5. Тема занятия: Белки плазмы крови, функции. Синтез белков в печени, РЭС, клетках иммунной системы. Определение содержания общего белка в крови и моче. Характеристика белковых фракций. Белки острой фазы воспаления. Типы протеинограмм.

Белки представляют собой высокомолекулярные полипептиды, состоящие из более 20 видов α-аминокислот. Различают простые и сложные белки. Простые белки содержат только аминокислоты, а сложные – ещё и неаминокислотные компоненты: гем, производные витаминов, липиды, или углеводы и др.

Поскольку при многих заболеваниях наблюдают изменения в содержании отдельных белков, исследование их концентрации в крови широко используют в диагностических целях. В биологических жидкостях определяют общий белок, фракции белков и индивидуальные белки.

Цель занятия: Знать белковый состав плазмы крови, методы определения общего белка в биологических жидкостях, научиться интерпретировать протеинограммы при различных патологических процессах.

Знать:

- белки плазмы крови и их функцию;

- синтез белков в печени, РЭС, клетках иммунной системы;

- методы определения содержания общего белка в крови и моче;

- белковые фракции плазмы крови и их характеристики;

- белки острой фазы воспаления, функции, критерии диагностики;

- нормальную протеинограмму, а также при различных патологических состояниях (при остром и хроническом воспалении, нарушении функций почечного фильтра, злокачественных новообразованиях, гепатитах, циррозах печени, механической желтухе).

Уметь:

- интерпретировать полученные результаты протеинограмм при различных патологических состояниях организма человека;

- оценить результат лечения воспалительного процесса по данным показателей белков острой фазы.

Плазма крови человека в норме содержит более 100 видов белков. Примерно 90% всего белка крови составляют **альбумины**, **иммуноглобулины**, **липопротеины**, **фибриноген**, **трансферрин**; другие белки присутствуют в плазме в небольших количествах.

Функции белков плазмы крови:

- поддерживают постоянство коллоидно-осмотического давления крови;
- определяют вязкость крови и сохраняют устойчивость эритроцитов и лейкоцитов в кровотоке, обеспечивают нормальный кровоток в капиллярах (реологические свойства крови);
- белковая буферная система участвует в регуляции кислотно-щелочного состояния;

• специализированные белки связывают и транспортируют углеводы, липиды, гормоны, лекарства, витамины, токсичные вещества;

• удерживают в связанном состоянии и транспортируют катионы кальция, магния, железа, меди и другие ионы, препятствуя их потере с мочой;

• специализированные белки участвуют в свертывании крови (фибриноген, протромбин, антигемофильный глобулин и др.);

• иммуноглобулины, факторы системы комплемента, трансферрин и пропердин (предупреждая инфекционный процесс и сохраняя резистентность организма) выполняют защитную функцию;

• являются резервом аминокислот.

Синтез белков плазмы крови осуществляют:

• печень – полностью синтезирует фибриноген и альбумины крови, большую часть α- и β-глобулинов;

• клетки ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) костного мозга и лимфатических узлов – часть β-глобулинов и γ-глобулины (иммуноглобулины).

Состояние белкового обмена в организме оценивают, определяя содержание общего белка, белковых фракций и индивидуальных белков плазмы крови.

Методы определения общего белка

Среди методов определения концентрации общего белка можно выделить несколько основных групп, основанных на различных принципах:

- азотометрические;
- гравиметрические (весовые);
- «преципитационные»;
- спектрофотометрические;
- рефрактометрические;
- колориметрические;
- нефелометрические;
- поляриметрические.

Азотометрические методы

Азотометрические методы определения общего белка сыворотки основаны на определении количества белкового азота, образующегося при разрушении аминокислот, входящих в состав белков. Впервые метод был предложен Кьельдалем в 1883 году. В методе Кьельдаля, в настоящее время представляющем в целом исторический интерес, азот, содержащийся в составе белков, окисляют до иона аммония и его количество определяют титрованием точным раствором соляной кислоты. Кроме того, ион аммония может быть определен реактивом Несслера, манометрическим методом после превращения иона аммония в молекулярный азот под действием гипобромита или с помощью оптического теста Варбурга при участии фермента глутаматдегидрогеназы. Исходя из того, что белки из биологических объектов содержат в среднем 16% азота, полученное в результате анализа количество азота умножают на коэффициент 6,25. Для отдельных фракций белка в сыворотке или плазме величина фактора колеблется в диапазоне от 5,69 до 6,52.

