

BÍLKOVINY V LIDSKÉM ORGANISMU

BÍLKOVINY V LIDSKÉM TĚLE

- ☐ opora organismu
- ☐ integrita organismu
- ☐ transport látek
- ☐ látková výměna
- ☐ obrana organismu

10-50 tisíc proteinů v těle

Funkce, kterou v organismu zajišťují

- ☐ enzymy
- ☐ strukturální proteiny
- ☐ kontraktivní
- ☐ protilátky
- ☐ transportní
- ☐ peptidové hormony

Enzymy a inhibitory

- ❑ 1500
- ❑ biologické katalyzátory, s menšími energetickými nároky urychlují metabolické reakce v lidském těle
- ❑ aktivita enzymů = diagnostická informace

Příklady

- ❑ ceruloplazmin, cholinesterasa
- ❑ inhibitory proteas (α_1 -antitrypsin, α_2 -makroglobulin)

Strukturální proteiny

opora tělu, tkání, buněk

- ❑ kolagen (kosti)
- ❑ keratin (nehty, vlasy)
- ❑ membrány červených krvinek a buněk (tvar)

Kontraktivní proteiny

- aktin
- myosin

Svalová kontrakce a relaxace
Fibrální povaha

Protilátky

Vznik: odpověď imunokompetentních buněk
na přítomnost cizorodých látek
v organismu

ANTIGENY

diagnostický význam
analytická činidla

PROTILÁTKY

Transportní proteiny

- ❑ přenos látek krevním oběhem
- ❑ přenos přes buněčnou membránu
- ❑ regulují množství specifických metabolitů v organismu
- ❑ regulují rychlost biochemických procesů

Příklady

albumin – transport (bilirubin, Ca, léky)

transferin a feritin Fe

specifické proteiny hormony, B₁₂

lipoproteiny cholesterol, další lipidy

Peptidové hormony

- vznikají ve žlázách s vnitřní sekrecí
- uvolňovány do krevního oběhu
- dostat se do jiných částí těla
- váží se na receptor (v místě působení)

Příklady

inzulin – proteinový hormon

peptidové hormony – průběh těhotenství

endorfiny – peptidové hormony (vnímání bolesti)

Metabolismus proteinů

zdroje proteinů

- v tělních tekutinách, v buňkách
- strava

organismus vlastní proteiny
zajistit dostatek aminokyselin
v náležitých poměrech

Trávení proteinů

žaludek pH 2-3

enzym **pepsin** (štěpí amidové vazby)
vytvoří se menší peptidy, které vyvolají
uvolnění hormonů a enzymů z pankreatu
a tenkého střeva

proenzymy štěpeny proteolytickými enzymy
na aktivní formu, která štěpí proteiny
na specifických místech

tenké střevo

rozbití proteinů na malé peptidy:

trypsin, chymotrypsin, elastasa, karboxypeptidasa

hydrolýza menších peptidů:

aminopeptidasy atd.

Absopce aminokyselin - tenké střevo

aminokyseliny vstupují do buněk střevní mukózy tenkého střeva a pak jsou transportovány do jater

transport specifických skupin aminokyselin do mukózních buněk zprostředkovávají různé enzymové systémy (na účet energie)
z buněk -pasivně

Syntéza nových proteinů

- proteosyntéza-proces regulován chromozomy
- sekvence aminokyselin (genetický kód)

Odbourávání proteinů

buňka se rozdělí nebo odbourá, do oběhu se uvolní proteiny

katabolismus proteinů (intracelulární enzymy)

aminokyseliny, malé peptidy
(využití i pro proteosyntézu)

hladina proteinů v krvi klesá, stoupá
během dne, hodin

Vylučování proteinů

Mr 60 000 (hranice pro filtraci v glomerulech)

moč:

- ❑ sloučeniny s vyšším Mr
- ❑ sloučeniny s menším Mr glomerulem vylučovány
může ztrácet jen málo proteinů

Příklady

amylasa Mr 40 000-50 000

fragmenty imunoglobulinů (určitý typ kostních
nádorů)

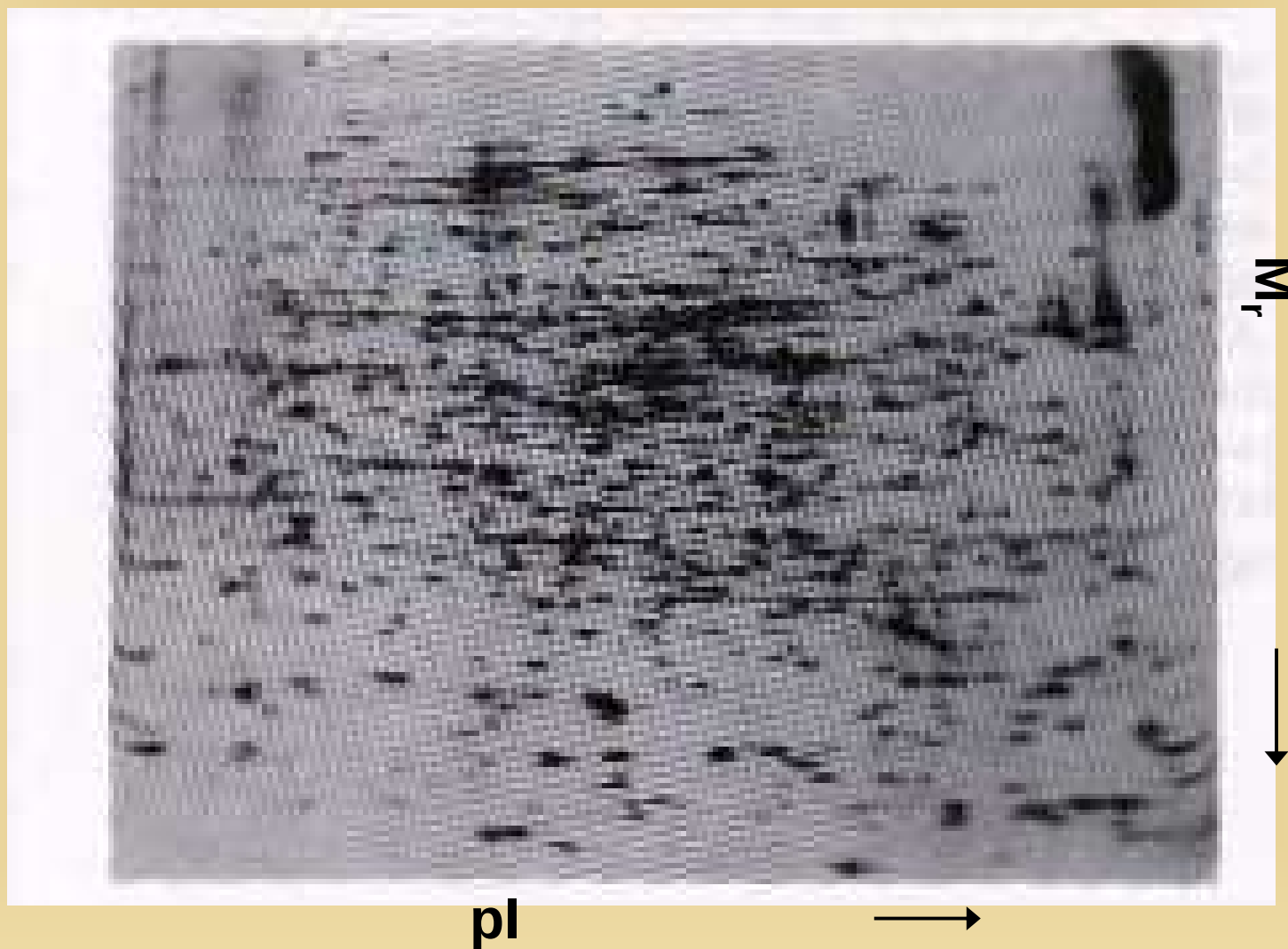
detekce těchto proteinů má klinický význam

