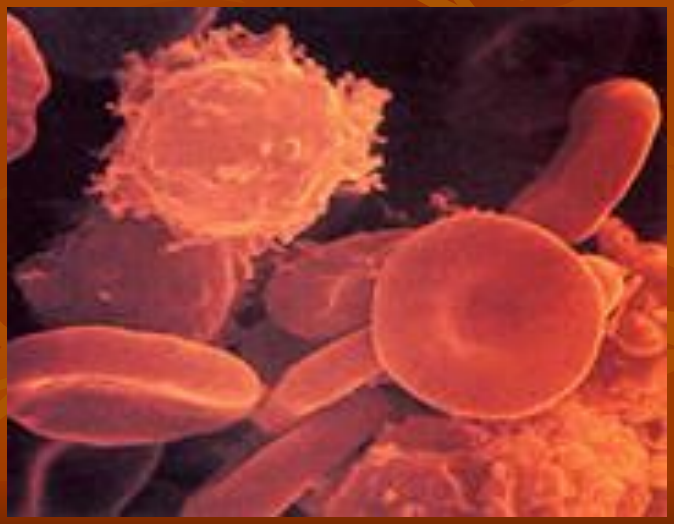
Кроме ИПБ в крви присутствую белки общего метаболизма: компоненты свертывания крови, ферменты, гормоны и др.

Большинство белков плазмы – гликопротеиды.

Основные функции белков

(для многих белков их функции ещё не установлены)

- Поддержание коллоидно-осмотического давления
- Транспорт липидов, продуктов метаболизма, гормонов, лекарств
- Иммуноглобулины – часть системы иммунитета
- Ферменты и ингибиторы ферментов
- Часть системы гемостаза



Метаболизм белков

- Большинство белков плазмы синтезируются в гепатоцитах (что влияет?)
- Катаболизм многих белков плазмы происходит в эндотелиальных клетках капилляров и системе функциональных фагоцитов (моноцитов и макрофагов (пиноцитозом). Белки с мал. мол. массой проходят в первичную мочу и могут реабсорбироваться эпит. клетками проксимальных канальцев и катаболизируют до аминокислот.

Нарушения обмена белков включают:

- Нарушения количественного поступления белка в организм (белковый перекорм и бел.-энергитическая недостаточность).
- Нарушения качественного состава белков (дефицит или избыток отдельных аминокислот)
- Нарушения переваривания белков в ЖКТ.
- Нарушение чрезмембранного транспорта аминокислот – аминоацидопатии
- Нарушения промежуточного обмена аминокислот (расстройства дезаминирования, переаминирования, декарбоксилирования)
- Нарушения композиции белков плазмы (гипопротеинемии, диспротеинемии)

Нарушения количественного соотношения белков

- Гиперпротеинемия (в основном за счет дегидратации или глобулинов, возраст, положение стоя, физические нагрузки дают увеличение общ. белка на 4-8г/л)
- Гипопротеинемия (в основном за счет альбумина, при снижении общ. Белка до 40 г/л развиваются отеки)
- Парапротеинемия - накопление патологических форм белков

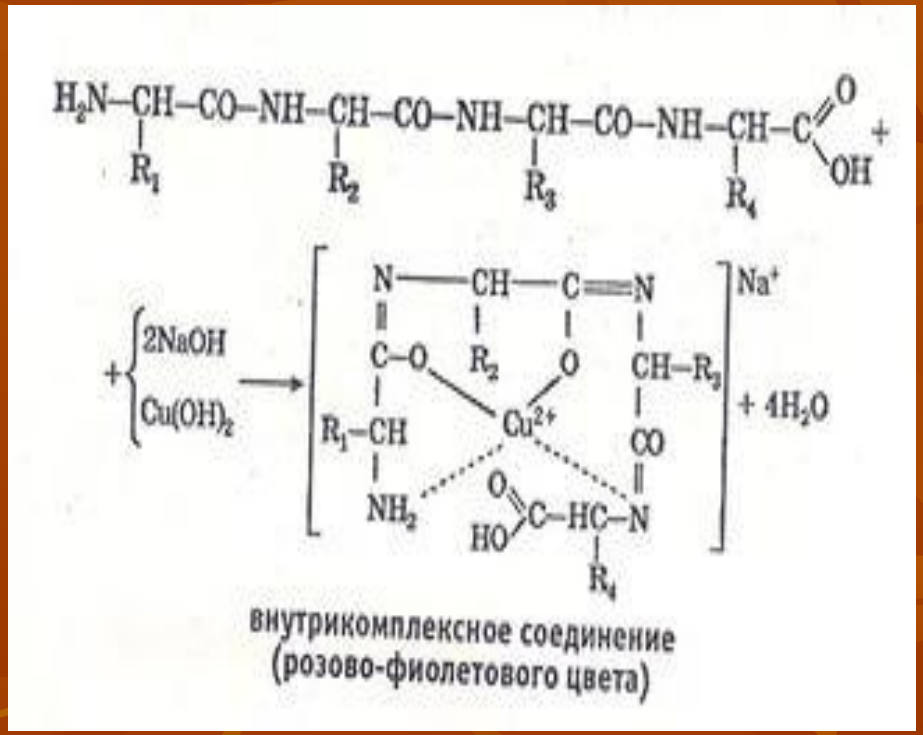
Методы исследования белков

- Азотометрические: азот, содержащийся в составе белков, окисляют до NH4+ , и его количество определяют титрованием точным раствором HCL) метод Кьельдаля ;
- гравиметрические (весовые);
- «преципитационные»;
- спектрофотометрические;
- рефрактометрические;
- колориметрические;
- электрофорез

Определение общего белка не позволяет провести органотопическую диагностику, однако широко используется при скрининге и проф. осмотрах

Распространенным в КДЛ методом является:

- «Биуретовый» фотокалориметрический метод



Турбидиметрическое определение белков в моче (с раствором сульфосалициловой кислоты)

Метод исследования светопоглощения (мутных) растворов по интенсивности прошедшего через них светового потока

В сыв. крови или водном растворе с pH>7 мол. белка имеют компактную глобулярную форму с размерами меньше длины волны видимого света и практически его не рассеивают.

Недостатки

- Много ложноотрицательных результатов (На реакцию денатурации и последующей преципитации белков сильное влияние оказывает состав мочи: pH, концентрация солей. Для некоторых проб мочи мутность может не образовываться даже при присутствии в ней белка с концентраций более 1 г/л.)
- К ложноположительным результатам (могут приводить лекарственные метаболиты в составе мочи)
- Низкая воспроизводимость (влияние характера перемешивания на образуемые прицепитаты) При больших концентрациях белка в моче преципитаты могут выпадать в осадок крупными хлопьями.