Недостатком азотометрических методов является длительность и сложность процедуры, даже при том, что аммиак, образующийся в реакции, можно определять ферментативным методом. Автоматизация позволяет использовать этот метод в ряде случаев в качестве метода сравнения из-за его достаточной точности и воспроизводимости.

Гравиметрические методы

Гравиметрические (весовые) методы определения общего белка сыворотки основаны на высушивании белков до постоянной массы и взвешивании на аналитических весах. Методы трудоемки и в настоящее время практически не используются для определения общего белка сыворотки. Гравиметрический метод продолжает использоваться в некоторых лабораториях для определения фибриногена в плазме крови.

«Преципитационные» методы

«Преципитационные» методы определения общего белка основаны на снижении растворимости белков и образовании суспензии взвешенных частиц под воздействием различных агентов. О содержании белка в исследуемой пробе судят либо по интенсивности светорассеяния (нефелометрический метод анализа), определяемого числом светорассеивающих частиц, либо по ослаблению светового потока образовавшейся суспензией (турбидиметрический метод анализа).

Результаты данной группы методов зависят от множества факторов: скорости смешивания реактивов, температуры реакционной смеси, значения pH среды, присутствия посторонних соединений, способов фотометрии. Тщательное соблюдение условий реакции способствует образованию стабильной суспензии с постоянным размером взвешенных частиц и получению воспроизводимых результатов. «Преципитационные» методы для определения белка в сыворотке крови не получили признания и нашли применение при определении белка в моче, спинномозговой жидкости и многих индивидуальных белков с использованием специфических антител.

Спектрофотометрические методы

Спектрофотометрические методы заключаются в измерении степени светопоглощения в ультрафиолетовой области при двух длинах волн с дальнейшим расчетом по специальным формулам (230 и 260 нм, 280 и 260 нм, 235 и 280 нм, 215 и 225 нм, 280 и 205 нм).

Рефрактометрические методы

Рефрактометрические методы определения общего белка сыворотки основаны на способности растворов белка к преломлению светового потока. При температуре 17,5°C показатель преломления воды равен 1,3332, при той же температуре показатель преломления сыворотки колеблется в пределах 1,3480–1,3505. В связи с тем, что концентрация электролитов и небелковых органических соединений, влияющих на ее преломляющую способность, невелика и достаточно постоянна в сыворотке здорового человека, величина показателя преломления сыворотки крови зависит в первую очередь от содержания в ней белков. Калибровку прибора проводят сывороткой с известной концентрацией белка. Простота делает рефрактометрию удобным методом для определения содержания общего белка в сыворотке крови, хотя при ряде заболеваний, в частности, при сахарном диабете, хронической почечной недостаточности его использование может приводить к существенной ошибке.

Колориметрические (фотометрические) методы

Колориметрические методы определения общего белка основаны на цветных реакциях белков с хромоген-образующими реактивами или на неспецифическом связывании красителя.

Среди колориметрических методов определения концентрации общего белка сыворотки наиболее распространенным считается биуретовый метод, основанный на так называемой «цветной биуретовой реакции», в ходе которой белки реагируют в щелочной среде с сульфатом меди с образованием соединений, окрашенных в фиолетовый цвет, интенсивность окраски зависит от концентрации общего белка в сыворотке. Биуретовый метод определения общего белка в сыворотке крови был утвержден в качестве унифицированного в 1972 г.

Колориметрические методы определения общего белка сыворотки крови достаточно просты и относительно дешевы. К недостатку метода относится интерферирующее действие некоторых веществ (в том числе лекарств).

Нормальное количество общего белка в сыворотке крови колеблется от 60 до 80 г/л. Плазма содержит на 2–4 г/л больше за счет фибриногена, который отсутствует в сыворотке.