Plazmatické bílkoviny

krevní plazma: bílkoviny

- ☐ koncentrace
- ☐ velikost
- ☐ funkce

Dvoudimenzionální elektroforéza



Funkce plazmatických bílkovin

- ☐ udržení onkotického tlaku
- ☐ transport minerálů, hormonů, lipidů, léků
- ☐ ochrana proti infekci (Ig, komplement)
- ☐ hemokoagulace a fibrinolýza
- ☐ enzymy a inhibitory
- ☐ speciální funkce (ochrana před volnými radikály)

Analýza proteinů

- ☐ celkové proteiny (TP) 62-82 g/l
- ☐ albumin 35-53 g/l
- ☐ změny v elektroforetických frakcích
- ☐ imunoelektroforéza (specifický protein)
- ☐ 2-D-elektroforéza, analýza MALDI

Celkové proteiny

v moči

kvalitativně: +- (průkaz proteinů v moči)

kvantitativně: bilance bílkovinného dusíku (v moči)
specifický protein se v moči obvykle nestanovuje

v séru a v jiných tělních tekutinách

celkové proteiny: nespecifický test (rychlý)

specifický protein: specifické protilátky

rozdělení pomocí elektroforézy

Celkové proteiny
hypoproteinemie

hyperproteinemie

- převodnění pacienta
- malnutriční stavy
- dehydratace
- růst frakce Ig

albumin
úbytek

nefrotický syndrom
těžké hepatopatie

vliv na celkové proteiny

Metody stanovení

Celkové proteiny

biuretovo činidlo: proteiny = aminokyseliny spojené
peptidovou vazbou

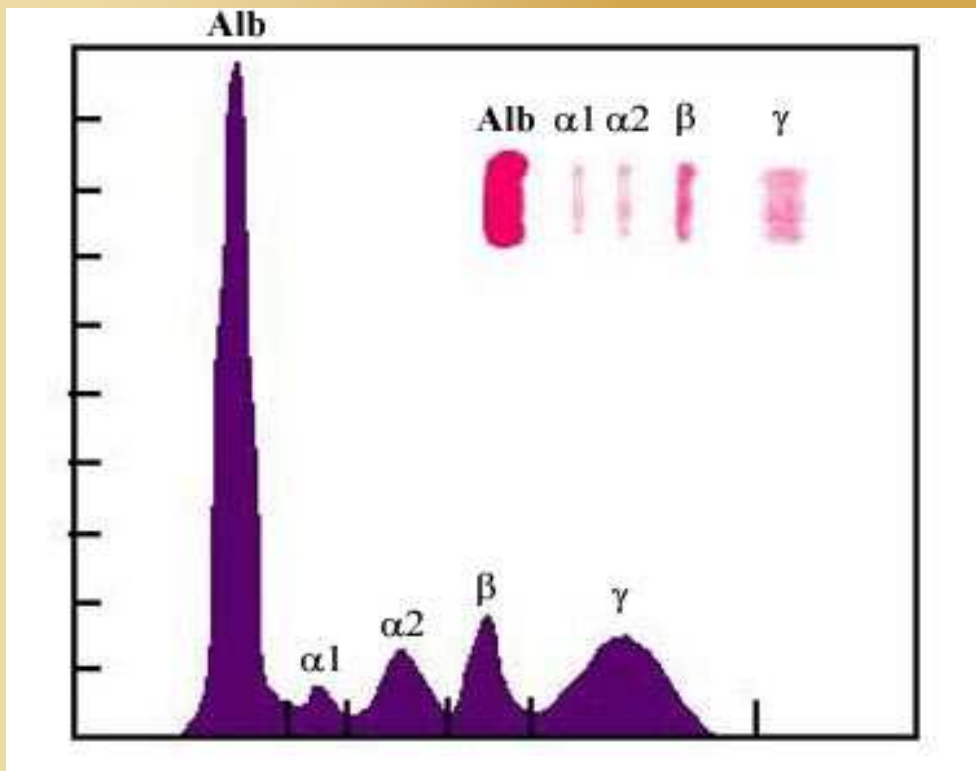
peptidová vazba tvoří komplexy s Cu^{2+}
modré zbarvení -spektrofotometricky

Albumin

bromkresolová zeleň při pH 4,15
zelené zbarvení (630 nm)

Elektroforéza krevního séra

- ❑ v agarosovém gelu v barbitalovém pufru, pH 8,6
- ❑ na celulozoacetátové membráně v barbitalovém pufru pH 8,6



Elektroforetické typy

5-6 frakcí

- ☐ albumin
- ☐ globuliny α_1
- ☐ globuliny α_2
- ☐ globuliny β (β_1 a β_2)
- ☐ globuliny γ

Ize dosáhnout i lepší rozdělení,
klinicky nevýznamné

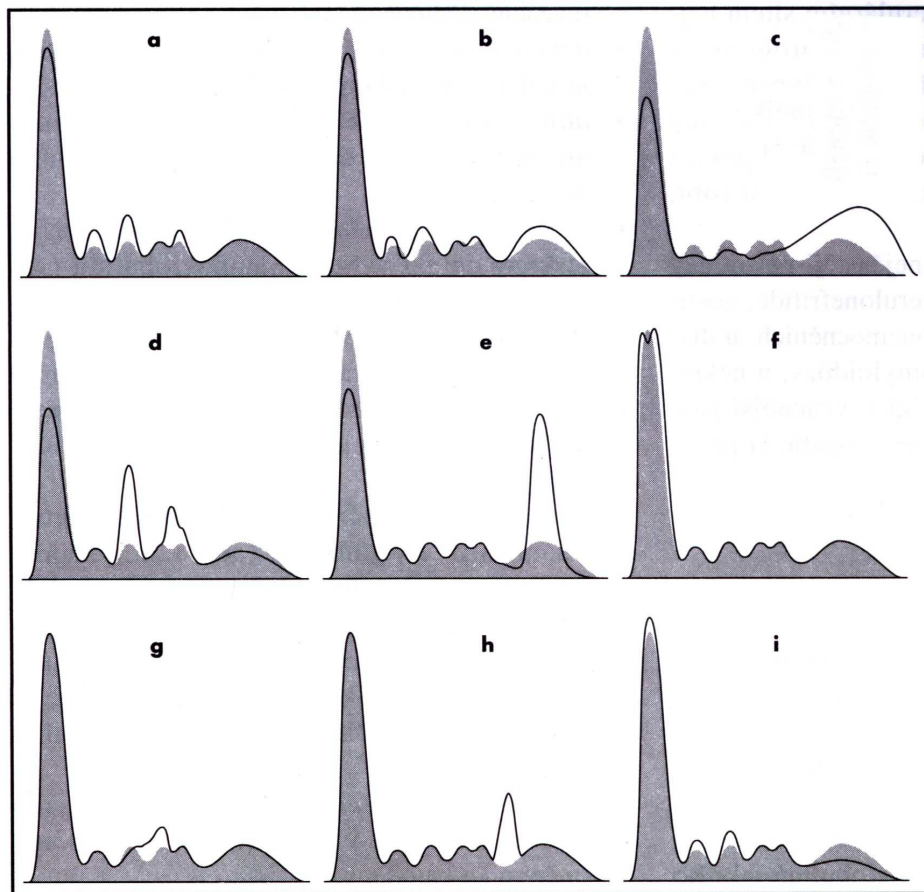
albumin = 1 bílkovina

ostatní frakce = směs proteinů

Proteinový profil v séru

CELKEM:	85 g/l	
Albumin	(35-50 g/l)	65%
alpha-1	(1,7-3,3 g/l)	2.6%
alpha-2	(4,2-9 g/l)	8.4%
beta	(5,2-10,5 g/l)	13%
gamma	(7,1-16,5 g/l)	15%

Změny podílů elektroforetických frakcí charakteristické určitým chorobným stavům (ne jedna ale skupina chorob)



