

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.

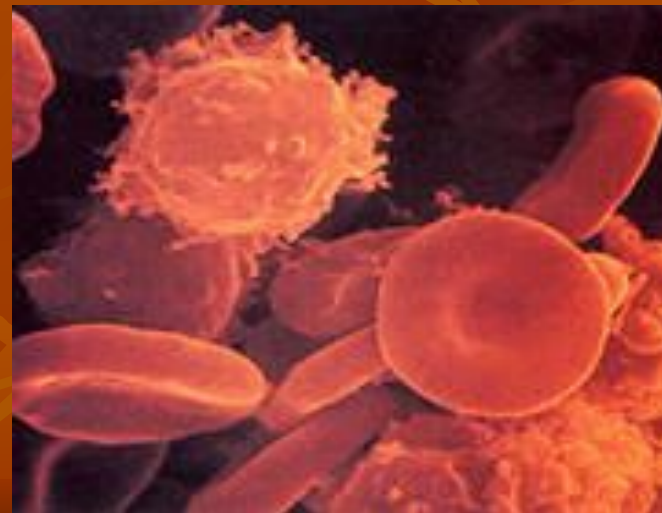
Кроме ИПБ в крови присутствуют белки общего метаболизма:
компоненты свертывания крови, ферменты, гормоны и др.

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

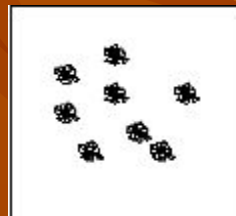
- **Азотометрические:** азот, содержащийся в составе белков, окисляют до NH_4^+ , и его количество определяют титрованием точным раствором HCL) метод Кьельдаля ;
- гравиметрические (весовые);
- «преципитационные»;
- спектрофотометрические;
- рефрактометрические;
- колориметрические;
- электрофорез

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

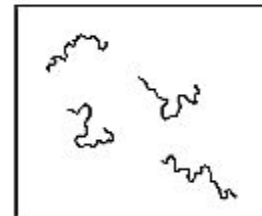
Турбидиметрическое определение белков в моче (с раствором сульфосалициловой кислоты)

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

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



Белки в глобулярной форме имеют малые размеры и не рассеивают свет



Денатурация белков в кислой среде

В результате реакции преципитации образуются крупные белковые частицы, хорошо рассеивающие свет



Недостатки

- **Много ложноотрицательных результатов** (На реакцию денатурации и последующей преципитации белков сильное влияние оказывает состав мочи: рН, 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 преципитаты) При больших концентрациях белка в моче преципитаты могут выпадать в осадок крупными хлопьями.

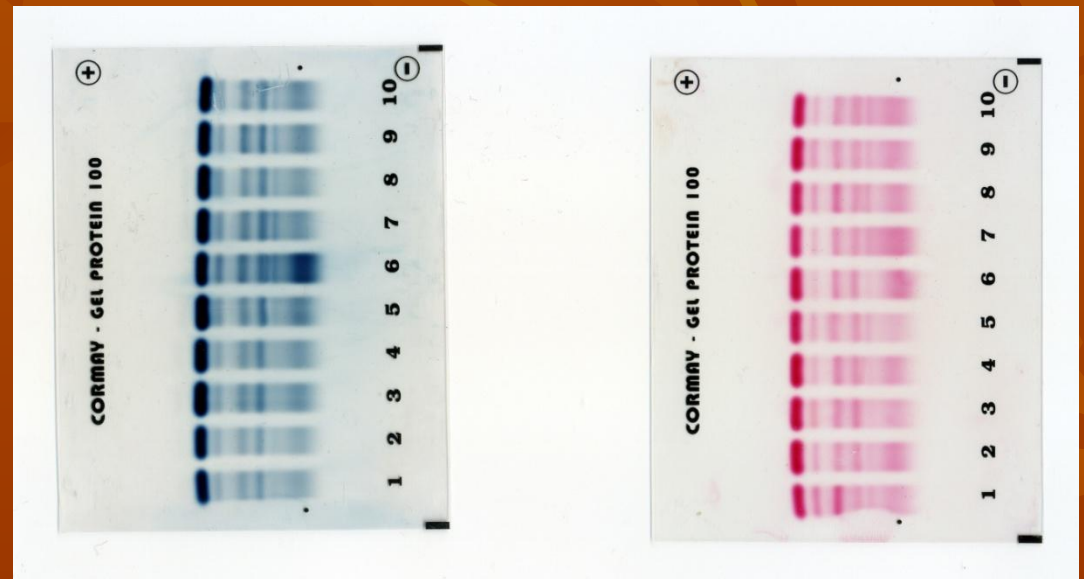
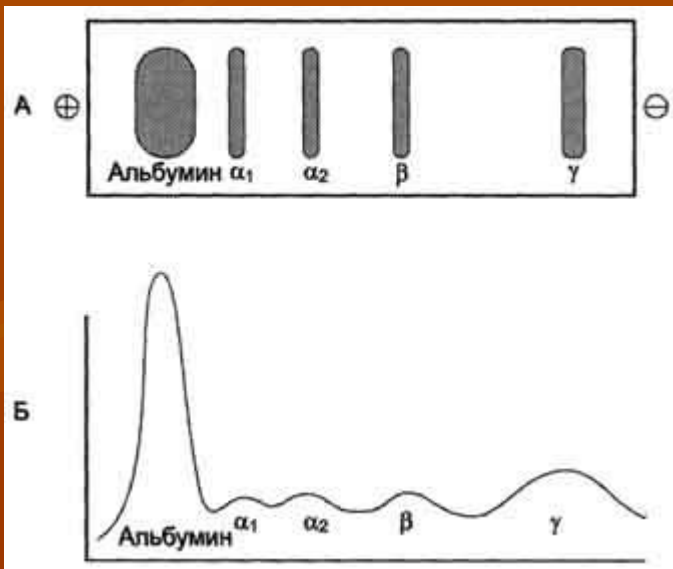
Нефелометрия