Пониженная концентрация белков в крови называется **гипопротеинемия,** повышенная – **гиперпротеинемия.**

Причины гипопротеинемии:

- недостаточное введение белка (длительное голодание, безбелковая диета);

- повышенная потеря белка (при различных заболеваниях почек, кровопотерях, ожогах, новообразованиях, асцитах, сахарном диабете);

- нарушение образования белка в организме: при недостаточности функции печени (гепатиты, циррозы, токсические повреждения), длительном лечении кортикостероидами, нарушении всасывания (при энтеритах, энтероколитах, панкреатитах).

Гиперпротеинемия наблюдается при:

- дегидратации в результате потери части внутрисосудистой жидкости (при тяжелых травмах, обширных ожогах, холере);

- появлении в крови парапротеинов – патологических белков, вырабатываемых в большом количестве при миеломной болезни, при болезни Вальденстрема).

С помощью электрофореза на бумаге **выделяют 5 стандартных фракций**: альбумины и четыре фракции глобулинов (α1-глобулины, α2-глобулины, β-глобулины, γ-глобулины).

Принцип электрофореза белков заключается в следующем:

Ацетатцеллюлозная пленка, гель, специальная бумага (носитель) помещается на рамку, при этом противоположные края носителя свисают в кюветы с буферным раствором. На линию старта наносится сыворотка крови. Метод заключается в движении буферного раствора по поверхности носителя под влиянием электрического поля. Двигаясь, буферный раствор захватывает молекулы белков сыворотки. Молекулы с наибольшим отрицательным зарядом и наименьшим размером, т.е. **альбумины**, двигаются быстрее остальных. Наиболее крупные и нейтральные (**γ-глобулины**) оказываются последними.

На ход электрофореза влияет **подвижность** разделяемых веществ, находящаяся в зависимости от следующих факторов: **заряда** (обычно зависит от pH), **размера** и **формы** молекул веществ, **электрического поля, буфера и носителя (**учитывается его гидрофильность и адсорбционная способность) (рис.4).

Рис.4. Общая схема электрофореза

Количество выделяемых фракций определяется условиями проведения электрофореза. При электрофорезе на бумаге и пленках ацетата целлюлозы в клинико-диагностических лабораториях выделяют 5 стандартных фракций, в то время как в полиакриламидном геле – до 20 и более фракций (рис.5, табл.8).

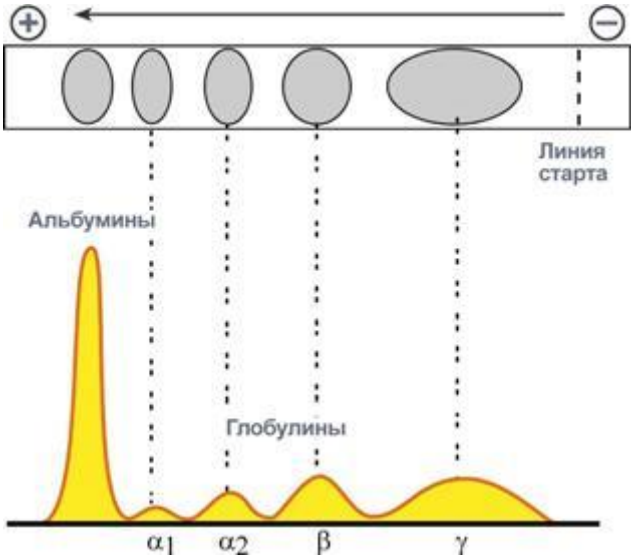

Рис.5. Электрофореграмма (вверху) и графический результат ее обработки (внизу)

Таблица 8

Нормальная протеинограмма

Альбумины	52-65 %	35-50 г/л
α_1-Глобулины	2,5-5 %	1-3 г/л
α_2-Глобулины	7-13 %	6-10 г/л
β-Глобулины	8-14 %	7-11 г/л
γ-Глобулины	12-22 %	8-16 г/л

При использовании более совершенных методов (радиальная иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез и других) в составе глобулиновых фракций выявляются многочисленные индивидуальные белки.

На вид протеинограммы оказывают влияние только те белки, концентрация которых достаточно высока.

Альбуминовая фракция включает в себя *альбумин* (основная часть) и *преальбумин* – ее доля составляет более 50% от всех белков плазмы.

Глобулиновые фракции более разнородны.