- a) akutní zánět
- d) nefrotický syndrom
- e) hyperimmunoglobulinemie

Typ akutního zánětu

- TP = normální
- malé snížení albuminu
- vzestup α_1 a α_2 globulinů

hromadění bílkovin akutní fáze v krevním séru

u všech zánětů (operace, úraz, infarkt)

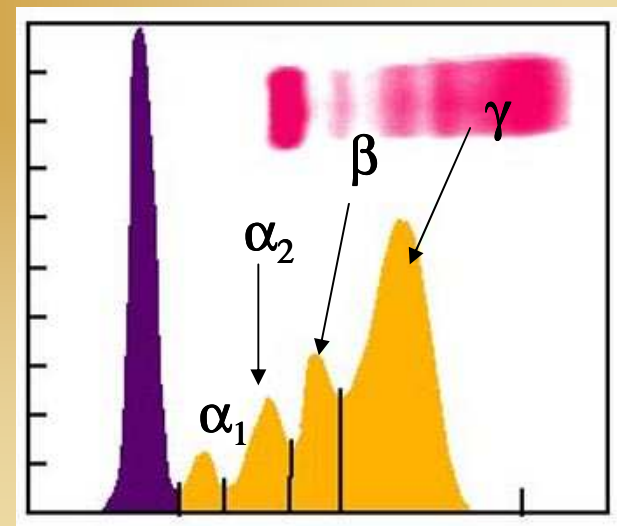
Typ chronického zánětu

- ❑ vzestup α_1 a α_2 (méně výrazné)
- ❑ výrazný vzestup γ globulinové frakce (široký pruh γ globulinové frakce)

polyklonální hyperimmunoglobulinemie

- ❑ pokles albuminu (zvýšený katabolismus)

- ✓ chronické infekční choroby
HIV+/AIDS
- ✓ zánětlivá onemocnění pojiva
- ✓ autoimunitní onemocnění



Typ chronické hepatopatie

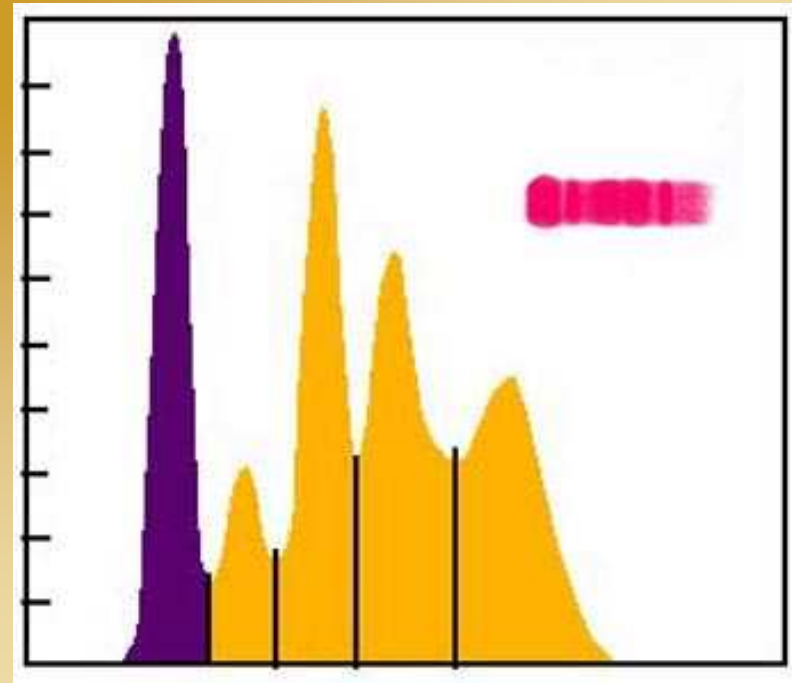
- ☐ snížený albumin
- ☐ nárůst γ frakce
- ☐ β - γ můstek IgA

akutní hepatitida

Typ nefrotického syndromu (ztráta bílkovin)

- ❑ velký pokles albuminu
- ❑ i pokles γ globulinů
- ❑ α_2 a β globuliny výrazně stoupají

nefrotický syndrom
chronická glomerulonefritida
postižení ledvin



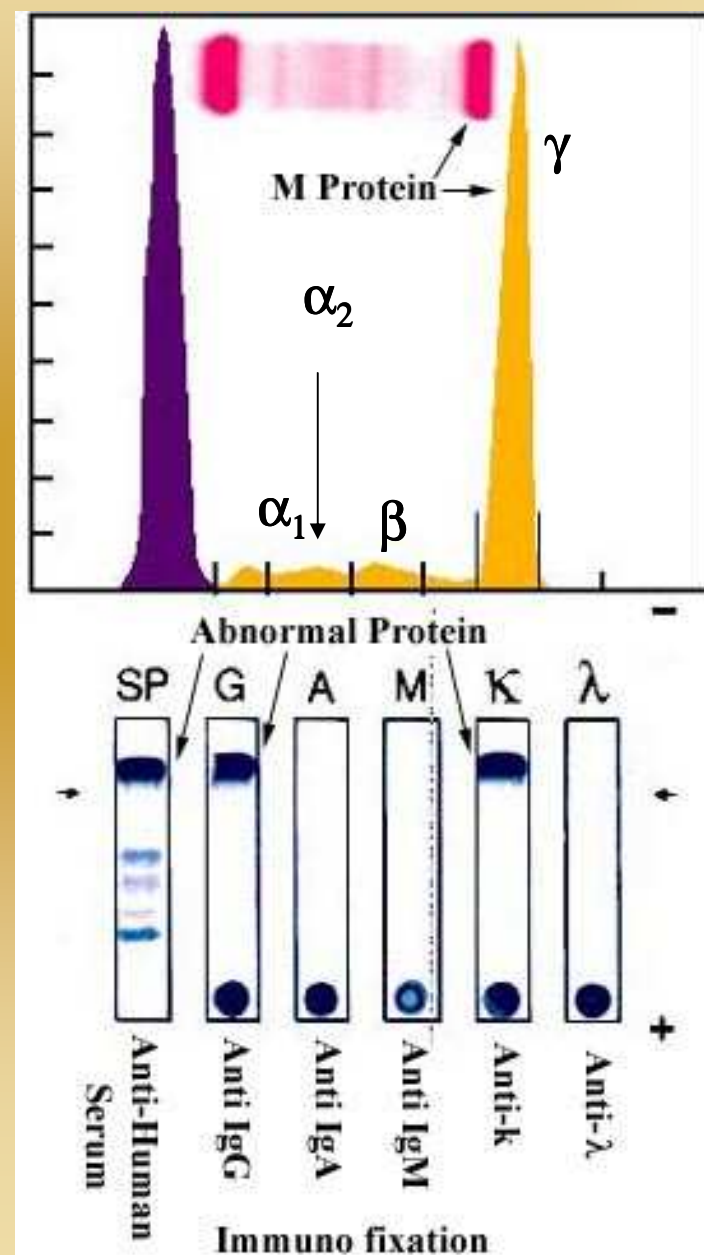
Malnutriční typ

- ☐ pokles albuminu
(chybí Ak, porucha syntézy proteinů)
- ☐ pokles β_1 globulinů
(porucha syntézy transferinu)
- ☐ α_1 , α_2 a γ normální
- ☐ celková bílkovina výrazně snížena

Monoklonální hyperimmunoglobulinemie

- mezi α_2 po γ úzký pruh monoklonálního Ig
- někdy nižší albumin

nádorové onemocnění
mnohočetný myelom



Klinicky významné plazmatické proteiny

- ☐ prealbumin
- ☐ protein vázající retinol
- ☐ α -1-antitrypsin ————— α_1
 reaktanty akutní fáze zánětu
- ☐ α -1-kyselý glykoprotein ————— α_1
- ☐ α -2-makroglobulin ————— α_2
- ☐ haptoglobiny ————— α_2
- ☐ ceruloplasmin ————— α_2
- ☐ transferrin ————— α_2
- ☐ hemopexin ————— α_2
- ☐ C-reaktivní protein ————— β
- ☐ fibrinogen ————— β
- ☐ imunoglobuliny ————— γ