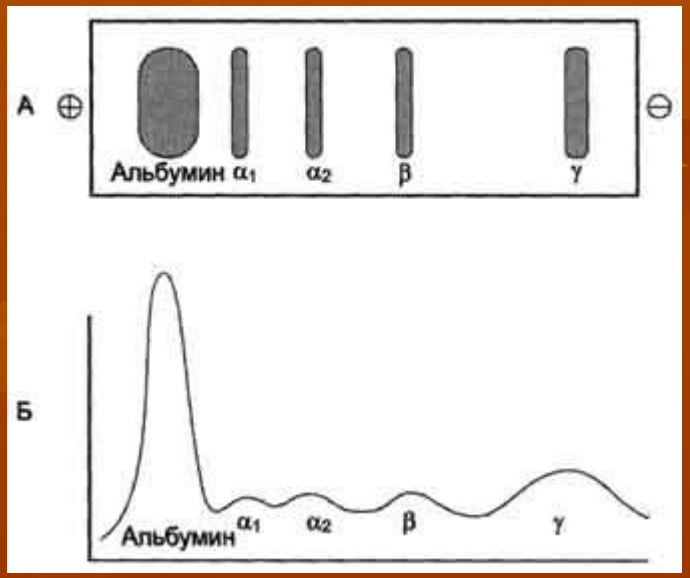
Нефелометрия

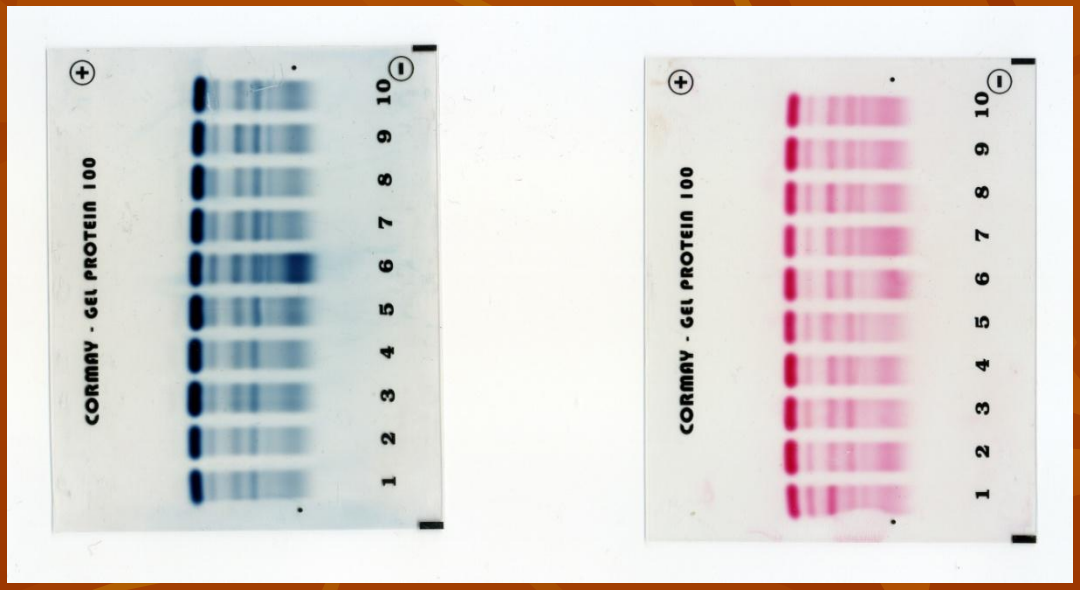
Метод исследования светорассеивающих (мутных) растворов по измерению рассеянного света

греч. – Nephele – облако

Метод нефелометрии более чувствителен, чем турбидиметрии для определения специфических белков в плазме и сыворотке крови, спинномозговой жидкости, моче

Электрофорез белков





Требования преаналитики при анализе белков у пациента.

Помните,что

1.Реф. Границы у муж.>жен, примерно на 1г.

2. С возрастом содержание общ. белка снижается. (т.к. преобладают процессы катаболизма)

3 В положении лёжа об.белок > на 4-8г/л , чем стоя

4. Через неск ч. физ.нагрузки об.белок увелич. на 4-8 г/л (высокая физ нагрузка незнач. увеличивает содержание об. белка)

5. Об.белок ниже 40г/л сопровождается оттёками.

6 У беременных – снижение об.бел до 66-61г/л.

Индивидуальные белки.

Альбумин

- 55-60% всего белка сыворотки крови
- Гетерогенен из-за агрегированных с ним молекул
- Высокоорганизованный белок, не содержащий углеводных компонентов
- Молекулярная масса около 67 кDa
- В день синтезируется 0,9-1,2 г альбумина

Функции альбумина

- Транспортная (гормоны щитовидной железы, Са, билирубин, жирные кислоты, лекарственные препараты)
- Поддержание коллоидно-осмотического давления (при снижении концентрации голодные отеки)
- Обеспечение клеток аминокислотами

Клинические показания для определения альбумина

- Лабораторный контроль больных с острой патологией печен, почек
- Мониторинг пациентов после длительных травматических операций, после кровопотери
- Коррекция лабораторных показателей общего кальция

Референтные значения содержания альбумина

35-52 г/л

Методы измерения концентрации

- Турбидиметрия
- Нефелометрия
- Фотометрия (бромкрезиловый зеленый)

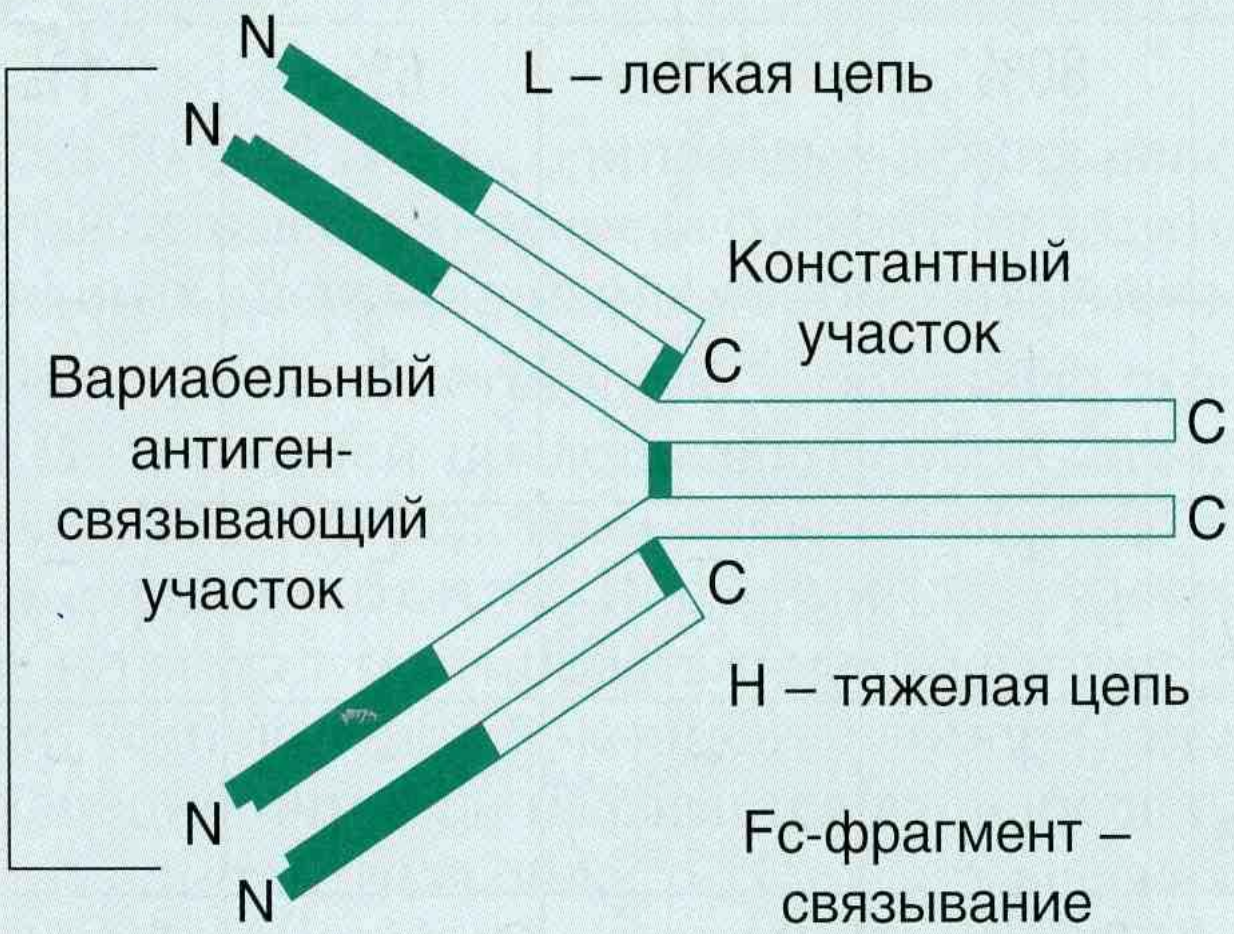
Клинико-диагностическое значение

- ***Анальбуминемия***
- ***Гипоальбуминемия*** (нефротический синдром, гастроэнтерит, ожоговая болезнь, цирроз, жировая дистрофия печени, тяжелые инфекции, панкреатит, оперативное вмешательство, кровопотеря, шок, недоедание). Альбумин – неспецифический индикатор любой патологии.
- ***Гиперальбуминемия*** (артефакт, чрезмерная инфузия, дегидратация)
- Микроальбуминурия
- Нарушение ГЭБ – альбумин в ликворе