**Метод исследования светорассеивающих
(мутных) растворов по измерению
рассеянного света**

греч. – Nephelē – 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 1 г.
2. С возрастом содержание общ. белка снижается. (т.к. преобладают процессы катаболизма)
- 3 В положении лёжа об.белок > на 4-8 г/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 40 г/л сопровождается отёками.
- 6 У беременных – снижение об.бел до 66-61 г/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 кДа
- 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

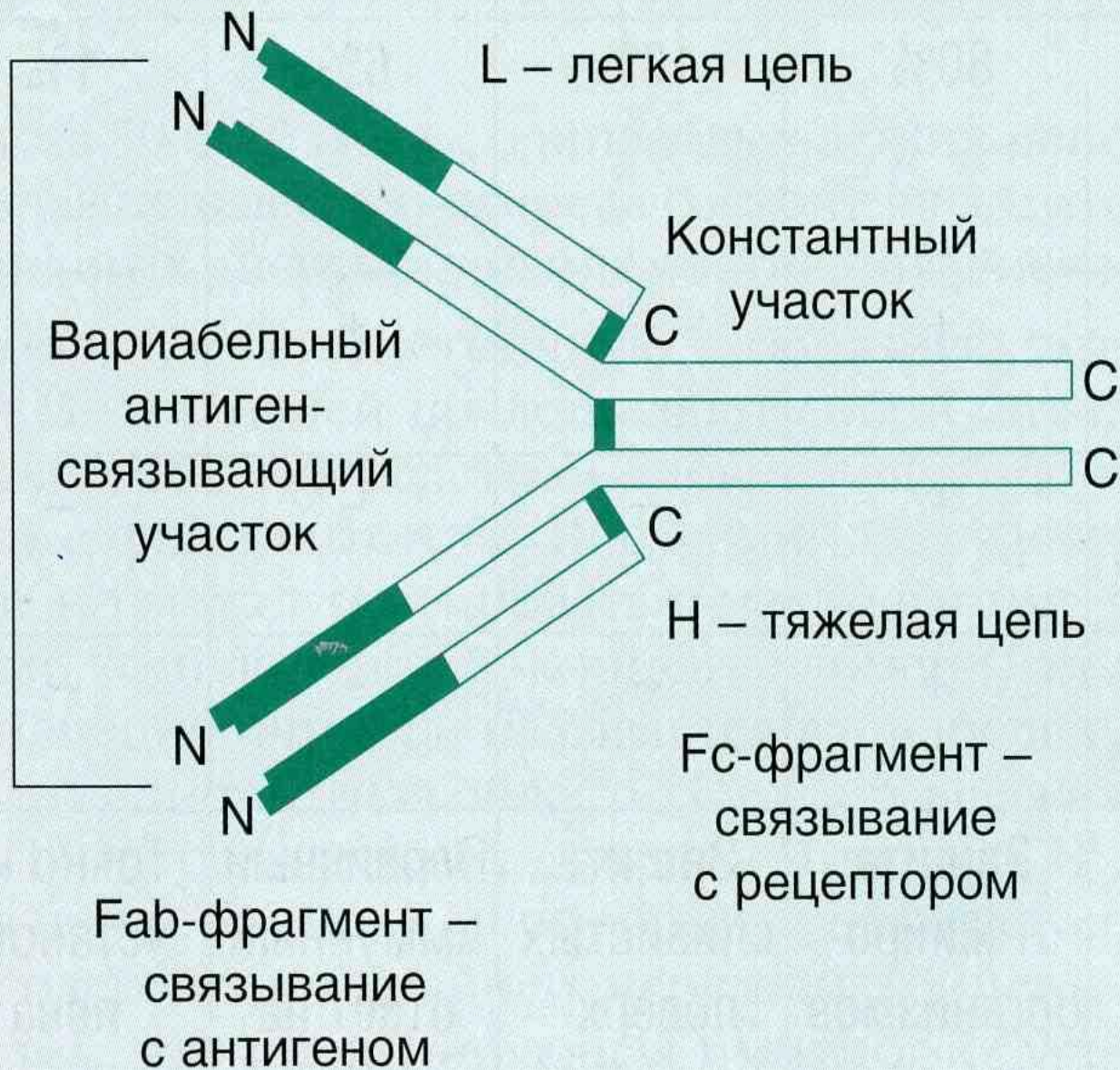
- Анальбуминемия
- Гипоальбуминемия (нефротический синдром, гастроэнтерит, ожоговая болезнь, цирроз, жировая дистрофия печени, тяжелые инфекции, панкреатит, оперативное вмешательство, кровопотеря, шок, недоедание). Альбумин – неспецифический индикатор любой патологии.
- Гиперальбуминемия (артефакт, чрезмерная 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



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

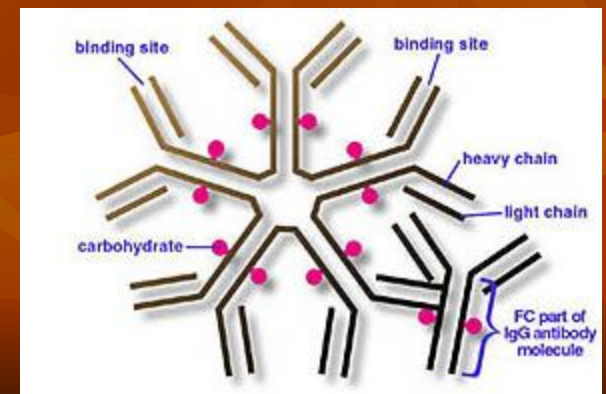
- Содержатся в продуктах внешней секреции (слезы, слюна, пот, слизь бронхов, кишечника, влагалища)
- Локальный иммунный ответ (ЖКТ – пищевые АГ и бактерии кишечника), предупреждение адгезии бактерий к стенке слизистого слоя
- IgA содержатся в грудном молоке и защищают новорожденного от кишечной инфекции