Prealbumin

vázající thyroxin

M_r 54 000

transport thyroxinu a trijodothyroninu

indikátor stavu výživy

snížení: jaterní choroba (snížení syntézy)

zvýšení: onemocnění ledvin (sníží se rychlost glomerulární filtrace)

elektroforéza: před albuminem, ale při běžném provedení není frakce viditelná

kvantitativní stanovení: nefelometrie
radiální difúze (RID)
elektroimunodifúze

Prealbumin vytváří komplex s bílkovinou transportující vitamín A

Protein vázající retinol

transportní protein vázající retinol (RBP)
(retinol-binding protein)
přenáší vitamín A (retinol) do cílových buněk

kvantitativní stanovení: nefelometricky
RID

α -1-antitrypsin (AAT)

α -1-antiproteasa skupina inhibitorů sérinových proteas syntetizovaných v játrech

Funkce AAT: inaktivovat proteasy
(elastasu a kolagenasu)
zábrana odbourávat pojivovou tkáň

AAT je sám inaktivován faktory uvolněnými
z neutrofilů

Nedostatek AAT: je dědičný
nemoc u dětí jako onemocnění jater
pacienti ve věku 20-30 let -rozedma plic

AAT je reaktant akutní fáze zánětu APR
(Acute-Phase Reactant)

Reaktanty akutní fáze (APR)

proteiny, které zvyšují svou koncentraci při odpovědi na akutní zánět (infarkt myokardu, maligní nádor, infekce, chirurgický zákrok, poranění)
součást obrany organismu

VÝZNAM: nikoliv diagnostika

sledování průběhu choroby, léčení

Při růstu APR = k poklesu albuminu, prealbuminu a transferinu (stejná c proteinů)

nedostatek AAT lze sledovat elektroforeticky (tvoří 90% všech proteinů frakce α -1)

METODA: nefelometricky

RID

α -1-kyselý glykoprotein orozomukoid

AAG (Alpha-1-Acid Glycoprotein)

M_r 44 000, syntetizován v játrech
44% cukrů

inaktivace progesteronu

váže bázická léčiva

reaktant akutní fáze zánětu

zvýšení: při zánětu

autoimunitní onemocnění

snížení. užívání antikoncepčních prostředků

Metoda: nefelometricky, RID

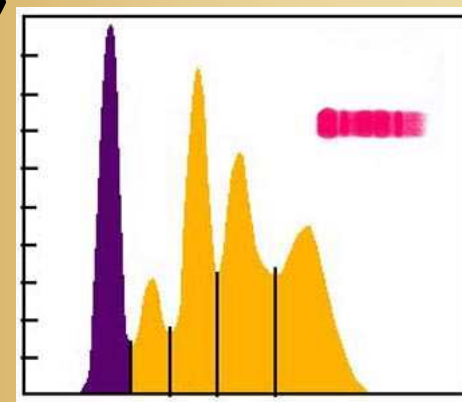
α -2-makroglobulin

AMG, proteasový inhibitor Mr 625 -800 kDa
inhibuje proteolytickou aktivitu:
trypsinu, chymotrypsinu, elastasy,
plasminu

ovlivňuje zánětlivé procesy (vazba
snížení: akutní pankreatitida
mnohočetný myelom

zvýšení: jaterní nemoci, diabet,
nefrotický syndrom
(špatně proniká glomerulem)

Metody: nefelometrie, RID



Haptoglobin (α_2)

glykoprotein
váže pevně hemoglobin,

vzniklý komplex je z oběhu vychytán buňkami RES
(retikuloendoteliálního systému)

hemoglobin, který není navázán na haptoglobin,
prochází glomerulem a precipituje v tubulech
způsobuje vážné poškození ledvin

význam: zabránění vzniku nebezpečného
hydroxylového radikálu (volný hemoglobin)

Metody: nefelometrie, RID

Hemopexin (β)

M_r 57 000

elektrolytická pohyblivost β -1-globulinu

Funkce: vázat uvolněnou hemovou skupinu a přenášet ji do jater k metabolické konverzi na bilirubin

Metody: nefelometrie
RID

v rutinních laboratořích KB se příliš nestanovuje

Ceruloplasmin

α -2 globulin, Mr 120-160 kDa

labilní

ceruloplasmin váže

6-7 atomů mědi (namodralý komplex)

90% plazmatické mědi

zbytek mědi je vázán na albuminu

Funkce: oxidasová aktivita

katalyzuje oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+}

reaktant akutní fáze zánětu

koncentrace roste v těhotenství

Wilsonova choroba (defekt tvorby ceruloplazminu)

Transferin

glykoprotein s pohyblivostí β -globulinů
zprostředkovává transport železa

ionty pocházejí z hemu odbouraného v játrech a
z potravy a jsou přenášeny transferinem do míst
erytropoesy (krvetvorby) v kostní dřeni

negativní reaktant akutní fáze zánětu

snížení:

- popáleninách
- infekcích
- maligních procesech
- nemoci jater, ledvin
- dědičná atransferinemii (nedostatek transferinu)

zvýšení:

- nedostatek železa diagnóza anemie
- těhotenství
- terapie estrogeny

Metody: nefelometricky
RID

C-reaktivní protein CRP (C-Reactive Protein)

precipitace C polysacharidu pneumokoků

reaktant akutní fáze zánětu
syntéza v játrech

zvýšení:

imunitní odpověď na infekci

poškození tkáně, nekróza buněk

(během infarktu myokardu nebo zhoubné nádorové k
sleduje se v průběhu nemoci

Metody: aglutinace latexových částic
enzymoimunostanovení
nefelometricky

Fibrinogen

glykoprotein s pohyblivostí mezi β -globuliny a γ
vlastní substrát trombinu
(hlavní enzym při procesu srážení krve)

reaktant akutní fáze zánětu

Metody: na fibrometru v koagulační laboratoři

Imunoglobuliny

(protilátky)