Белки, участвующие в иммунной защите

Иммуноглобулины

- Группа γ-глобулинов со сходной структурой, отличающихся по иммунологическим, биологическим и физическим свойствам.
- Секретируются В-лимфоцитами
- Молекулярная масса 150-1000 kDa


N
N
L – легкая цепь
Константный участок
C
C
C
C
Вариабельный антиген-связывающий участок
H – тяжелая цепь
N
N
Fc-фрагмент – связывание с рецептором
Fab-фрагмент – связывание с антигеном

Ig M

- Самые крупные антитела
- Синтез начинается еще до рождения
- Первичный ответ на АГ
- К IgM принадлежат АТ: антимикробные, холодовые аутоиммунные, ревматоидные факторы
- Не фильтруются почками

Ig G

- Основной класс антител сыворотки
- Вторичные АТ, участвуют в формировании активного иммунитета и иммунологической памяти
- Связываются с антигенами на клеточной поверхности, представляя эти клетки для фагоцитоза
- Благодаря низкой молекулярной массе проникают через плацентарный барьер

Ig A сывороточные

- 10-15% от всех Ig сыворотки
- Образуют комплексы с альбумином и ферментами, формируя макромолекулярные комплексы
- Детально функция неизвестна

Ig A секреторные

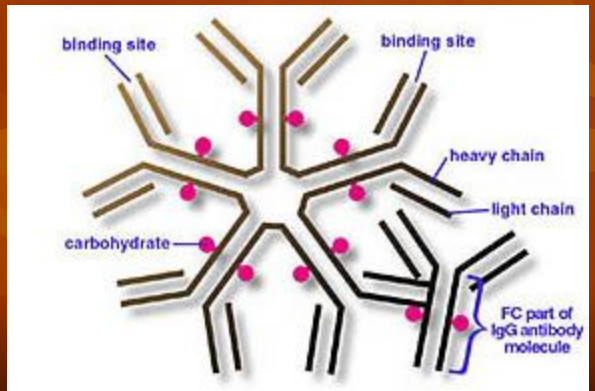
- Содержатся в продуктах внешней секреции (слезы, слюна, пот, слизь бронхов, кишечника, влагалища)
- Локальный иммунный ответ (ЖКТ – пищевые АГ и бактерии кишечника), предупреждение адгезии бактерий к стенке слизистого слоя
- IgA содержатся в грудном молоке и защищают новорожденного от кишечной инфекции

Ig E

- Содержание в сыворотке мало. Обнаруживаются на мембранах базофилов и тучных клеток, в слизи носоглотки и бронхов
- Играют существенное значение в антипаразитарном иммунитете, развитии аллергических реакций
- Клетка-носитель IgE секретирует гистамин, вызывая аллергическую реакцию

Ревматоидный фактор

- РФ – аутоантитела (обычно IgM) к измененным γ-глобулинам
- Референтные значения < 50 МЕ/мл
- При ревматоидном артрите положительны в 70-90%
- Тест положителен при СКВ, саркоидозе, хронических заболеваниях печени, легких, паразитарных инфекциях, бактериальных инфекциях, иногда у здоровых людей
- Методы определения – ИФА,
- латексная агглютинация



Гипогаммаглобулинемия

- Физиологическая врожденная (первые месяцы после рождения активны материнские Ig-G, в 3 месяца-min)
- Патологическая врожденная (первичный иммунодефицит). Встречается редко
- Патологическая приобретенная (злокачественные лимфомы, лимфолейкозы, лечение цитостатиками, стероидными гормонами, ионизирующая радиация, обширные ожоги, заболевания почек, энтеропатии, недоедание, интоксикации, СПИД)

При наличии лаб. и клинических данных выставляется диагноз ВИД.

Гипергаммаглобулинемия

- ***IgG*** – хронические инфекции, аутоиммунные заболевания, множественная миелома, коллагенозы
- ***IgA*** – цирроз, множественная миелома, гепатит (поздняя стадия), болезни дыхательных путей
- ***IgM*** – паразитарные инвазии, нефротический синдром, макроглобулинемия Вальденстрема, гепатит (ранняя стадия), героиновая наркомания

