

# Elektroforéza proteinů krevního séra

## ÚVOD

Elektroforéza proteinů krevního séra je laboratorní metoda běžně používaná v klinických laboratořích. Slouží jako **screeningová metoda**, tj. jako metoda „vyhledávání odchylek od normy“ ve **složení spektra proteinů** tělních tekutin (séra, moče, likvoru). Separace proteinů se provádí na vhodném nosiči, např. na agarózovém gelu.

Proteiny tvoří velkou skupinu látek přítomných v plazmě (séru), jejich celková koncentrace se pohybuje v rozmezí 60 - 80 g/L. Tyto proteiny plní řadu funkcí, nacházíme zde transportní proteiny, protilátky, inhibitory enzymů, srážecí faktory, aj. Pro vyšetření spektra krevních proteinů je nejvhodnějším sérum: na rozdíl od plazmy neobsahuje fibrinogen (faktor I koagulační kaskády), jehož fyziologická koncentrace je kolem 3 g/L. V případě vyšetření plazmy se fibrinogen nachází v místech, kde se za patologických situací mohou vyskytovat tzv. paraproteiny, proto je sérum na vyšetření vhodnější. Pomocí elektroforézy se veškeré proteiny séra **rozdělí do 6 frakcí**:

- albumin (ALB)
- alfa-1-globuliny ( $\alpha_1$ )
- alfa-2-globuliny ( $\alpha_2$ )
- beta-1-globuliny ( $\beta_1$ )
- beta-2-globuliny ( $\beta_2$ )
- gama-globuliny ( $\gamma$ )

**Během různých onemocnění se mění relativní zastoupení jednotlivých proteinů** v séru a tím i elektroferogram (výsledek elektroforézy), který tak může sloužit k orientačnímu zhodnocení zastoupení výše uvedených frakcí proteinů. Elektroforéza proteinů krevního séra se proto rutinně používá v diagnostice nemocí. V případě vyšetření moče nebo likvoru je třeba před analýzou tyto vzorky „zakoncentrovat“ vhodnou technikou, např. ultracentrifugací, neboť obsahují nižší koncentraci proteinů než sérum.

**Principem elektroforézy** je separace látek v elektrickém poli podle jejich relativní elektroforetické mobility (pohyblivosti). Pokud aplikujeme elektrické pole na nosič (v našem případě gel) obsahující nabitě částice (proteiny), dojde k pohybu negativně nabitých částic (aniontů) směrem k anodě (kladně nabitá elektroda) a k protisměrnému pohybu kladně nabitých částic (kationtů) směrem ke katodě (záporně nabitá elektroda). Po určitém čase se částice se shodnou nebo velmi podobnou elektroforetickou mobilitou nacházejí ve frakcích, které se pohybují stejnou rychlostí.

Používané **nosiče** můžeme rozdělit do dvou skupin: **1)** nosiče umožňující separaci pouze na základě náboje dělených částic (např. **acetylcelulóza, agarózový gel**); **2)** nosiče vykazující tzv. síťový efekt (např. **polyakrylamidový gel**): tyto nosiče jsou tvořeny póry o velikosti, která se blíží rozměrům separovaných molekul. Dělení proteinů se tak uskutečňuje nejen na základě velikosti náboje, ale i na základě velikosti molekuly. Výsledkem je více frakcí, než lze získat při separaci na nosičích z první skupiny (25 i více frakcí proteinů krevního séra při analýze na polyakrylamidovém gelu proti šesti frakcím získaným na agaróze). Separace se síťovým efektem tak poskytuje komplexnější obraz, který je však pro klinickou interpretaci obtížnější a v běžných klinických laboratořích se k dělení proteinů krevního séra nepoužívá. **Rychlost pohybu jednotlivých proteinů na agarózovém gelu závisí převážně na jejich náboji, který je dán hodnotou pH pufru používaného při analýze.**