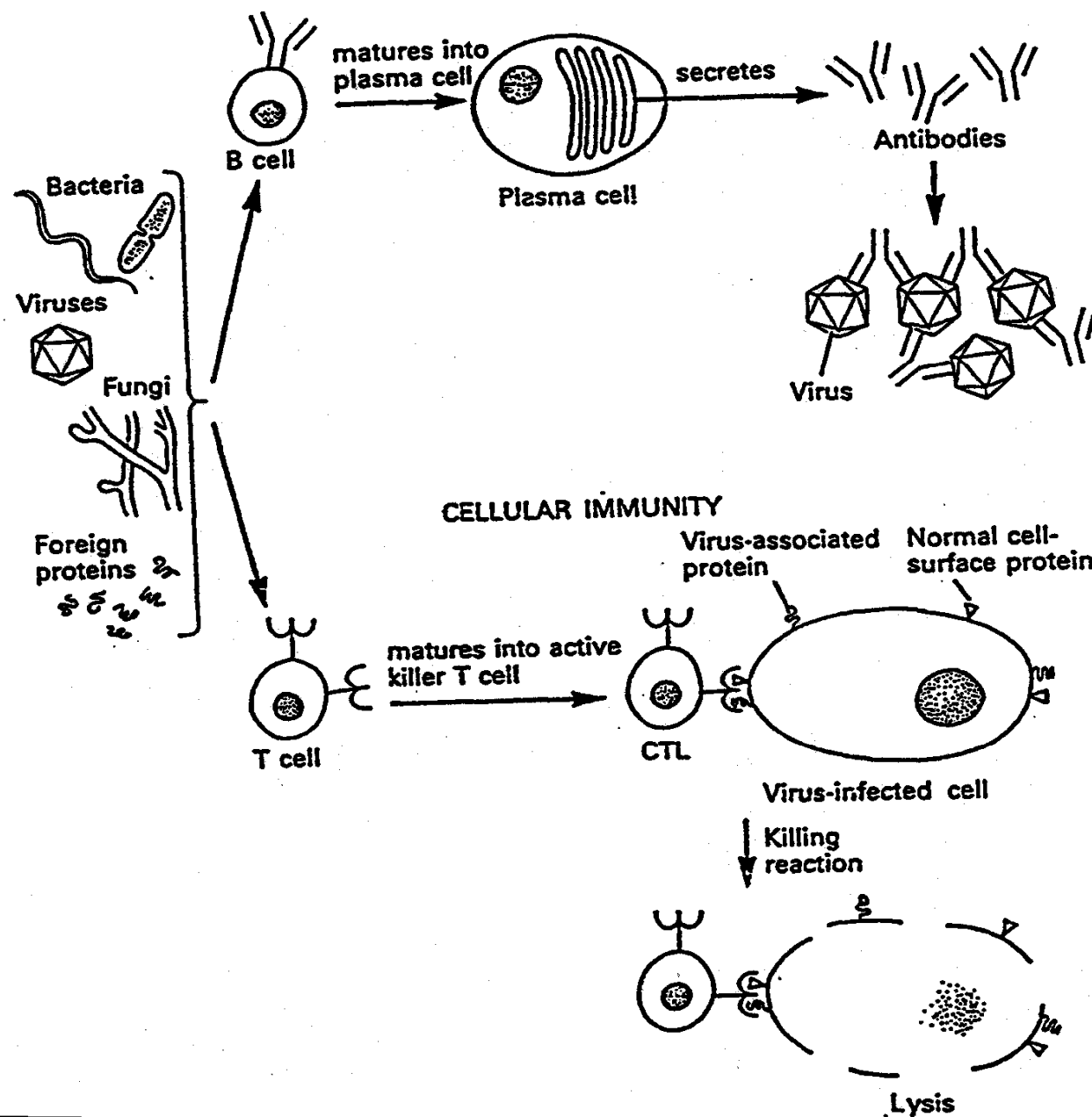
produkce imunokompetentními liniemi B-lymfocytů
z kostní dřeně (nikoliv játra)