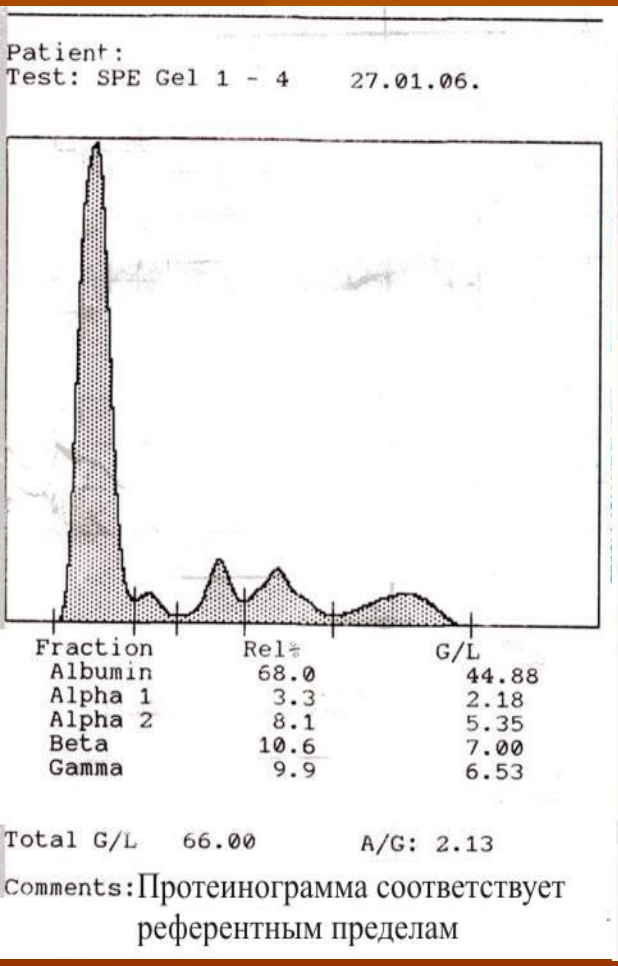
Методы определения иммуноглобулинов

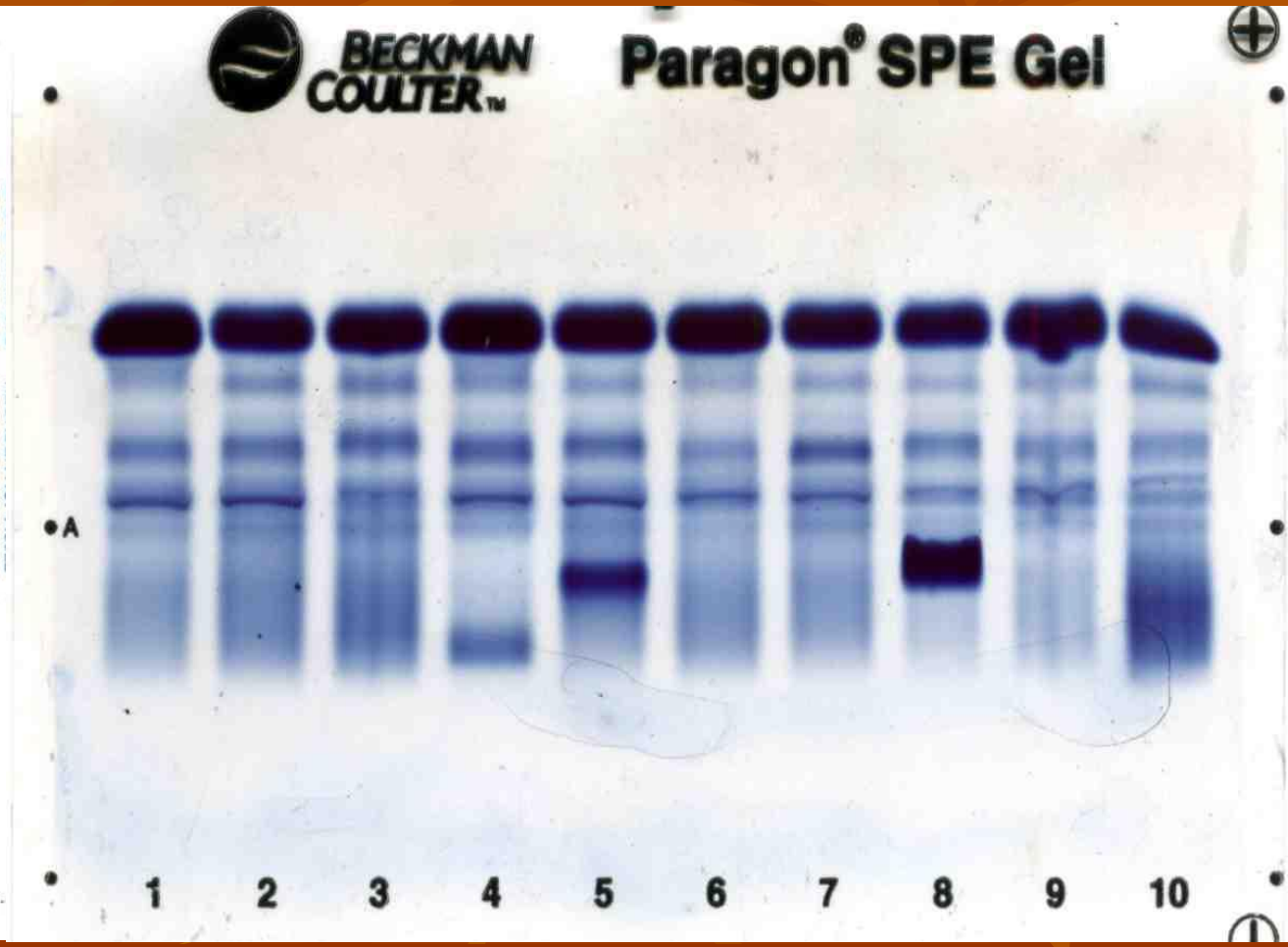
- ИФА
- Иммунотурбидиметрия
- Нефелометрия
- Электрофорез с иммунофиксацией
- Белок Бенс-Джонса

Парапротеины (моноклональные иммуноглобулины)

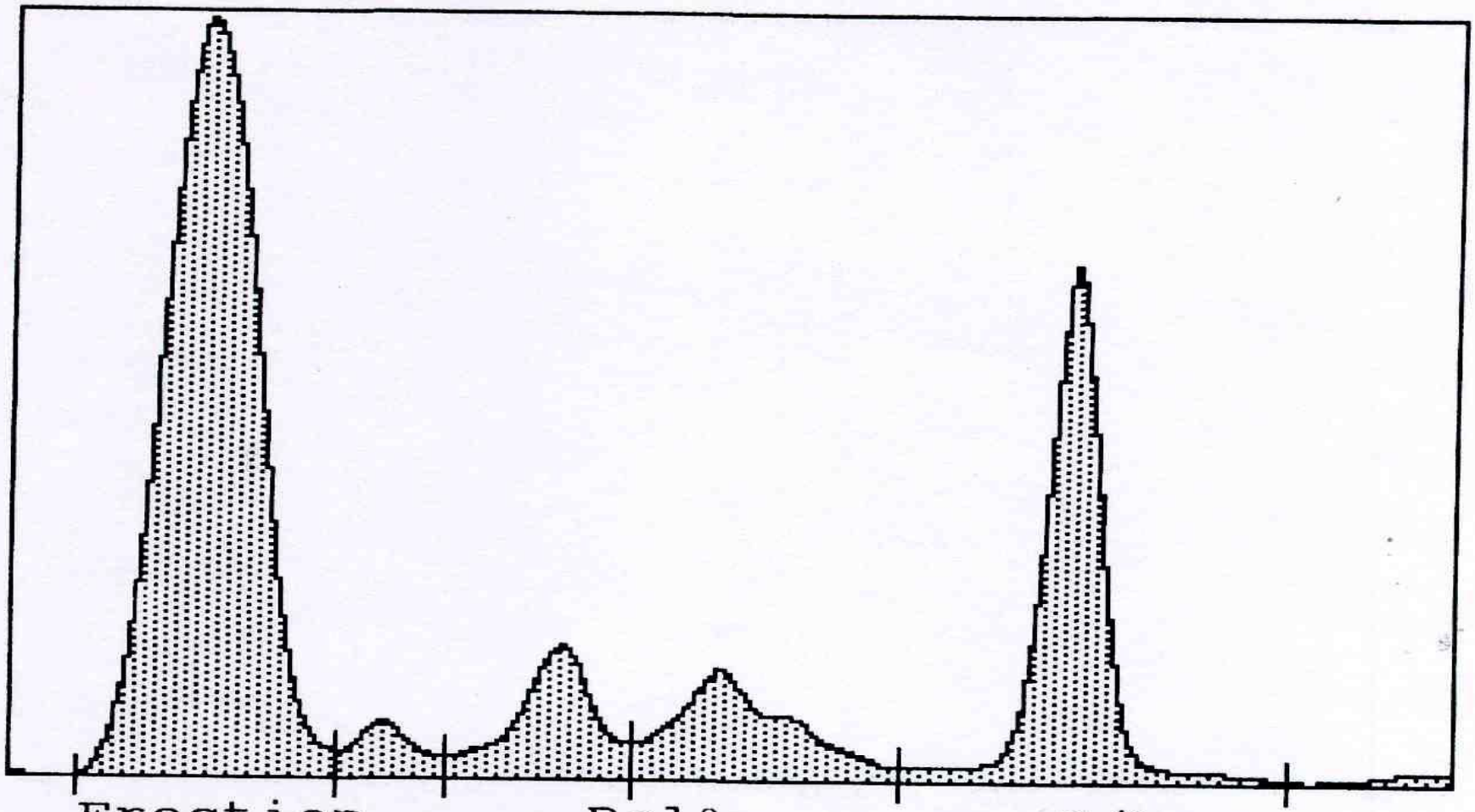
- Иммуноглобулины или их фрагменты, вырабатываемые плазматическими клетками, образующимися из одной специфической клетки линии В-лимфоцитов (моноклон) в афизиологическом количестве.
- Не способны выполнять функцию АТ
- Структурно однородны
- При электрофорезе определяются по наличию М-градиента