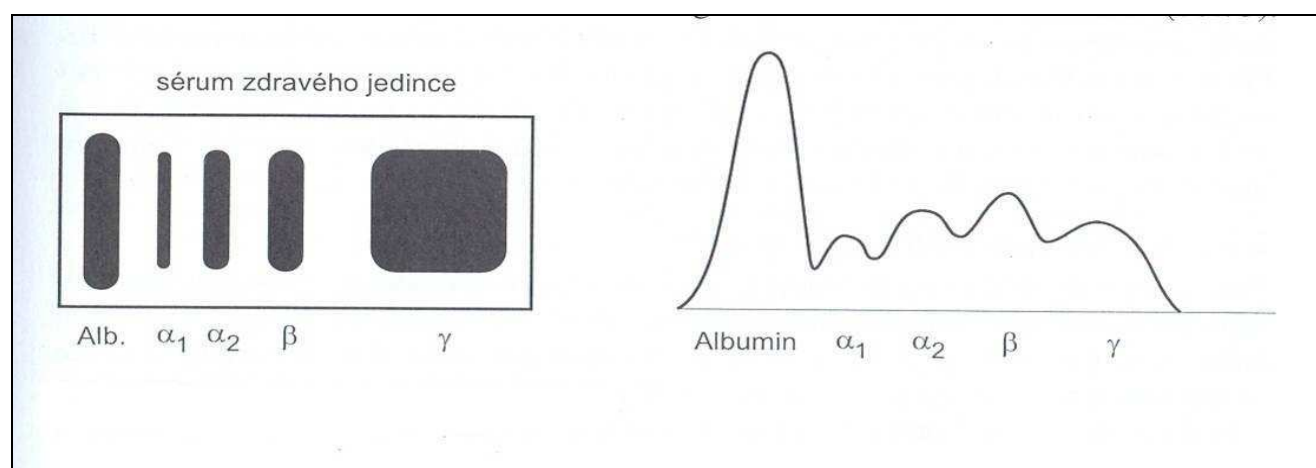
Separace proteinů se běžně provádí při **pH kolem 8,6**. Tato hodnota pH je vyšší než je hodnota izoelektrického bodu většiny sérových proteinů ( $pI = pH$ , při němž je v molekule shodný počet kladných a záporných nábojů). Proteiny jsou totiž amfoterní molekuly: v závislosti na pH prostředí mohou mít celkový náboj kladný nebo záporný, při hodnotě pH rovném jejich  $pI$  jsou bez náboje. Pufr používaný při elektroforetické separaci udržuje konstantní pH během analýzy a tím i konstantní náboj jednotlivých proteinů. Běžně používaný barbitolový (nebo Tris-barbitolový) pufr o alkalickém pH tak dává většině proteinů záporný náboj a proteiny vykazují anodickou pohyblivost. Rychlost pohybu závisí na celkovém náboji molekuly.

Při elektroforéze na agaróze získáme šest frakcí: **nejrychlejší je frakce albuminu**, za ním následují alfa-1 globuliny ( $\alpha_1$ ), alfa-2 globuliny ( $\alpha_2$ ), beta-1 globuliny ( $\beta_1$ ), beta-2 globuliny ( $\beta_2$ ) a gama globuliny ( $\gamma$ ). Většina těchto frakcí je tvořena mnoha různými proteiny, mající při  $pH = 8,6$  podobnou migrační rychlost. Nicméně v každé frakci převažuje jeden až dva proteiny jejichž změny koncentrace jsou charakteristické pro určité typy onemocnění a z elektroforézy jsou za patologických situací patrné.

V praxi je nezbytné používat techniku, která umožňuje rychlou separaci poskytující dobré rozlišení (úzké, ostré, samostatné frakce). Čím delší je doba dělení, tím více se mohou jednotlivé proteiny od sebe vzdálit, ale také více

dochází k radiální difúzi proteinů z oddělených frakcí do okolí a tím širší jsou „proužky“ frakcí na elektroferogramu. Zkrátit čas analýzy je možné zkrácením nosiče nebo zvýšením napětí. Čím vyšší je napětí, tím rychleji se nabitě částice pohybují, ale také současně dochází k většímu zahřívání (proteiny mohou denaturovat) vlivem vzrůstajícího proudu. Zahřívání lze snížit snížením iontové síly pufru. Jako optimální se nejčastěji používá nastavení konstantního napětí 90 až 100 V a analýza o délce kolem 30 minut.