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

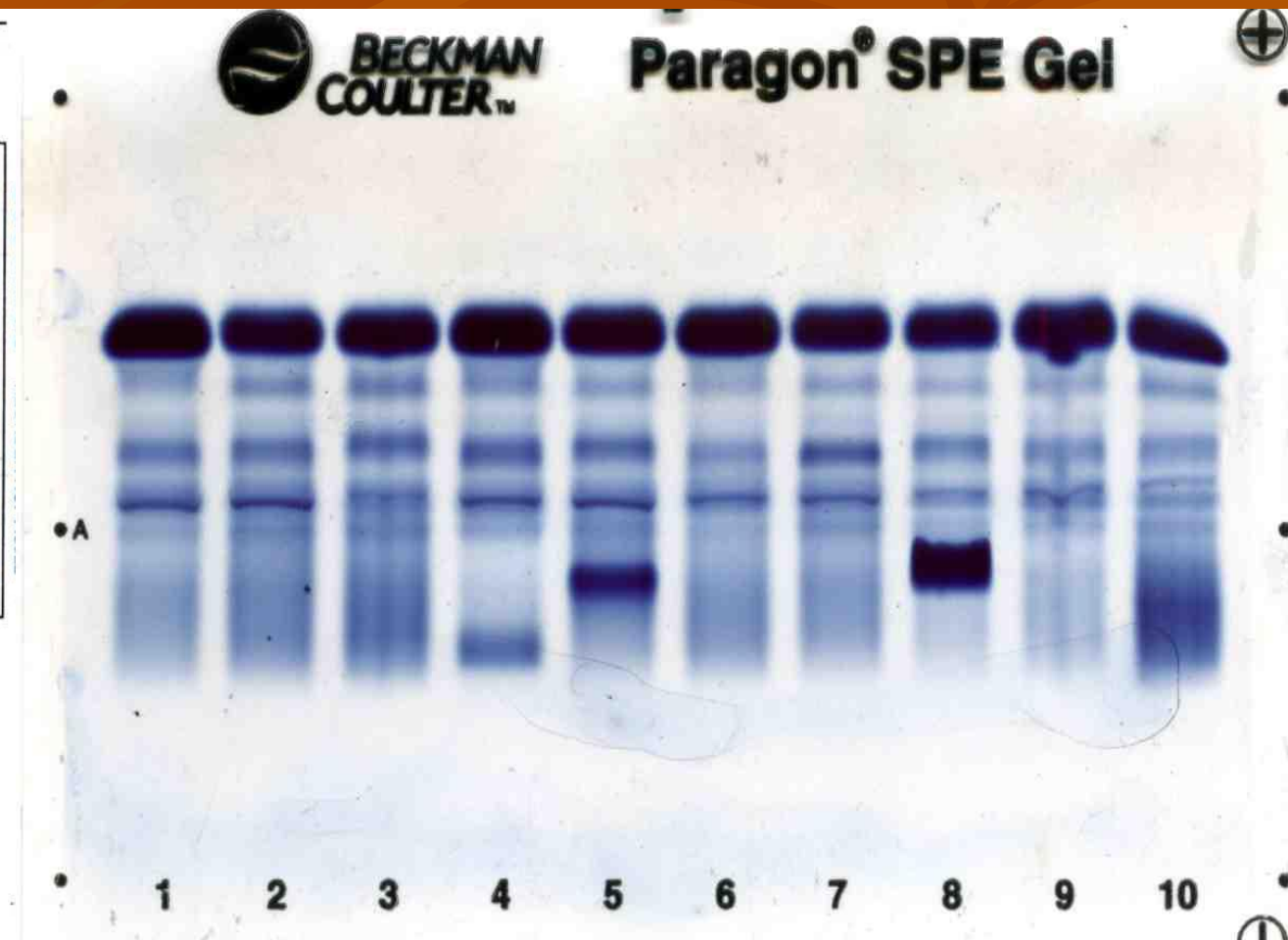
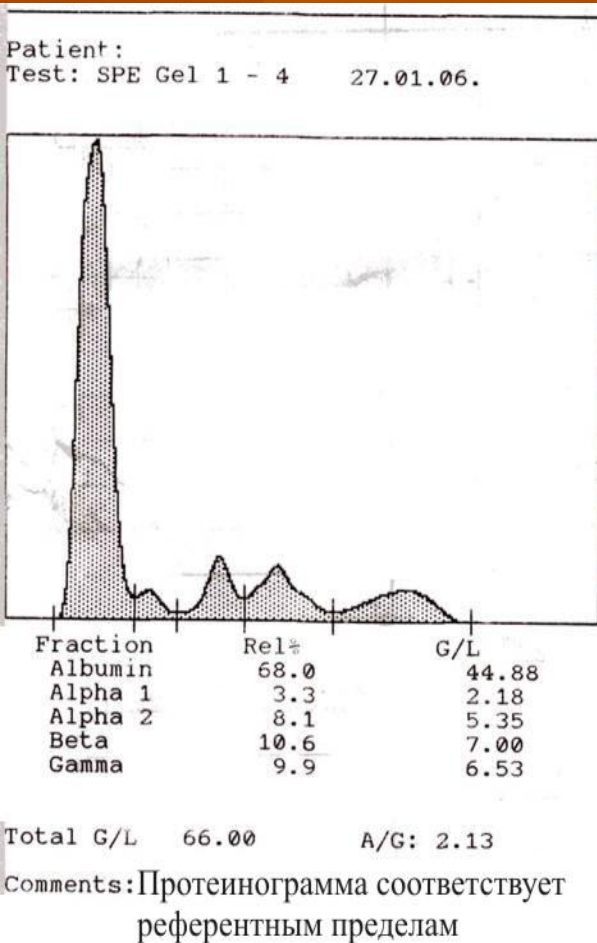
Методы определения иммуноглобулинов