Metody: nefelometricky
RID

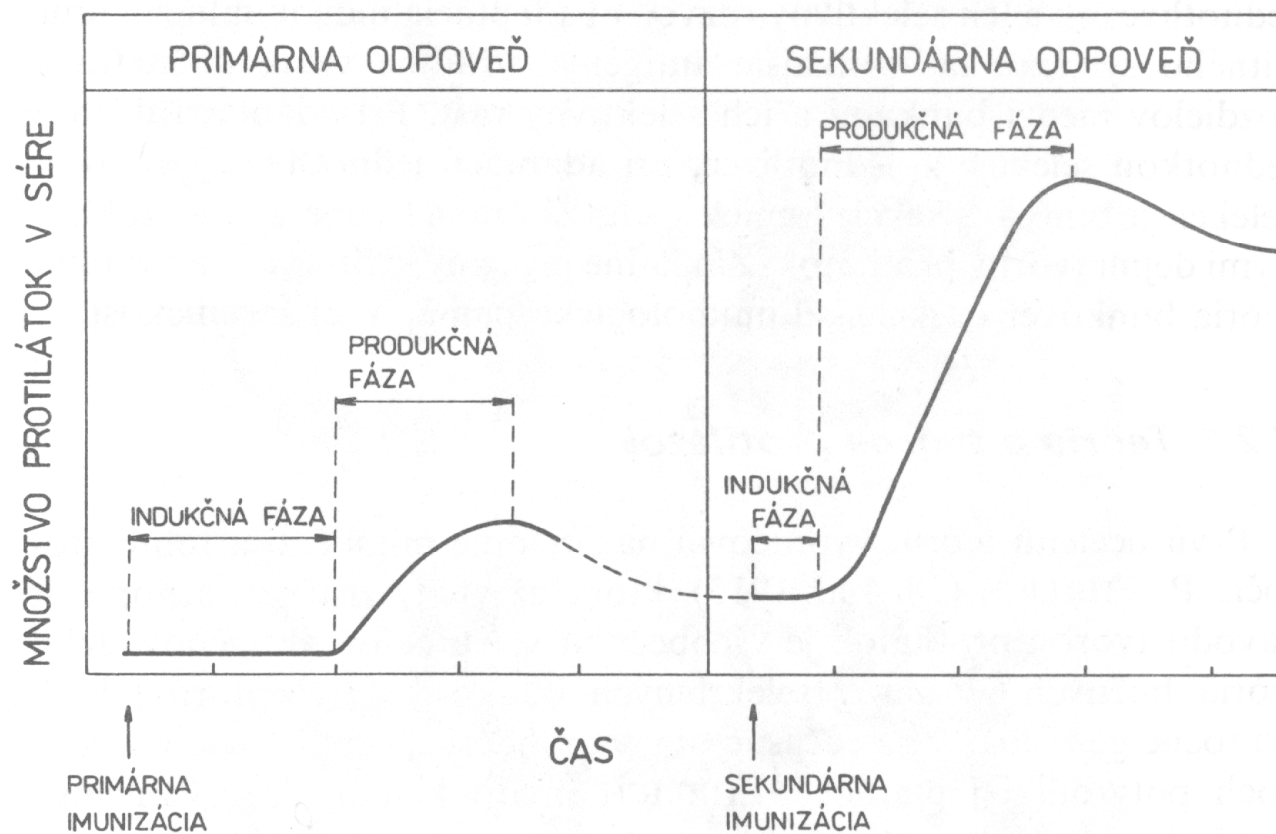
Snížení: vrozené nebo získané

Zvýšení: monoklonální
polyklonální

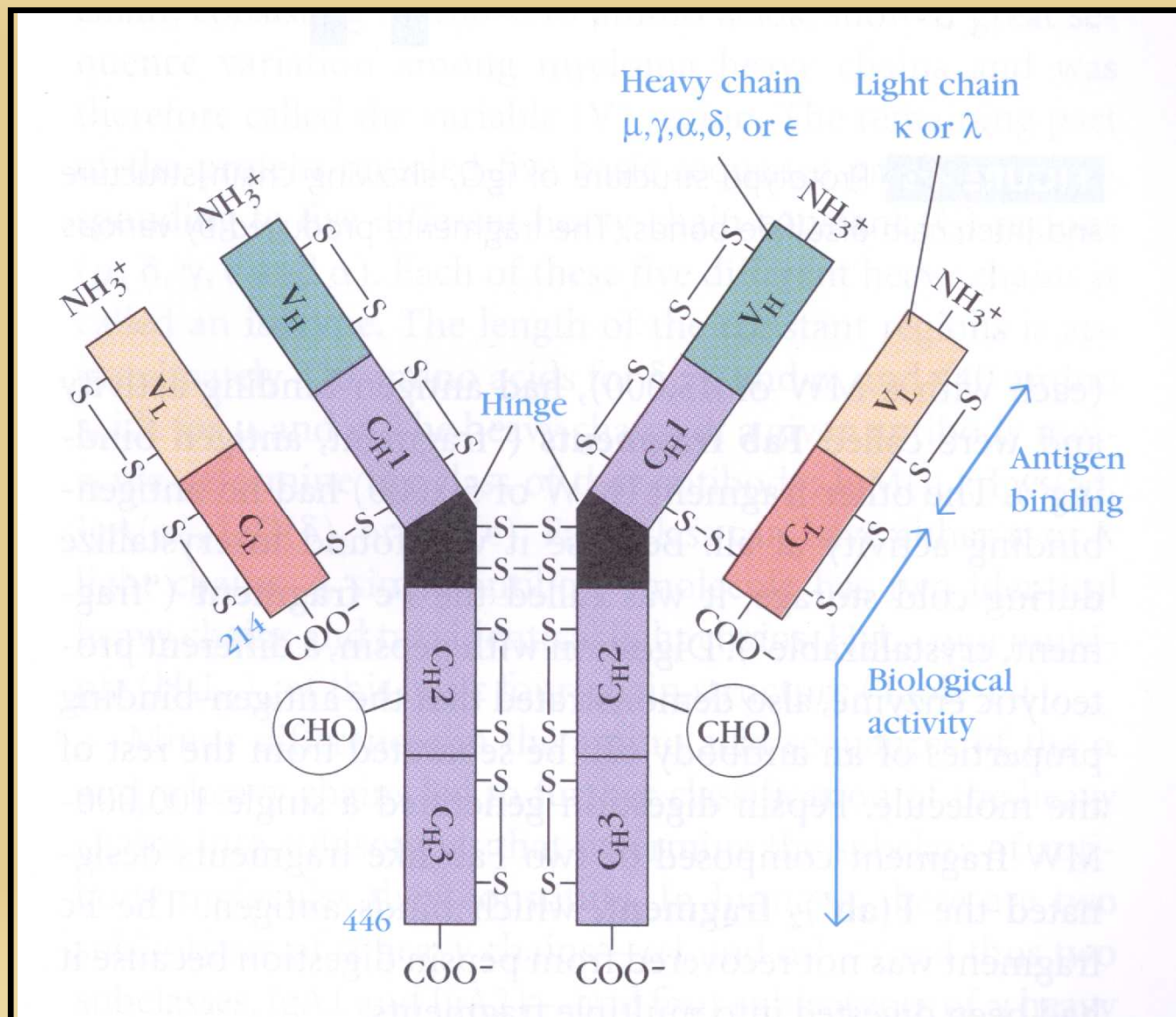
Imunitní systém



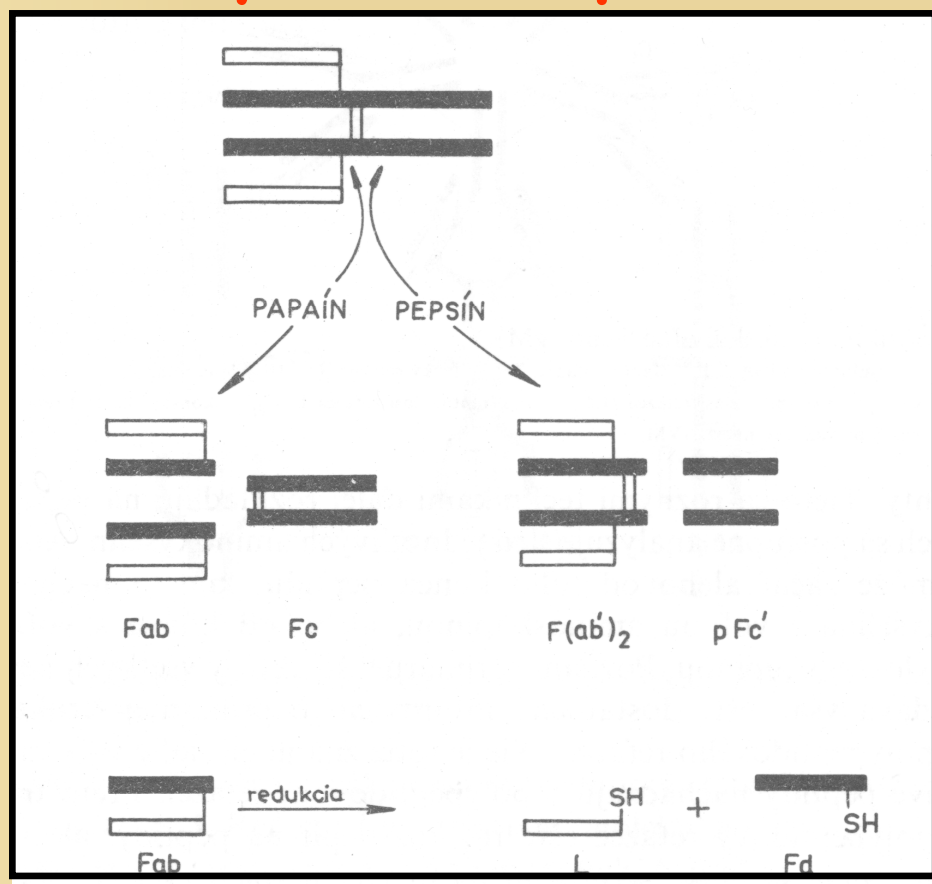
Produkce protilátek



Struktura protilátek



Enzymové štěpení:



Papain a trypsin štěpí Ig
na fragmenty:

✓ fragment vázající antigen

Fab

Fragment antigen binding

✓ krystalizovaný fragment

Fc

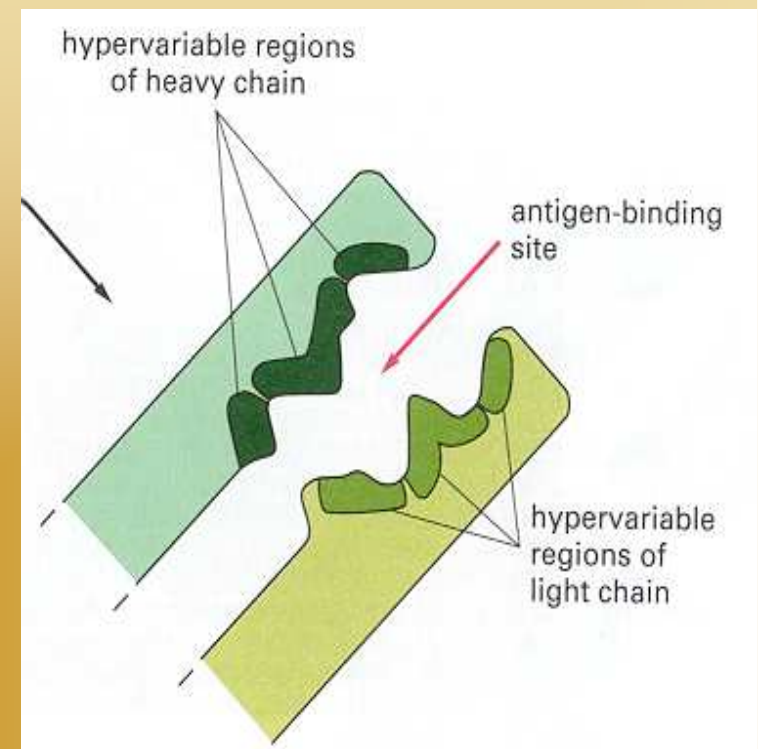
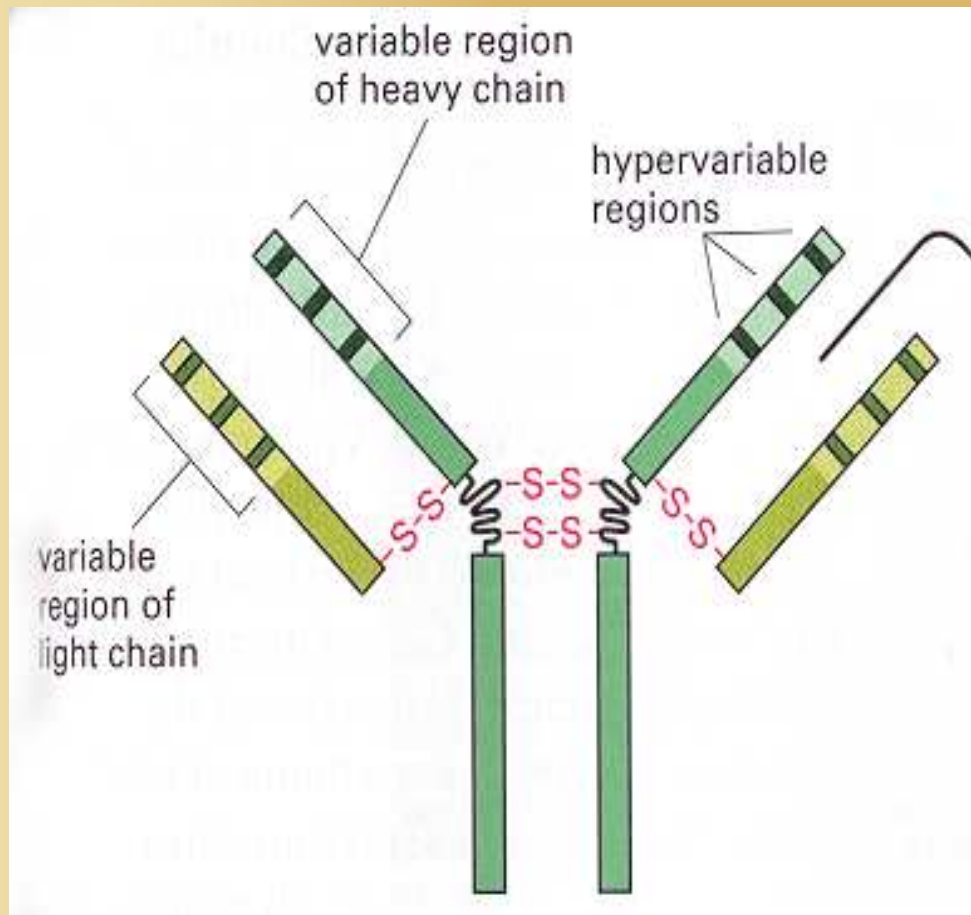
Fragment crystallizable