Po rozdělení proteinů do frakcí je nutno proteiny v gelu fixovat (směsí kyselina / alkohol nebo horkým vzduchem). Fixace způsobí denaturaci proteinů. Ty pak mohou být obarveny vodným barvicím roztokem (např. amidočerní). Po obarvení je nutno odbarvit pozadí (gel), aby byly separované proteiny dobře vidět. Hodnocení elektroforézy se provádí buď vizuálně nebo pomocí denzitometru (skenování intenzity zbarvení jednotlivých frakcí, záznamem denzitometru je známá křivka obsahující pět až šest píků) - viz. obr. 1.



**Obr. 1:** Separované frakce proteinů krevního séra jsou znázorněny v levé části obrázku. V pravé části obrázku je uveden záznam z denzitometru.

*Poznámka: na agarózovém gelu je možno separovat beta-frakci proteinů na beta-1 a beta-2 globuliny. Na grafu z denzitometru bude pak celkem 6 píků.*

## Hlavní proteiny jednotlivých elektroforetických frakcí

Přehled uvádí proteiny jednotlivých frakcí i proteiny vyskytující se mezi uvedenými frakcemi, v tzv. interzónách. Za fyziologických podmínek je koncentrace těchto proteinů nízká, proto netvoří samostatné frakce (píky v elektroferogramu).

### Albumin

Albumin je syntetizován v játrech. Jeho koncentrace v séru je 35 - 50 g/L a biologický poločas činí 20 dní. Albumin je velmi významný transportní protein - váže a přenáší mnohé látky (mastné kyseliny, hormony, bilirubin, léky, kovy). Dále se podílí na udržení vodní rovnováhy mezi intravaskulárním a extravaskulárním prostorem (udržování onkotického tlaku krevní plazmy) a pufruje tělní tekutiny

- zvýšení: dehydratace
- snížení: poškození jater, chronická infekce, onemocnění ledvin, podvýživa, monoklonální gamapatie

### Interzóna albumin /alfa-1

**Alfa1-lipoproteiny** (= lipoproteiny o vysoké hustotě, HDL) se účastní transportu cholesterolu a vitamínů rozpustných v tucích.

- zvýšení: hyperlipidemie
- snížení: onemocnění jater

**Alfa1-fetoprotein** je onkofetální antigen syntetizovaný během vývoje zárodku

- zvýšení: karcinom jater

**Alfa1-kyselý glykoprotein (orozomukoid)** je glykoprotein syntetizovaný v játrech

- zvýšení: jako odpověď na různá akutní a chronická zánětlivá onemocnění
- snížení: při poruše proteosyntézy v játrech

### Alfa-1 globuliny

**Alfa1-antitrypsin** (= alfa-1-inhibitor proteáz; API) patří mezi inhibitory proteolytických enzymů (např. elastázy, kolagenázy) produkovaných leukocyty nebo bakteriemi. Řadí se mezi tzv. „proteiny (reaktanty) akutní fáze“.

- zvýšení: akutní zánětlivé reakce
- snížení: těžké hepatopatie, hypoproteinemie, vrozený defekt tvorby API

### Interzóna alfa-1 / alfa-2

**Alfa1-antichymotrypsin** je inhibitor proteolytických enzymů.

- *zvýšení: akutní zánětlivé reakce*

### Alfa-2 globuliny

**Alfa-2-makroglobulin** je také inhibitorem proteolytických enzymů. Jeho koncentrace jsou závislé na věku (vyšší v dětství).

- *zvýšení: nefrotický syndrom*

- *snížení: reumatoidní artritida, myelom, akutní pankreatitidy*

**Haptoglobiny** tvoří skupinu proteinů vázajících volný hemoglobin (Hb) za tvorby hemoglobin-haptoglobinového komplexu, který je rychle z krve vychytáván buňkami retikuloendoteliálního systému, kde je metabolizován; Hb-haptoglobinový komplex tak zabraňuje ztrátám železa močí.

- *zvýšení: akutní a chronické záněty*

- *snížení: onemocnění jater, hemolytická anemie*

### Beta-1 globuliny

**Transferin** je hlavní transportní protein pro železo; přenáší železo ze střeva a mezi místy syntézy a odbourávání hemoglobinu.