- 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

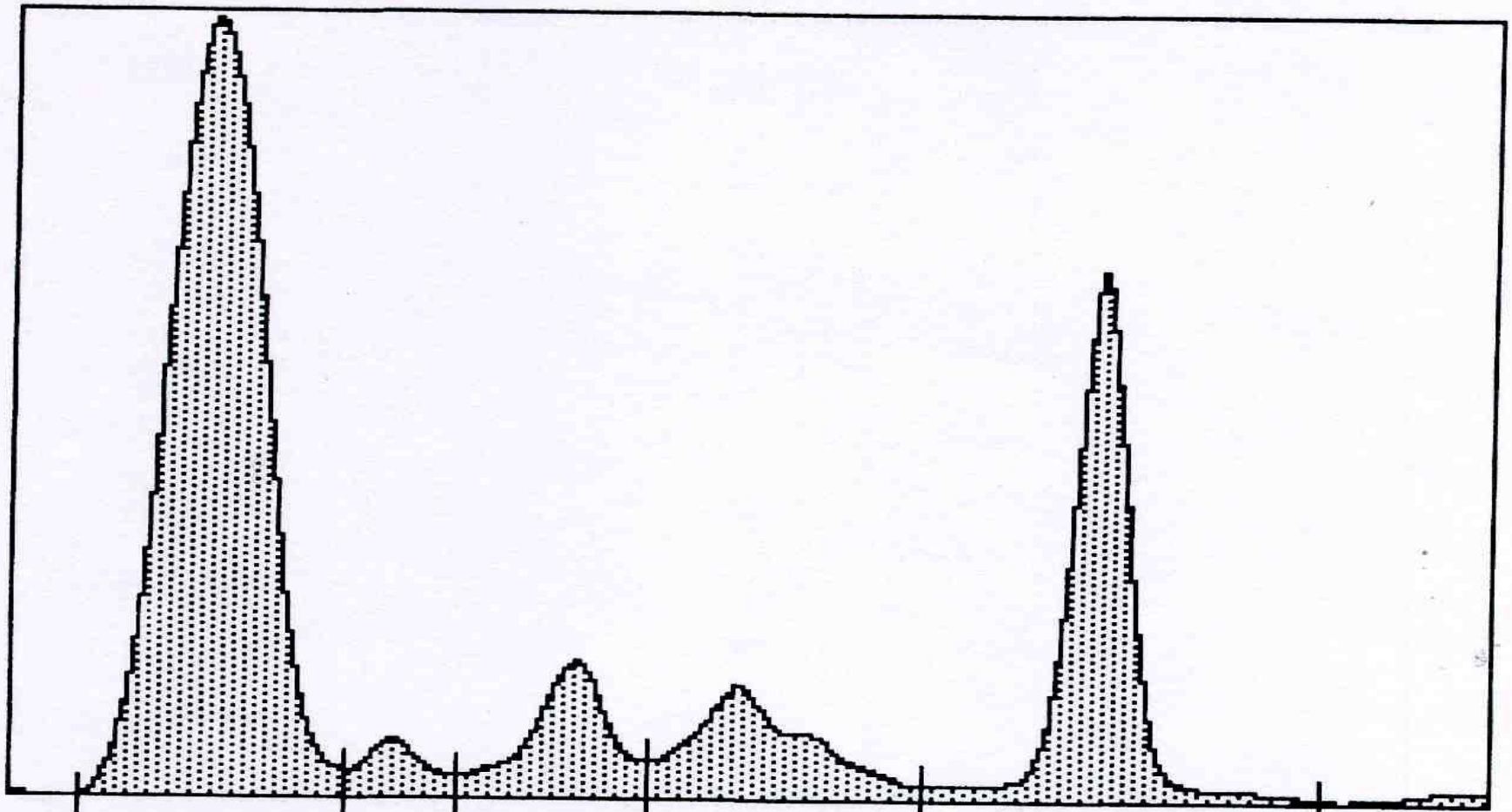
Электрофорез белков на агарозной пленке (10 проб.) Paragon