Электрофорез белков на агарозной пленке (10 проб.) Paragon



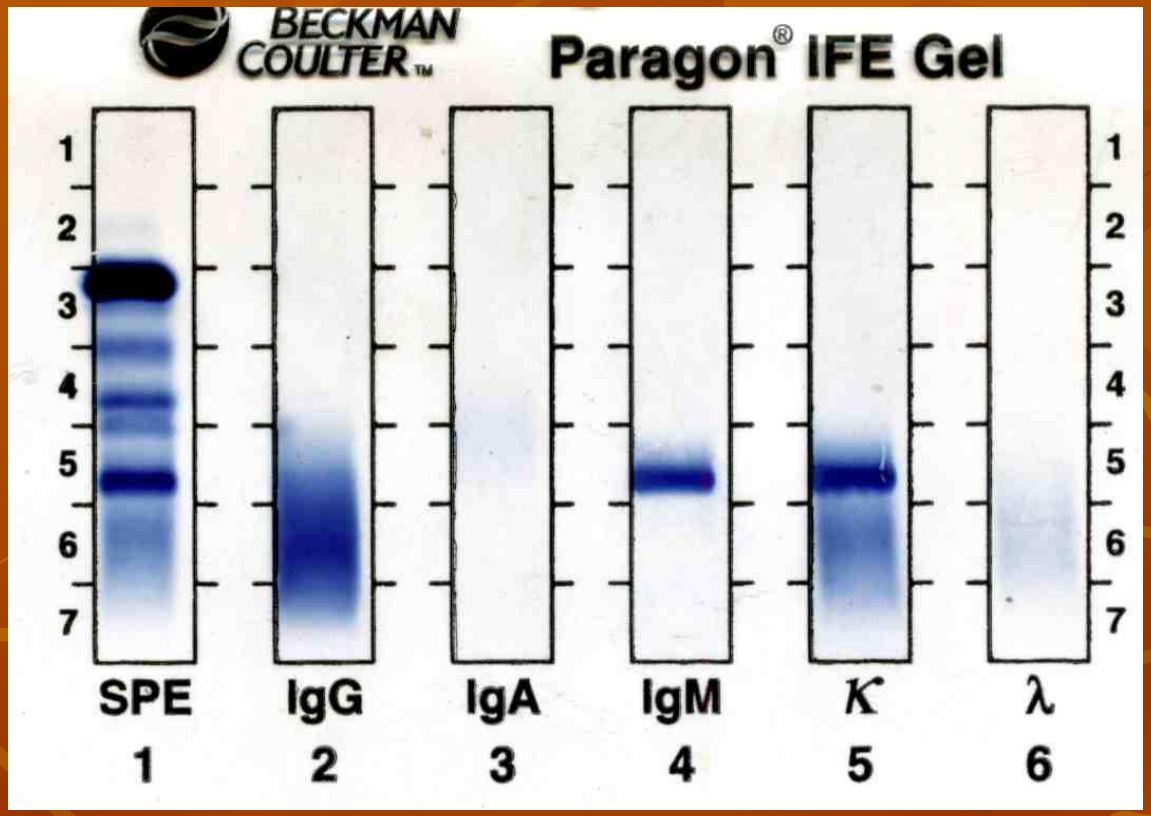


Patient: 451930
Test: SPE Gel 1 - 1 30/08/07/



Fraction	Rel%		G/L
Albumin	55.0	-	42.90
Alpha 1	2.8		2.18
Alpha 2	8.2		6.40
Beta	10.1		7.88
Gamma	23.9	+++	18.64

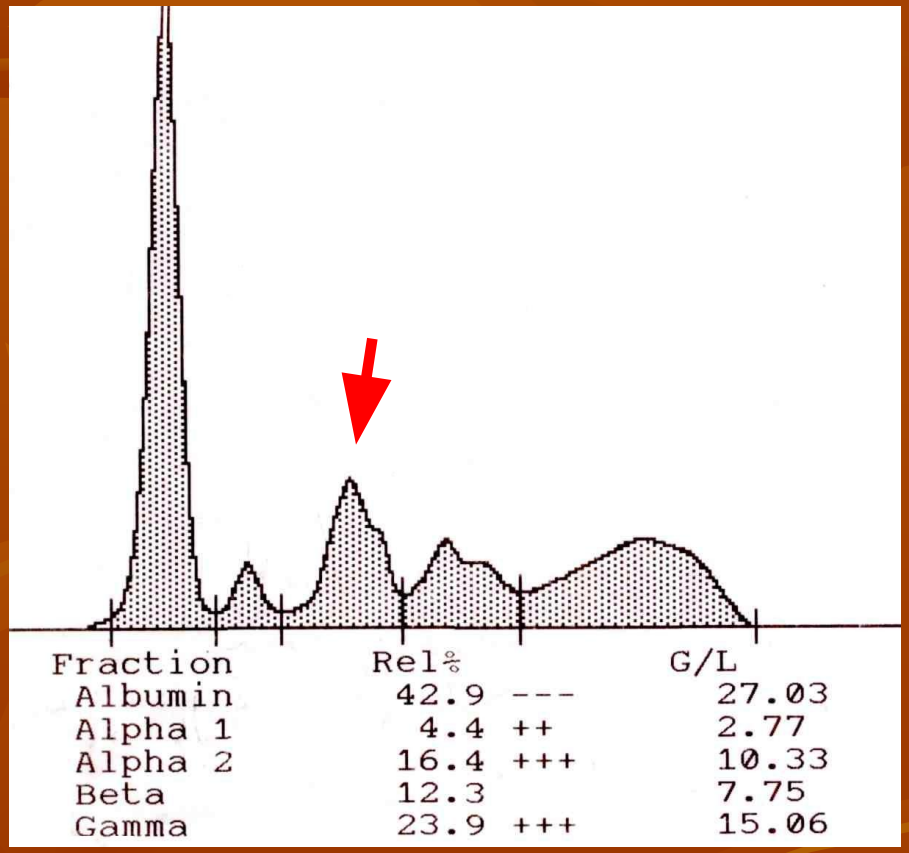
Электроиммунофореграмма больной Ч. с диагнозом: макроглобулинемия Вальденстрема



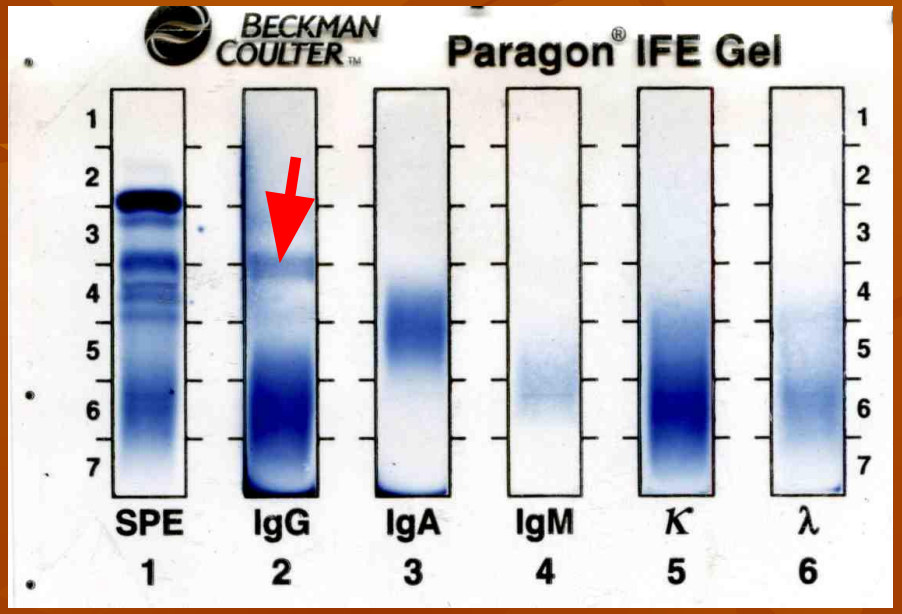
Заключение: методом ЭИФ с помощью моноспецифических антител регистрируется моноклональный компонент JgM-k-типа

Сравнение ЭФБК с сомнительным пиком больного К. и его подтверждение на ЭИФ

ЭФБК



ЭИФ



Моноклональный компонент JgG-типа

Типы иммуноглобулинов, расположенные в порядке ухудшения прогноза ММ

Анализ результатов проведенных исследований методом ЭИФ в ЛБИ ОКДЦ (за 1,5 года)

Всего проведено исследований ЭИФ 62:

С целью типирования М-градиента, выявленного методом ЭФБК 21

Из них:
IgG-K – 7
IgG-λ – 5
IgG-K, IgG-λ -1
IgM-K – 3
IgA-K – 1
IgA- λ– 2
СЛЦ- λ – 1
СЛЦ- λ, СЛЦ-К -1