- *zvýšení: anemie způsobené nedostatkem železa*

- *snížení: onemocnění jater, podvýživa, zánětlivá onemocnění, malignity*

### Interzóna beta-1 / beta-2

**Beta-lipoproteiny** (= lipoproteiny o nízké hustotě, LDL) se podílí na transportu cholesterolu.

- *zvýšení: hyperlipidemie*

- *snížení: hladovění*

### Beta-2 globuliny

**C3 složka komplementu** je jeden z proteinů systému komplementu, podílejícího se na zánětlivé reakci.

- *zvýšení: akutní zátěž organismu*

- *snížení: autoimunitní onemocnění (tvorba imunokomplexů)*

### Gamaglobuliny

jsou imunoglobuliny (protilátky) syntetizované plazmatickými buňkami. Kvantitativně je nejvýznamnější IgG.

Monoklonální imunoglobuliny se mohou nacházet v různých vzdálenostech od startu: mezi alfa-2 a gama frakcí.

Jedná se o patologické proteiny (**paraproteiny**), které jsou syntetizovány B-buněčným lymfocytárním klonem při nádorových onemocněních (např. mnohočetný myelom, leukémie).

- *zvýšení: polyklonální (nebo monoklonální) gamaglobulinemie, jaterní onemocnění, chronické infekce*

- *snížení: fyziologicky u malých dětí, hypoimunitní syndrom*

### **Normální hodnoty hlavních elektroforetických frakcí:**

<b>frakce</b>	<b>%</b>
albumin	56 - 66
alfa-1 globuliny	2 - 3
alfa-2 globuliny	8 - 12
beta-1 globuliny	7 - 10
beta-2 globuliny	3 - 6
gama globuliny	10 - 18

### **Využití elektroforézy v klinické praxi**

Elektroforéza proteinů krevního séra je jednoduchá technika užitečná ke stanovení diagnózy monoklonálních gamapatií, jaterní cirhózy, renálního selhání, hypogamaglobulinemie, aj.

„**Typ akutního zánětu (odpovědi akutní fáze)**“ se vyznačuje poklesem albuminu a vzrůstem alfa-1 a alfa-2 frakcí (tzv. proteiny akutní fáze). Vyskytuje se při zátěži nebo zánětech způsobených infekcí, zraněním nebo chirurgickým zákrokem.

„**Typ chronického zánětu**“ je spojen s infekcí a vyznačuje se vzrůstem gama globulinové frakce (imunoglobuliny); zvýšena je i frakce alfa-2 globulínů, frakce albuminu bývá snížena.

„**Hypogamaglobulinemie**“ se vyznačuje extrémně nízkou intenzitou gama frakce; vyskytuje se při imunosupresivním onemocnění.

„**Monoklonální hyperimmunoglobulinemie**“ je způsobená monoklonální syntézou určitého imunoglobulinu: mezi fyziologicky se vyskytujícími frakcemi proteinů nalézáme ostrý proužek daného gama globulinu.

„**Jaterní cirrhóza**“ se vyznačuje širokým zvýšením gama globulinů s poklesem albuminu (tzv. polyklonální gamapatie).

„**Nefrotický syndrom**“ (= soubor příznaků provázejících některá onemocnění ledvin): v elektroforéze se prezentuje selektivním snížením frakcí obsahujících malé proteiny (albumin, 65 kDa) a gamaglobulinů a relativním zvýšením alfa-2 frakce, která obsahuje vysokomolekulární protein alfa-2-makroglobulin (725 kDa)

#### **Literatura:**

- Engliš, M.: *Novinky v medicíně 55: Interpretace elektroforézy plazmatických bílkovin v agarózovém gelu*, Avicenum, Praha, 1992 ISBN 80-201-0170-5
- Tichý, M.: *Laboratorní analýza monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů)*, 1997 ISBN 80-902022-1-7
- *Manuál: Elektroforéza bílkovin - SEBIA K20*

#### **POŽADOVANÉ ZNALOSTI**

Princip elektroforézy, využití elektroforézy v medicíně, proteiny krevní plazmy - rozdělení, funkce, koncentrace, rozdíl mezi krevní plazmou a sérem

*Poslední aktualizace: 20. 4 .2007*