Patient: 451930

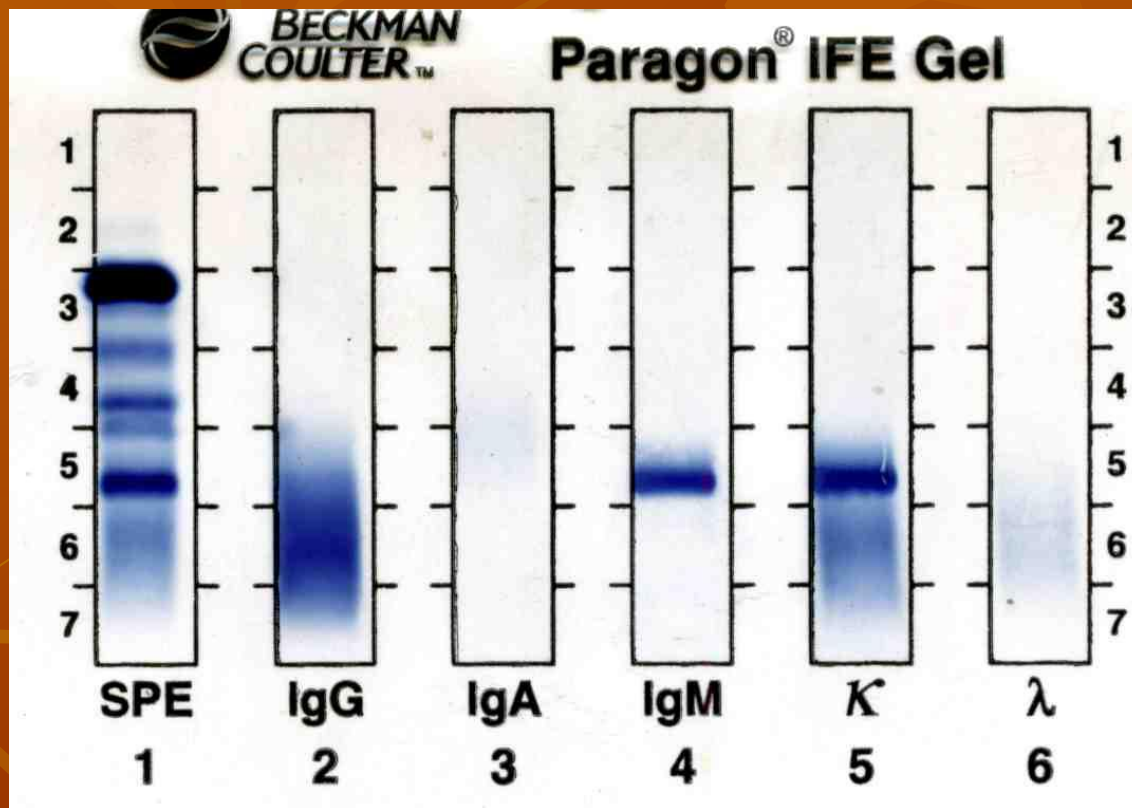
Test: SPE Gel 1 - 1

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

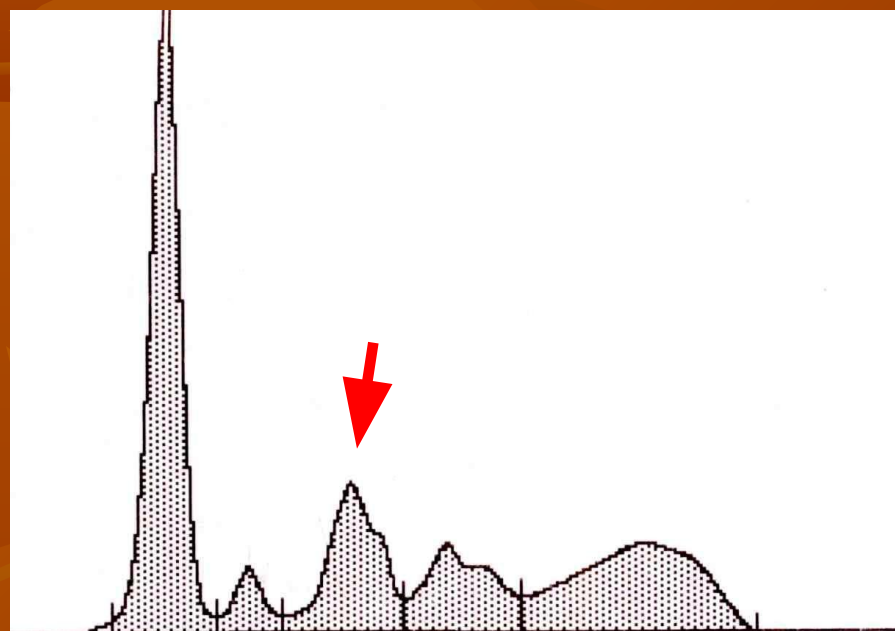
Электроиммунофореграмма больной Ч. с диагнозом:
макроглобулинемия Вальденстрема



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

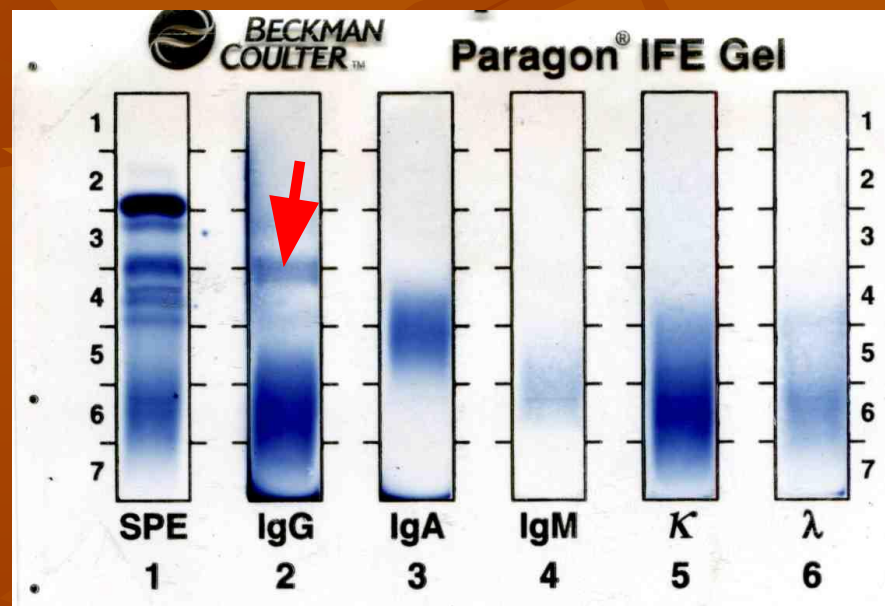
Сравнение ЭФБК с сомнительным пиком больного К. и его подтверждение на ЭИФ