С целью идентификации сомнительного пика на ЭФБК 22

- Не подтвержден 18
- Подтвержден 4 (22%): IgG – 2, IgG-λ – 1, СЛЦ - 1

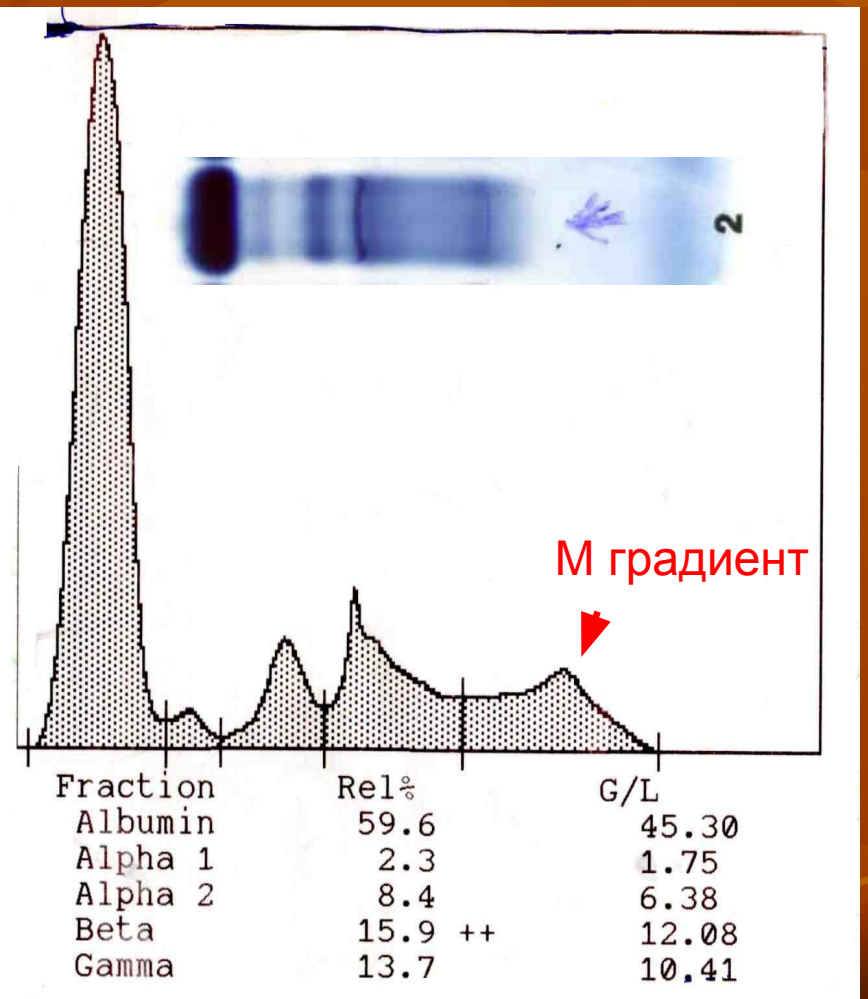
ЭФБК – не обнаружен М-градиент. С целью продолжения диагностического поиска 19

- Не подтвержден 13
- Выявлен М-градиент 6 (32%): IgG – 2, СЛЦ-К - 3, СЛЦ -λ – 1

ЭФБК и ЭИФ пациентки О с диагнозом: множественная миелома до лечения и после препаратом Велкейд

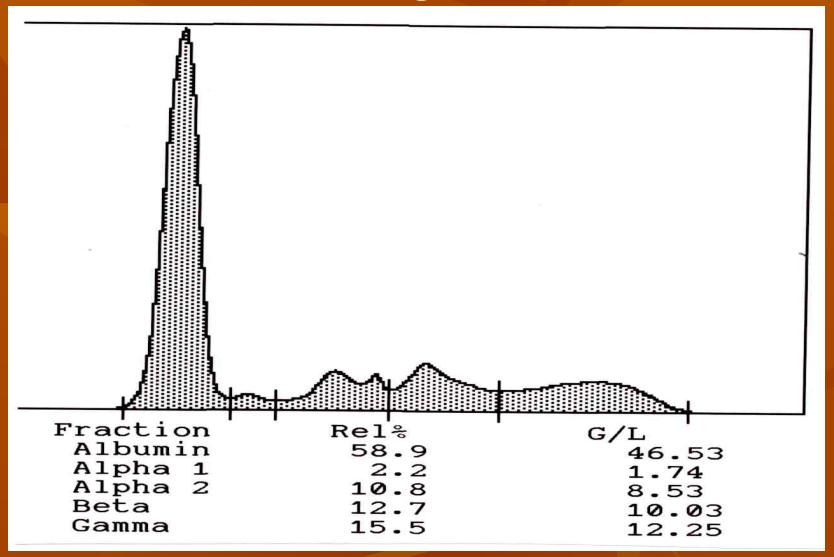
До

ЭФБК

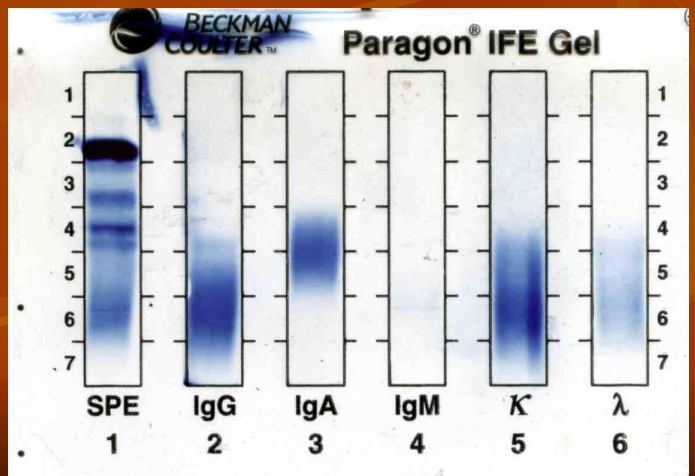


После

ЭФБК



ЭИФ



Система для проведения электрофореза в гелях агарозы Hydrasys

Белки острой фазы воспаления

Повреждение ткани любого происхождения вызывает биологический ответ на трех различных уровнях:

- Нервно-рефлекторная реакция с целью вывода организма из опасной зоны.
- Активизация системы свертывания для предотвращения потери крови.
- Начинается сложная системная реакция, активизирующая неспецифические механизмы защиты и вызывающая местные и общие смптомы, включая жар, припухлость, красноту, лихорадку, боль – это «реакция острой фазы воспаления»

- Белки, концентрации которых претерпевают характерные изменения в течении такой фазы, называют «белками острой фазы».

Белые клетки крови и их секреторные продукты – инициаторы этого процесса.

События острой фазы непосредственно или косвенно инициируются цитокинами типа интерлейкина 1 (IL1) или IL-6, выделяемых преимущественно макрофагами, фибробластами и эпителиальными клетками.

