

## Laboratorní diagnostika zánětlivých procesů: Proteiny akutní fáze a kapilární elektroforéza

### Reakce akutní fáze

U zánětu reaguje tělo nespecifickou imunitní odpovědí, tak zvanou reakcí akutní fáze (APR).

Cytokiny (např. interleukin-1, interleukin-6, interferon...) slouží jako poslové.

Jsou uvolňovány endoteliálními buňkami, fibroblasty, makrofágy a granulocyty, aby se dostali krevním řečištěm do jater.

Při infekci, poranění tkání, maligních procesech nebo při poruchách imunitního systému stimulují tyto imunokompetentní buňky společně s kortizolem následně v orgánech produkci asi dvaceti různých proteinů akutní fáze (APPs).

Lokální působení APR ohraničí infekci a eliminuje pomocí makrofágů toxiny/ odpadní produkty.

Systémové působení by mělo chránit organismus proti endotoxinům a vyvolávat imunitní odpověď. Také se zvýší teplota a dochází k leukocytóze.

Rozlišují se pozitivní APPs a negativní APPs.

U pozitivních APPs stoupá koncentrace v rámci zánětlivého onemocnění o více než 25%, u negativních APPs se naopak snižuje.

### C- reaktivní protein

Důležitý marker pro detekci zánětu v akutní fázi je C- reaktivní protein (CRP). Jedná se o glykoprotein, který díky své struktuře je schopen navázat mnohé patogenní bakterie nebo intracelulární antigeny nebo rozpoznat cizí molekuly nebo pomocí vzniklého spojení způsobit

strukturální změnu molekuly. To vede k aktivaci komplementu, stimulaci fagocytů a produkci protizánětlivých cytokinů.

Proto slouží měření koncentrace CRP k rozpoznání mikrobiálních infekcí, akutního nekrotického poškození tkání způsobeného traumatem, operacemi nebo autoimunitním onemocněním, které je spojeno se zánětem, například revmatoidní artritida nebo imunovaskulitida. Nejpotentnějším stimulem jsou bakteriální infekce.

U akutních infekcí nebo u traumat začíná produkce CRP v plazmě po 6hodinách, dosahuje maxima po 48hodinách, snižuje se s poločasem rozpadu opět po 48hodinách.

Míra poškození tkání nebo zánětu se shoduje se zvýšením CRP. Po úspěšné terapii rychle klesá.

Proto je vynikajícím markrem pro úspěšné cílené nasazení antibiotik u psů.

Mimoto reaguje CRT výrazně dříve než leukocyty, které potřebují tři dny, než dojde k vzestupu.

U koček se zdá, že CRP u zánětlivé reakce příliš nereaguje, pro diagnostiku zánětu je tedy nevhodný.

### Serový amyloid A

SAA je protein akutní fáze s nízkou molekulární hmotností, který je v plazmě navázán na high density lipoprotein (HDL), prekurzor pro amyloidový protein A, hlavní protein a-amyliodu a je rozhodující pro vznik amyloidózy a podílí se na dalších chronických zánětech.

Po stimulaci interleukinem 6 se syntetizuje v játrech v rámci proteinů akutní fáze.

Diagnosticky se serový amyloid A používá k odlišení virových a bakteriálních infekcí a také k nemikrobiálním asociovaných low grade zánětům.

SAA stoupá po 8 hodinách po začátku proteinů akutní fáze, ale překročí horní referenční hranici dříve než CRP. Nicméně je častější zvýšení u lehčích infekcí, tak i v případě mnoha virových infekcí než CRP.

Reaguje citlivěji u low grade zánětů a slouží k odlišení virových zánětů od bakteriálních.

Diagnosticky se používá u koní, psů, koček a skotu.

### **Haptoglobin**

Haptoglobin je a- glykoprotein a tvoří se v játrech, ale také v plicích, tukové tkáni, slezině a ledvinách. Tento protein akutní fáze se váže na volný hemoglobin (fHb) v plazmě, který je toxický a prozánětlivý. Fhb obsahuje železo, které, pokud se vyskytne nevázaně, působí škodlivě tvorbou kyslíkových radikálů. U intravasální hemolýzy zabraňuje Hp renální ztrátě železa navázáním na fHb, mimoto chrání Hp buňky před oxidativním poškozením. Hp má inhibiční efekt na chemotaxi granulocytů, fagocytozu a baktericidní účinek. Navíc se zdá, že inhibuje proliferaci mastocytů.

Diagnosticky vypovídající hodnotu mají snížené a zvýšené koncentrace Hp.

Snížené hodnoty jsou indikátorem pro hemolyzu in vivo, zvýšené koncentrace se vyskytují v rámci proteinů akutní fáze, ve spojení se záněty, infekcemi a autoimunopatiemi.

Slouží k další diagnostice u skotu.

### **Elektroforéza sérových proteinů**

Dalším důležitým kritériem k diagnóze a k posouzení průběhu akutního a chronického

zánětu jsou elektroforézy. Slouží mimo jiné k detekci monoklonálních gammopatií a syndromů ze ztrát proteinů.

K oddělení globulinů dochází v alkalickém pH na základě náboje, isoelektrického bodu a molekulární hmotnosti proteinu.