ЭФБК



Fraction	Rel%		G/L
Albumin	42.9	---	27.03
Alpha 1	4.4	++	2.77
Alpha 2	16.4	+++	10.33
Beta	12.3		7.75
Gamma	23.9	+++	15.06

ЭИФ



Моноклональный компонент
IgG-типа

Типы иммуноглобулинов, расположенные в порядке ухудшения прогноза ММ

IgG → IgA → легкие цепи → Ig λ + каппа → Ig λ + лямбда

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**

**С целью
идентификации
сомнительного пика
на ЭФБК
22**

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

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

**Не
подтвержден
18**

**Подтвержден
4 (22%)
IgG – 2
IgG-λ – 1
СЛЦ – 1**

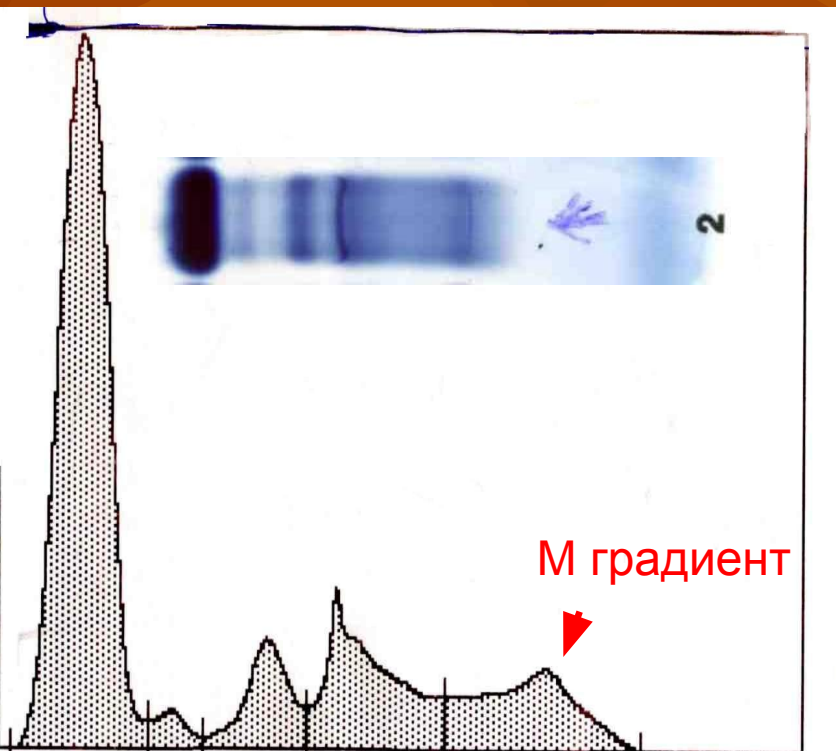
**Не
подтвержден
13**

**Выявлен М-
градиент
6 (32%)
IgG – 2
СЛЦ-K – 3
СЛЦ-λ – 1**

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

До

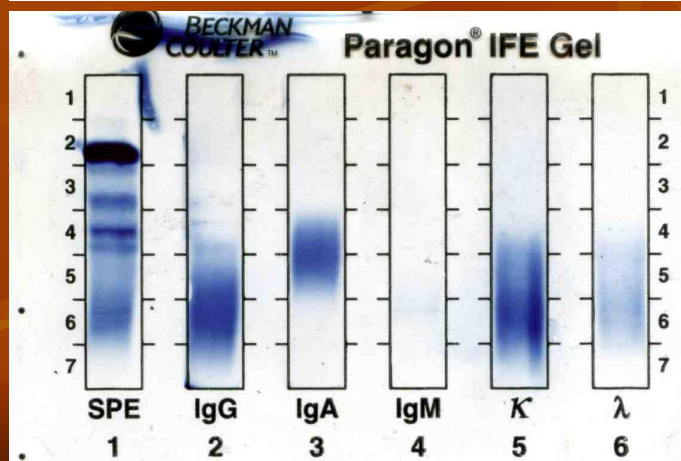
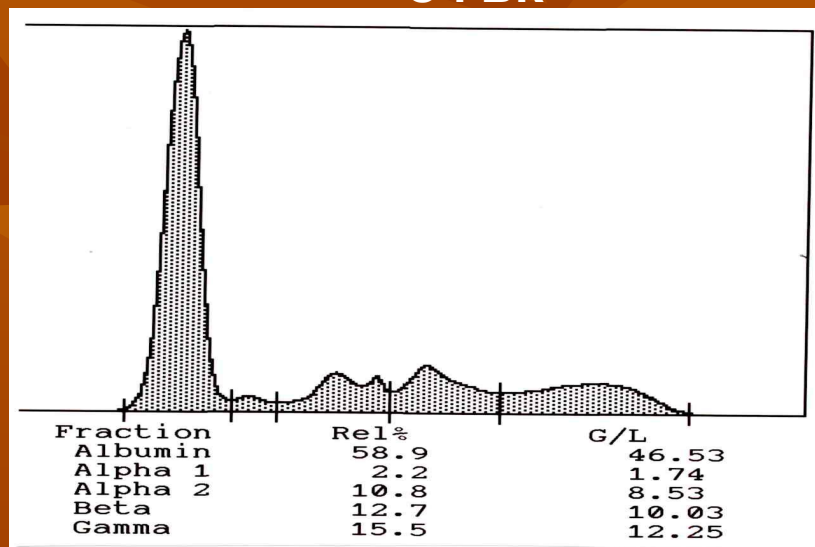
ЭФБК



Fraction	Rel%	G/L
Albumin	59.6	45.30
Alpha 1	2.3	1.75
Alpha 2	8.4	6.38
Beta	15.9 ++	12.08
Gamma	13.7	10.41

После

ЭФБК



ЭИФ

Система для проведения электрофореза в гелях агарозы Hydrasys



The background of the slide features a pattern of stylized autumn leaves in various shades of orange and brown, set against a darker orange gradient background. The leaves are scattered across the frame, with some showing detailed vein structures.