Особенности острофазных белков

- Около 30 белков плазмы крови
- В норме концентрация их мала
- Высокая корреляция концентрации с активностью заболевания
- Неспецифичность в отношении этиологии заболевания
- Разная биологическая функция
- Участвуют в реакциях, направленных на удаление повреждающего фактора, локализацию очага повреждения, восстановление нарушенной структуры и функции
- Ингибируют протеолитические ферменты, предотвращая вторичное повреждение ткани

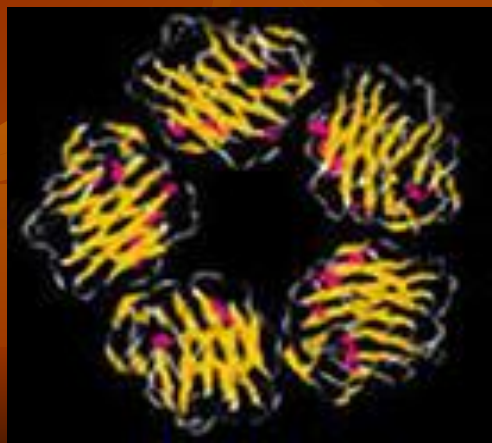
Острые инфекции
Острые некрозы
Острый ревматизм
Экссудативный туберкулез
Нефроз
Карцинома
Застойная желтуха
Гепатит
Нефроз
β-Миеломы
Хронические воспаления
Хронический полиартрит
Болезнь Бека—Шауманна
Ретикулезы, циррозы печени
γ-Миеломы
Альбумин α1- α2- β- γ-Глобулин
Повышение
Характерный признак
Понижение
Недостаток белков
Кахексия, нефроз
Воспаления
Инфекции, цирроз печени
Редко анальбуминемия
Приобретенные
Конституциональные
γ- Гипоглобулинемии

С-реактивный белок

- α_2- глобулин
- Ранний ответ на освобождение провоспалительных цитокинов (IL-1, Il-6) и сам является провоспалительным тригерным механизмом (стимулирует моноциты к вывсвобождению IL-1, Il-6, TNF- альфа)
- Удаляет эндогенные вещества, образующиеся в результате деструкции клеток
- Способен активировать тромбоциты

С-реактивный белок

- Получил название благодаря способности к преципитации пневмококкового полисахарида С в присутствие ионов Са.
- Присоединяется к мембранам микроорганизмов и активирует каскад комплемента по классическому пути.



Оценка активности воспалительного процесса

- СРБ от 10 до 50 мг/мл:
- местные бактериальные инфекции
- инфаркт миокарда
- вирусная инфекция
- саркоидоз
- ревматоидный артрит
- патология соединительной ткани

- СРБ более 50 мг/л
- тяжелые бактериальные инфекции (до 800 мг/л)
- активная фаза ревматизма
- системный васкулит
- болезнь Крона
- тромбоз глубоких вен
- о. панкреатит

Преимущества теста на СРБ

- Быстрое увеличение концентрации (6-12 ч-2 суток)
- Многократное возрастание уровня (в сотни раз)
- Быстрое снижение при эффективном лечении
- Простота и доступность теста

Методы определения

- Латексная агглютинация
- Иммунотурбидиметрия
- Нефелометрия

hsСРБ (high sensitivity) связь концентрации с риском ССЗ

< 1	Минимальный
1,1 – 1,9	Низкий
2,0 – 2,9	Умеренный
>3	Высокий

Базовый уровень СРБ – концентрация СРБ, которая стабильно выявляется у практически здоровых лиц или у пациентов при отсутствии острого воспалительного процесса или вне обострения заболевания

Атеросклероз – длительное, вяло текущее хроническое воспаление в интиме сосуда.

Роль hsCРБ в патогенезе атеросклероза ?

1. Индикатор воспаления?
2. Непосредственный участник развития патологических изменений?

Белки, связывающие ионы металлов

Таблица 2.5. **Металлопротеины**

Металл	Тип биомолекулы	Лиганд	Биологическая функция
Fe^{2+}, Fe^{3+}	Гемоглобин, миоглобин, каталаза, пероксидаза, металлофлавопротеины, цитохромы, железосерные белки, трансферрин, ферритин, нитрогеназа	Гемопорфирины, сера, изоаллоксазин	Транспорт O_2, CO_2, транспорт электронов (окислительно-восстановительные реакции), транспорт и депонирование железа, восстановление N_2 в NH_3
Cu^{+}, Cu^{2+}	Цитохромоксидаза, церулоплазмин и др.	Азотистые основания	Окисление, депонирование и транспорт меди
Co^{2+}	Витамин B_{12} и его коферментные формы	Коррин, бензимидазол, CH_3-группа	Перенос CH_3-группы, синтез метионина
Mn^{2+}	Аргиназа, декарбоксилазы аминокислот, фосфотрансферазы и др.	Фосфат, имидазол	Декарбоксилирование, перенос фосфатных групп
Mo^{2+}	Нитрогеназа, нитратредуктаза, ксантиноксидаза	Не идентифицирован	Связывание и активирование N_2—>NH_3, окисление пуринов
Zn^{2+}, Mg^{2+} Ca^{2+}	Карбоангидраза, пептидазы, фосфатазы, НАД-ферменты, инсулин	Имидазол, НАД	Связывание субстратов, разрыв пептидной связи
K^{+}, Na^{+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}	Фосфоенолпируваткарбоксикиназы, АТФазы		Транспорт и освобождение фосфатных групп

Трансферрин

- Основной переносчик железа к клеткам
- Синтезируется в печени, в лимфоидной ткани, молочной железе, яичках и яичниках

- Референтные значения: 2 - 4 г/л

Диагностическое значение трансферрина

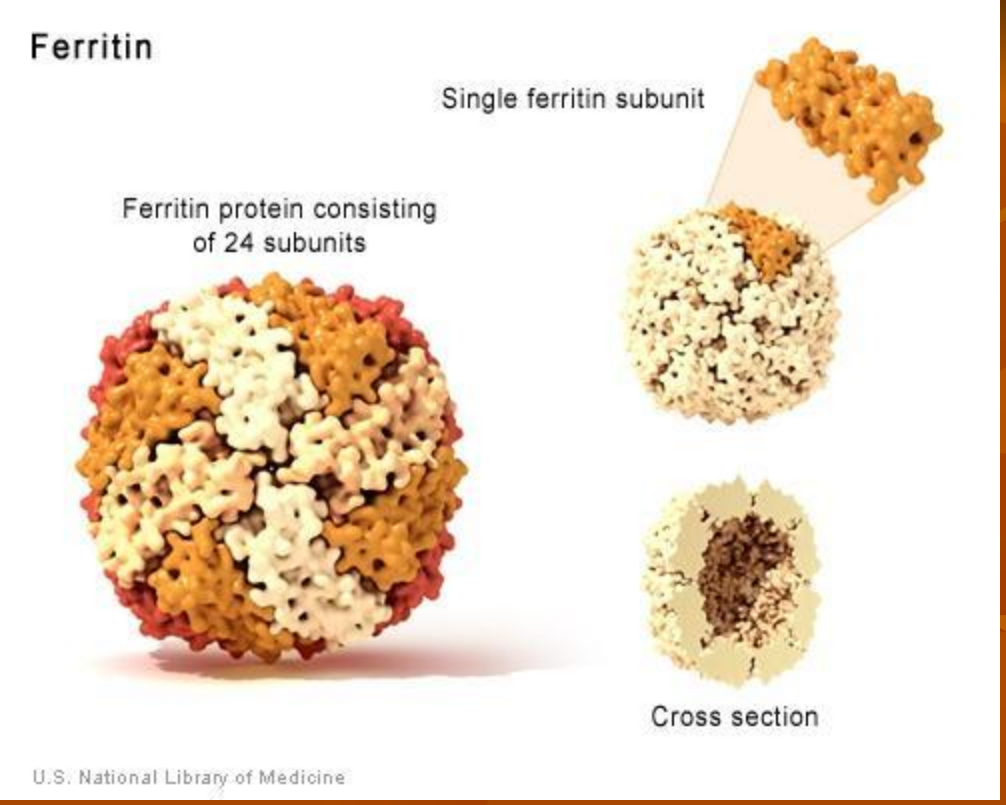
- Выявление дефицита железа
- Выявление перегрузки организма железом
- Дифференциальная диагностика и мониторинг лечения анемий
- Выявление доступного железа при назначении эритропоэтина

Изменение концентрации трансферрина

- Повышение – скрытый дефицит железа, высокие концентрации эстрогенов или кортикостероидов
- Уменьшение – реакция острой фазы, неэффективный эритропоэз, потеря белка (нефропатия, энтеропатия), нарушение синтеза белка

Насыщенность трансферрина железом

- < 15% у взрослых, <10% у детей, <8% у пожилых людей указывает на ЖДА
- > 55% указывает на избыток железа в организме