### **Kapilární elektroforéza**

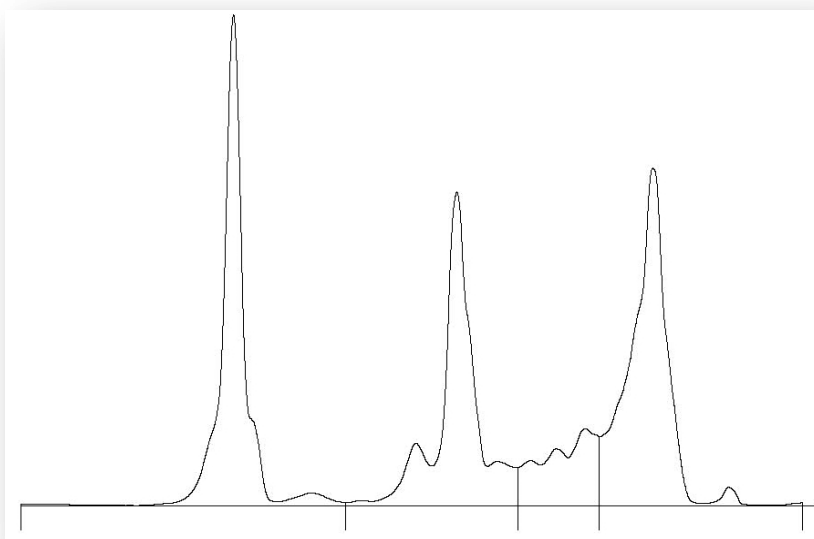
U elektroforézy dochází k oddělení nabitých proteinů v kapalině, v základním mediu (pH 9-10), v úzkém póru kapiláry. Jedná se o kapiláru s vnitřním průměrem 50-200  $\mu\text{m}$ , na kterou je přivedeno napětí cca 7000 voltů. Separace probíhá ve směru katody na základě náboje a pohyblivosti, takže v ideálním případě vzniknou čisté zóny s komponentou. Neutrální molekuly cestují také ke katodě, ale neoddělí se.

Frakce proteinů se kvantifikují na katodě pomocí UV měření. Vzniká křivka místa zániku 8 frakcí:

Albumin,  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$ - globulin,  $\beta_1$  a  $\beta_2$  globulin (eventuálně  $\beta$  total globulin),  $\gamma$  globulin. Vzhledem k nízkému poměru objem/povrch je proces separace velmi efektivní a dobře automatizovatelný proces měření.

Elektroforézy slouží k přiřazení nemocí nebo skupiny onemocnění pomocí modelových elektroferogramů (křivka elektroforézy). Mimoto je možná výpověď o zánětlivé aktivitě onemocnění, a nakonec je schématické znázornění užitečné při posouzení průběhu.

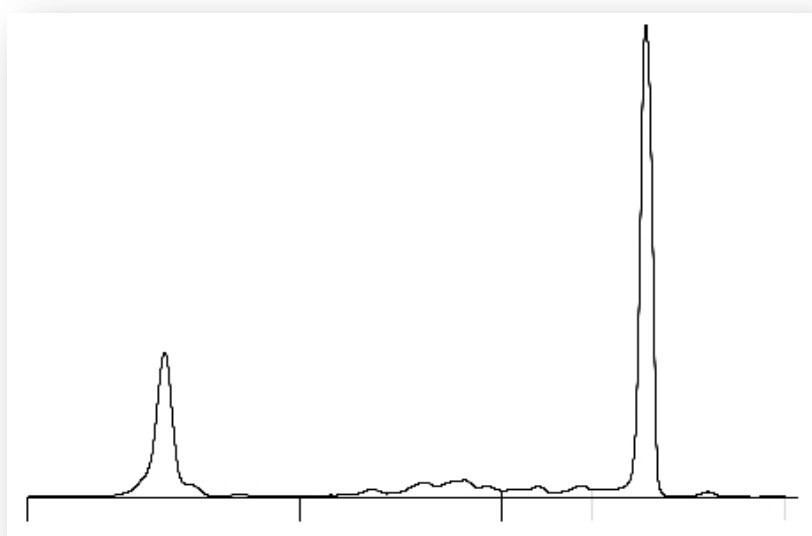
<b>FRAKCE ALBUMINU</b>	Prealbumin	
	Albumin	
	a-Lipoprotein (HDL)	
<b>a-GLOBULIN</b>	alpha-1:	kyselý a-Glykoprotein
		a-Antitrypsin
	alpha-2:	a-Makroglobulin
		Haptoglobin
<b>β-GLOBULIN</b>	beta-1:	Hemopexin
		Transferrin
	beta-2:	C4-Komplement
		CRP
		C3-Komplement
<b>g-GLOBULIN</b>	Immunoglobuliny	



**Pes s akutním zánětem (globulin) a produkce imunoglobulinů (beta, gama globulin)**

Frakce	%	g/l	Pes:
<b>Albumin</b>	28,7	41,33	Alb: 47 - 59 %
<b>Alpha</b>	27,5	39,60	a-Glob: 9 - 15 %

<b>Beta</b>	10,7	15,41	b-Glob: 14 - 24 %
<b>Gamma</b>	33,1	47,66	g-Glob: 8 - 18 %
<b>Alb/Glob = 0,40</b>			
<b>celková bílkovina: 144 g/l</b>			



**Kočka s monoklonální gamapatií (gamma globulin)**

Frakce	%	g/l	Kočka:
<b>Albumin</b>	27,3	44,09	Alb: 45 - 60 %
<b>Alpha</b>	11,8	19,06	a-Glob: 8 - 15 %
<b>Beta</b>	5,5	8,88	b-Glob: 10 - 20 %
<b>Gamma</b>	55,4	89,47	g-Glob: 10 - 28 %
<b>Alb/Glob = 0,38</b>			
<b>celková bílkovina: 161,5 g/l</b>			