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 симптомы, 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».

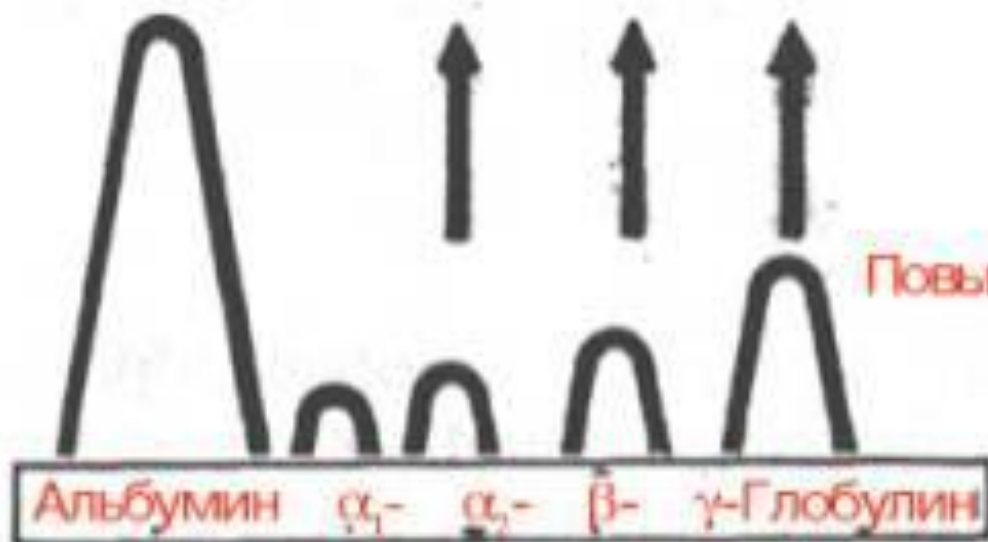
Белые клетки крови и их секреторные продукты – инициаторы этого процесса.

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	Застойная	Хронические воспаления	
Острый ревматизм	желтуха	Хронический полиартрит	
Экссудативный туберкулез	Гепатит	Болезнь Бека—Шауманна	
Нефроз	Нефроз	Ретикулезы, циррозы печени	
Карцинома	β -Миеломы	γ -Миеломы	



Повышение

Характерный признак

Понижение

Недостаток белков
Кахексия, нефроз
Воспаления
Инфекции, цирроз печени
Редко анальбуминемия

Приобретенные
Конституциональные

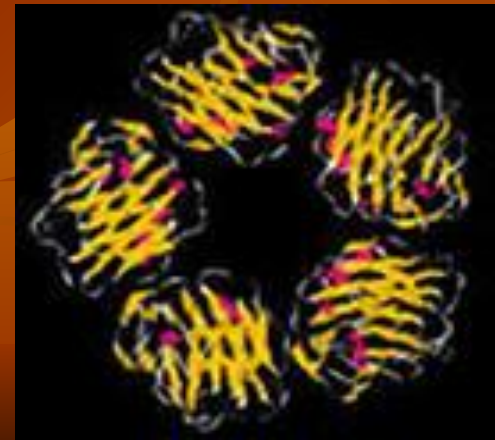
γ - Гипоглобулинемии

C-реактивный белок

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

C-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
- 1,1 – 1,9
- 2,0 – 2,9
- > 3
- Минимальный
- Низкий
- Умеренный
- 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 hsCRP 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, нитрат-редуктаза, ксантиноксидаза	Не идентифицирован	Связывание и активирование $N_2 \rightarrow NH_3$, окисление пуринов
Zn^{2+} , Mg^{2+} Ca^{2+}	Карбоангидраза, пептидазы, фосфатазы, НАДФ-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