Pepsin štěpí na fragmenty:

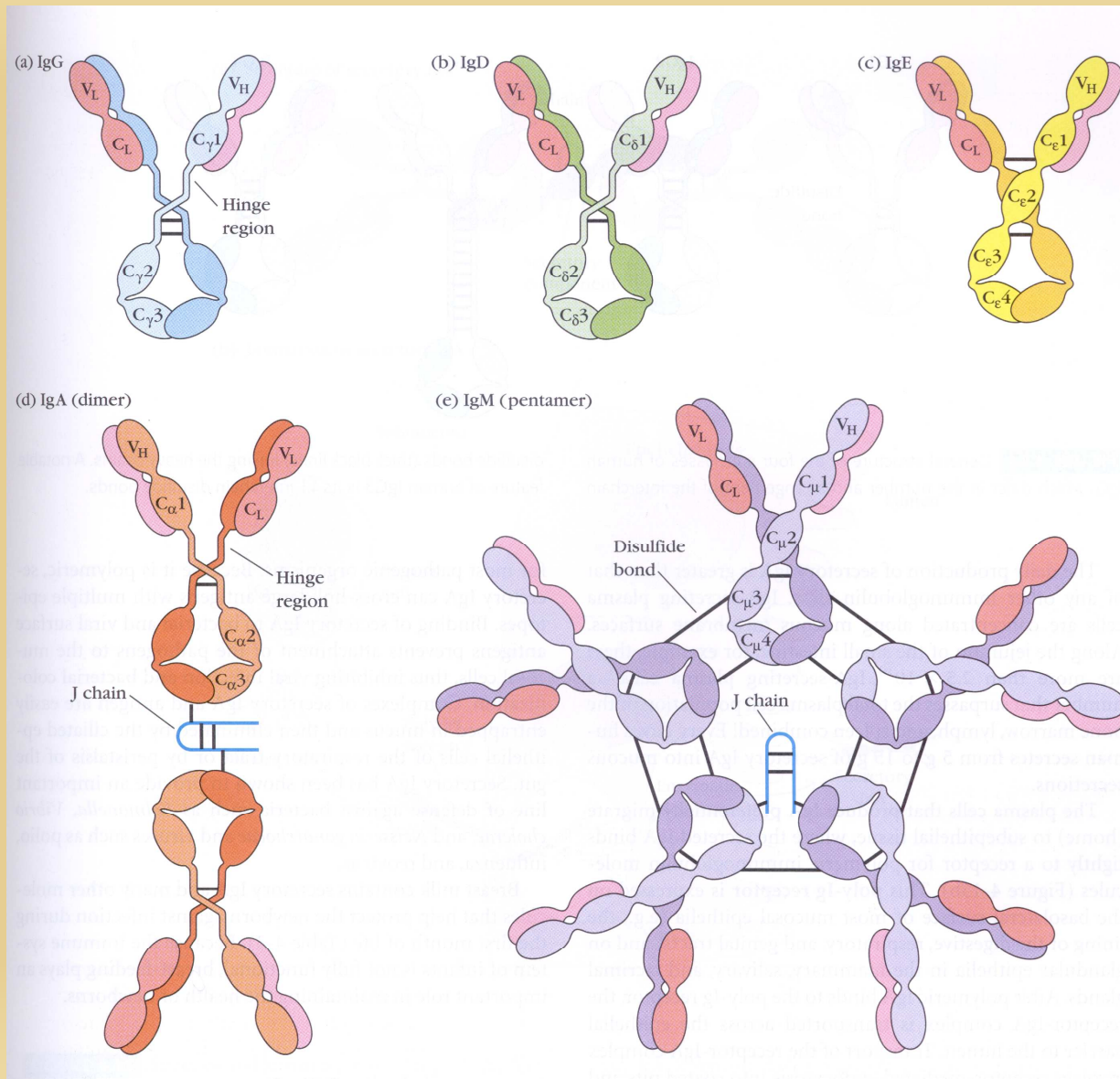
F(ab')₂ a **pFc'**

Enzymy hydrolyzují vazby v pantové oblasti H řetězce
v blízkosti disulfidických můstků, které spojují oba
řetězce H

Variabilní oblast



Typy imunoglobulinů

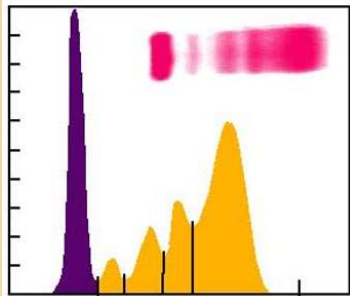


Monoklonální imunoglobuliny

Ig je produktem jedné linie buněk (jeden klon)
zvyšuje se jeden typ imunoglobulinu
abnormální protein **paraprotein**

odlišení: na elektroforegramu zřetelný oddělený pás v oblasti β - až γ -globulinů
polyklonální zesílí celý difúzní široký pás γ -globulinů nebo řada oddělených pásů v oblasti γ -globulinů

polyklonální hypergamaglobulinemie:



vzniká v důsledku chorobných stavů
(infekce, nemoci jater, přecitlivělost,
nádorové bujení, autoimunitní choroba)

IgG

nejvíce zastoupené u dospělých
v krevním řečišti (jsou dostatečně malé)
procházejí přes placentu z organismu matky do plodu
 M_r 150 kDa, v séru: 8-18 g/l

novorozenec: po porodu koncentrace klesá a roste
až s nástupem syntézy
3 měsíce - 3,5-4,0 g/l
1 rok - 7,0-8,0 g/l
roste do 16 let (pak už jako dospělí)

Funkce: neutralizovat toxiny
vázat antigeny (i mikroorganismy)
aktivovat složky komplementu

zvýšení polyklonálních IgG:

choroby jater

autoimunitní choroby

tuberkulóza

infekční mononukleóza

bakteriální infekce

maligní procesy, leukemie

IgA

M_r 160 kDa

sekretonické protilátky v slinách, slzách, potu, kolostru, a sekrety nosní sliznice zajišťují ochranu povrchů sliznic před mikrobi

IgA ve formě diméru (odolný vůči proteolytickým enzymům, stabilizován sekrečním proteinem)

V plazmě monomér

dospělí plazma: 0,9-4,5 g/l

novorozenec: 25% koncentrace, roste až do 16 let

IgA neprochází placentou

(v pupečnickové krvi méně jak 10 mg/l)