Ферритин

Обеспечивает депонирование железа в организме

Используется для диагностики и мониторинга дефицита или избытка железа в организме

Концентрация повышается в острой фазе воспаления

Ферритин

- Обеспечивает депонирование железа в организме
- Используется для диагностики и мониторинга дефицита или избытка железа в организме
- Концентрация повышается в острой фазе воспаления

Референтные значения

Новорожденные	25-200 мкг/л
1 месяц	200-600 мкг/л
2-5 месяцев	50-200 мкг/л
6 мес. – 15 лет	7-140 мкг/л
Женщины	12-150 мкг/л
Мужчины	15-200 мкг/л

Сниженная концентрация ферритина

- Острая кровопотеря (восстанавливается через 1-2 нед.)
- Хроническая кровопотеря
- Воспалительные заболевания кишечника
- Вегетарианство
- Беременность

Итог: латентный дефицит железа

или ЖДА

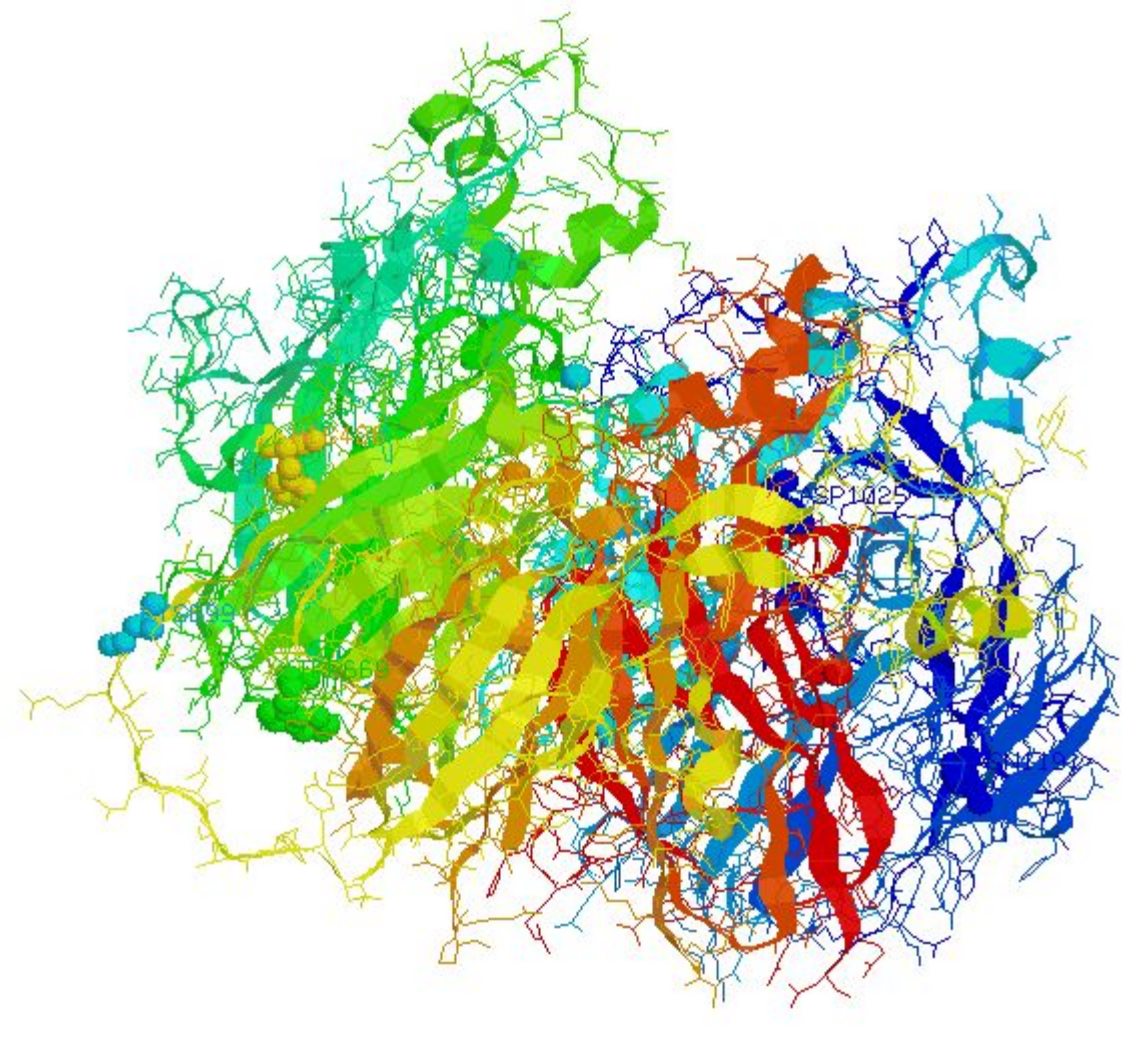
Повышенная концентрация ферритина

- Пероральное или парентеральное лечение препаратами железа
- Неэффективный эритропоэз
- Воспаление

Церулоплазмин

- Связывает 90-95% меди плазмы
- Синтезируется в гепатоцитах или эндотелиоцитах легких
- Основной плазменный антиоксидант
- Острофазный белок
- Транспортирует медь
- Участвует в обмене железа (обеспечивает транспорт железа ферритином)
- Является прокоагулянтом

Взрослые – 0,2 – 0,6 г/л
Новорожденные 0,05 – 0,4 г/л



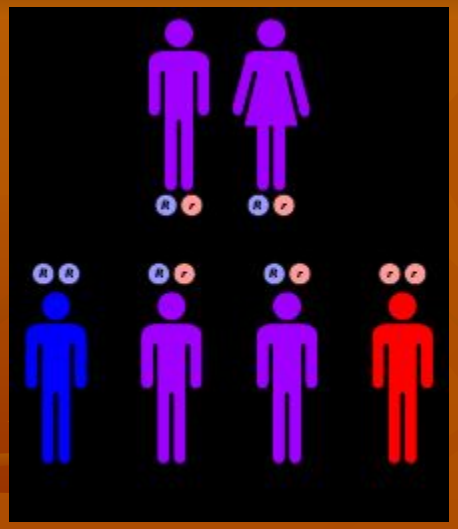
Клинико-диагностическое значение ЦП

Повышается при:

- Воспалении
- Шизофрении
- Хроническом алкоголизме
- Приеме эстрогенов
- Беременности
- Опухолях различной локализации
- Холестаз (нарушение выведения меди)

Снижается при :

- Болезни Вильсона-Коновалова
- Нефротическом синдроме
- Энтеропатии с потерей белка
- Нарушении синтеза в печени
- Нарушение питания



Кольцо Кайзера-Флейшера

Ген ATP7B наследование по аутосомно-рецессивному типу
Частота встречаемости в популяции 1 : 100000

Диагностика:

- Клинические признаки
- Низкое содержание ЦП в плазме крови
- Низкое содержание меди в сыворотке крови
- Высокое содержание меди в моче

Содержание ЦП в сыворотке крови не может служить индикатором эффективности противовоспалительной терапии. Повышенное содержания ЦП в сыворотке крови в условиях воспаления является отражением эногенных противовоспалительных реакций и связано с естественными механизмами защиты организма.

Миоглобин

- Инфаркт миокарда
- Краш-синдром
- деструкция клеток скелетной мускулатуры (полимиозит, токсические поражения, лихорадка при инфекциях)

Вопросы по теме

1. Белки плазмы крови человека, их роль. Нарушение соотношения белков в плазме.
2. Транспортные белки плазмы крови. Альбумин.
3. Белки, участвующие в иммунной защите. Строение иммуноглобулинов, их функции. Парапротеины. Ревматоидный фактор.
4. Белки острой фазы воспаления. С-реактивный белок. Базовая концентрация СРБ.
5. Белки, связывающие ионы металлов (трансферрин, ферритин, церулоплазмин, миоглобин). Функции в организме, диагностическая значимость.