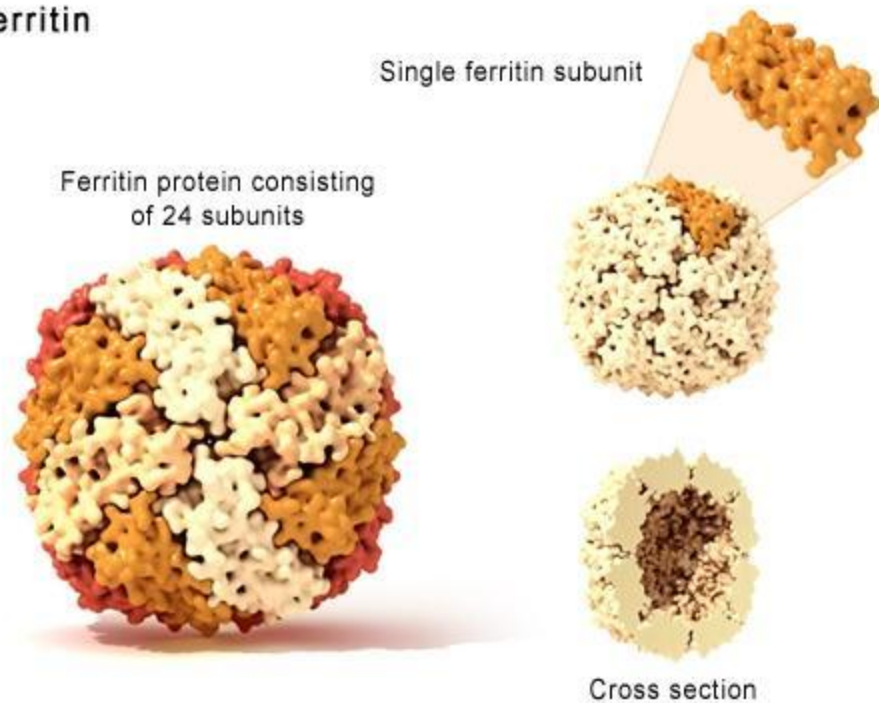
Изменение концентрации трансферрина

- 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

Ferritin



U.S. National Library of Medicine

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

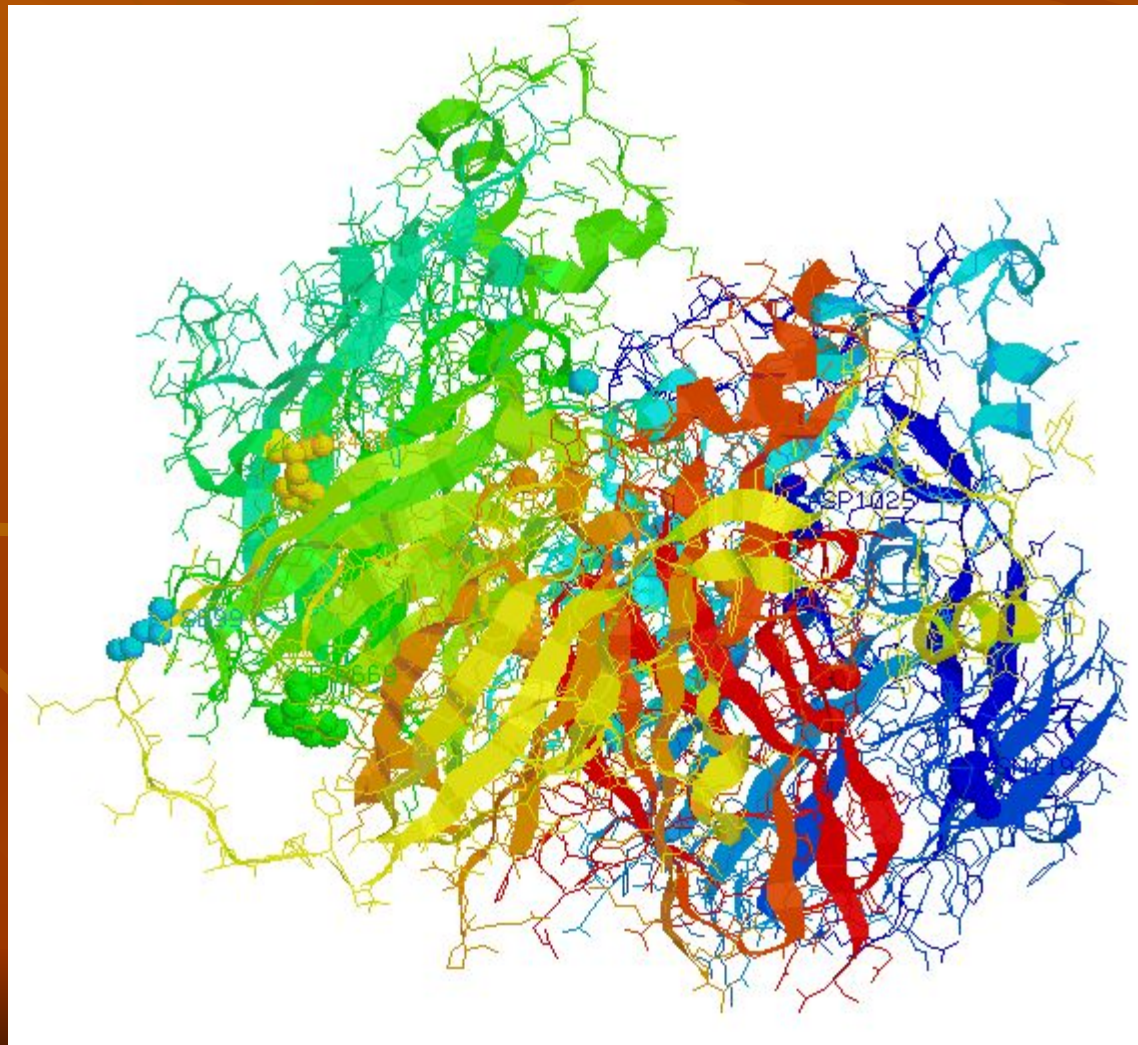
Повышенная концентрация ферритина

- 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



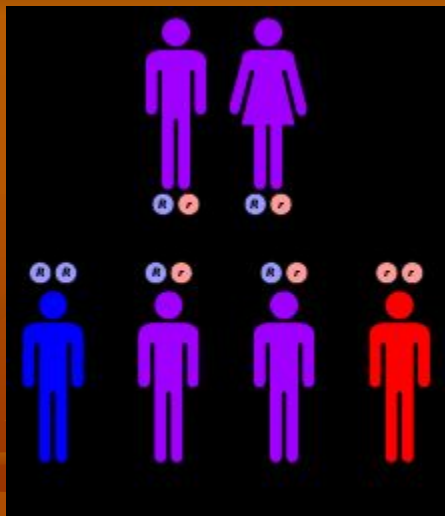
Клинико-диагностическое значение ЦП

Повышается при:

- Воспалении
- Шизофрении
- Хроническом алкоголизме
- приеме эстрогенов
- Беременности
- Опухолях различной локализации
- Холестаза (нарушение выведения меди)

Снижается при :

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



Ген ATR7B наследование по
аутосомно-рецессивному типу
Частота встречаемости в
популяции 1 : 100000



Кольцо Кайзера-Флейшера

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 эндогенных 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.