Zvýšená IgA:

- cirhóza
- chronická hepatitida
- revmatoidní artritida
- cystická fibróza
- aktinomykóza
- tuberkulóza

IgD a IgE

představují méně jak 1% Ig v séru
IgD se strukturou podobá IgG

Funkce IgD není zatím objasněna

IgE se pevně váže žírné buňky
jeho koncentrace roste při alergických reakcích

Klinické aplikace

Monoklonální gamopatie

zvýšená koncentrace monoklonálních Ig

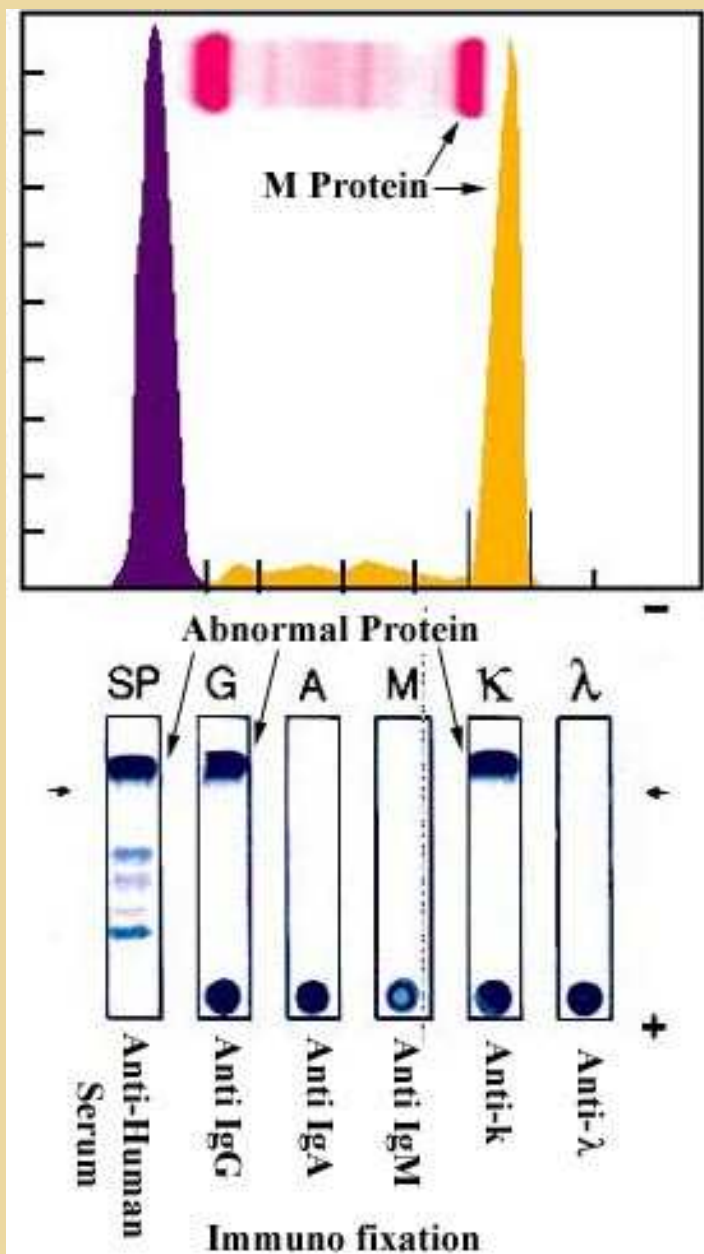
podle původu: benigní (nádor bez metastáz)
 maligní (zhoubný nádor
 s metastázami)

maligní gamopatie:

mnohočetný myelom

Waldenströмова makroglobulinemie

nemoci těžkého řetězce



Monoklonální gamopatie

Mnohočetný myelom

onemocnění klonů plazmatických buněk v kostní dřeni
postihuje osoby ve věku 50-60 let

nádory kostní dřeně produkující

IgG (60% případů).

IgA (20% případů)

IgD a IgE (méně jak 1% případů)

15% případů produkuje monoklonální lehké řetězce

elektroforegram: β - γ oblast ostrý pruh paraproteinu
(M vrchol)

klinické příznaky:

- poškození kostní tkáně (bolest, snížení mechanické pevnosti kostí)
- produkce Ig nebo fragmentů lehkých řetězců Bence-Jonesův protein
- funkce kostní dřeně je oslabena (tvorba červených a bílých krvinek a destiček je oslabena)

Laboratorní nálezy monoklonální gamopatie

1. zvýšené proteiny v plazmě (100-120 g/l)

(zvýšená γ -frakce, albumin snížen)

2. zvýšená proteinurie (Bence-Jonesův protein)

lehké řetězce vylučovány do moče, může poškodit ledviny, protože precipituje v tubulech

než dojde k poškození ledvin, není protein přítomný v séru

15% myelomů produkuje jen lehké řetězce:

elektroforéza proteinů v séru i moči

typizaci tříd Ig nebo lehkých řetězců lze provést:

imunofixací

imunoelektroforetický

dvojitou imunodifúzí (specifická antiséra)

nefelometricky nebo RID stanovit poměr $\kappa:\lambda$

3. hyperkalcemie

zvýšené vyplavování vápníku v krvi, způsobené zvýšením odbouráváním kostní dřeně

4. zvýšení hladiny kyseliny močové

způsobené intenzivnější proliferací a destrukcí buněk

5. zvýšená hladina kryoglobulinů

γ -globuliny, které precipitují v chladu a znovu se rozpouštějí při teplotě těla

mohou se spojovat z těžkým řetězcem

vyskytují se:

- mnohočetného myelomu

- makroglobulinemií

- leukemií

- reumatoidní artritidy

- řady zánětlivých onemocnění

Waldenströмова makroglobulinemie

je gamopatie týkající se produkce IgM

vyskytuje se více u mužů

u starších lidí (60-80 let)

porucha je mírnější s lepší prognózou přežívání

bolesti v kostech a poškození kostní tkáně

jsou pozorovány zřídka

příznaky: -ubývání na váze

-slabost

-hyperviskozita plazmy (velká M_r IgM)

-anemie

-kryoglobulinemie

-zvýšená krvácivost

Analýza proteinů v moči

poškození ledvin
vylučování některého abnormálního proteinu

Proteinurie: přítomnost bílkovin pozitivní
hlavní složka albumin

3 typy proteinurií:

- přechodná
- funkční
- patologická

Přechodná proteinurie:

febrilní (malé děti)
ortostatická (rychlý růst)
v 10-12 letech vymizí
v dospělosti

Funkční proteinurie:

tělesná nebo duševní
námaha

těhotenství

teplotní výkyvy

některé léky

Patologická proteinurie:

chronické záněty ledvin

nefrózy

horečnatá onemocnění

srdeční a cévní choroby

požití toxických látek

(sulfonamidy, opiáty, rtuť...)

Kvalitativní analýza

koncentrace proteinů abnormální
tj. větší 200-250 mg/l je kvalitativní důkaz
dostačující.

1. Diagnostickými proužky (proteinová chyby speciálního indikátoru)
citlivé na albumin, méně na globuliny
2. Kyselina sulfosalicylová bílkoviny se vysráží
což se projeví zákalem nebo sraženinou
3. Helerova zkouška bílkoviny se denaturují
konc.kyselinou dusičnou
4. Zkouška varem bílkoviny se v prostředí
octanového pufru varem denaturují (zákal)
5. Důkaz Bence-Jonesovy bílkoviny koagulace
v úzkém rozsahu teplot 40-70°C

Kvantitativní analýza

stanovení celkových proteinů v závislosti na čase
24 hodinový sběr moči

Metody stanovení:

turbidimetrické sulfosalicylová

trichloroctová

benzethonium chlorid

kolorimetrické Coomassie Brilliant blue

Pyrogallolová červeně

Biuretovo činidlo