Фракция альфа1-глобулина включает в себя следующие белки:

- α1-антитрипсин (основной компонент этой фракции) – ингибитор многих протеолитических ферментов – трипсина, химотрипсина, плазмина и.т.д.

- α1-липопротеин (ЛПВП) – участвует в транспорте липидов.

- α1-кислый гликопротеин (орозомукоид). Он повышается в ответ на различные острые и хронические воспалительные стимулы. Используется для индикации острофазового ответа.

Фракция альфа2-глобулинов включает:

- α2-макроглобулин (основной компонент фракции) – является регулятором иммунной системы и участвует в развитии инфекционных и воспалительных реакций.

- Гаптоглобин – это гликопротеин, который образует комплекс с гемоглобином, высвобождающимся из эритроцитов при внутрисосудистом гемолизе, утилизирующийся затем клетками ретикулоэндотелиальной системы, что необходимо для предотвращения потерь железа и повреждения почек гемоглобином.

- Церулоплазмин – специфически связывает ионы меди, а также является оксидазой аскорбиновой кислоты, адреналина, диоксифенилаланина (ДОФА), способен инактивировать свободные радикалы. При низком содержании церулоплазина (болезнь Вильсона-Коновалова) происходит накопление меди в печени (вызывая цирроз) и в базальных ганглиях мозга (причина хореоатетоза). Увеличение содержания церулоплазмина специфично для меланомы и шизофрении.

- Аполипопротеин В – участвуют в транспорте липидов.

Фракция бета-глобулинов включает:

- Трансферрин – белок, который осуществляет транспорт железа, тем самым, предотвращая накопление ионов железа в тканях и потерю его с мочой.

- Гемопексин – связывает гемм и предотвращает его выведение почками.

- Компоненты комплемента – участвуют в реакциях иммунитета.

- β-липопротеин – участвует в транспорте холестерина и фосфолипидов.

Фракция гамма-глобулинов состоит из иммуноглобулинов, (IgG, IgA, IgM, IgE), функционально представляющих собой антитела, обеспечивающие гуморальную иммунную защиту организма от инфекций и чужеродных веществ.

Диспротеинемия – нарушение нормального соотношения фракций белков плазмы, встречается при многих заболеваниях, значительно чаще, чем изменение общего количества белка. Диспротеинемии обладают большой динамикой, связанной с фазой развития процесса, его длительностью и интенсивностью проводимых лечебных мероприятий.

Типы протеинограмм

В клинической практике для сыворотки выделяют 10 типов электрофореграмм (**протеинограмм**), соответствующих различным патологическим состояниям (табл. 9).

Таблица 9

Типы протеинограмм

Тип протеинограммы	Альбумины	Фракции глобулинов				Примеры заболеваний
		α1	α2	β	Г	
Острые воспаления	↓↓	↑	↑	—	↑	Начальные стадии пневмоний, острые полиартриты, экссудативный туберкулез легких, острые инфекционные заболевания, сепсис, инфаркт миокарда
Хронические воспаления	↓	—	↑↑	—	↑↑	Поздние стадии пневмоний, хронический туберкулез легких, хронический эндокардит, холецистит, цистит и пиелит
Нарушения почечного фильтра	↓↓	—	↑	↑	↓	Генуинный, липоидный или амилоидный нефроз, нефрит, нефросклероз, токсикоз беременности, терминальные стадии туберкулеза легких, кахексии
Злокачествен-ные опухоли	↓↓	↑↑	↑↑	↑↑ ↑	↑↑	Метастатические новообразования с различной локализацией первичной опухоли
Гепатиты	↓	—	—	↑	↑↑	Последствия токсического повреждения печени, гепатиты, гемолитические процессы, лейкемии, злокачественные новообразования кроветворного и лимфатического аппарата, некоторые формы полиартрита, дерматозы
Некроз печени	↓↓	—	↓	↑	↑↑	Цирроз печени, тяжелые формы индуративного туберкулеза легких, некоторые формы хронического полиартрита и коллагенозов
Механические желтухи	↓	—	↑	↑	↑	Обтурационная желтуха, желтухи, вызванные развитием рака

						желчевыводящих путей и головки поджелудочной железы
α_2-глобулиновые плазмоцитомы	↓	↓	↑↑	↓	↓	α_2-Плазмоцитомы
β-глобулиновые плазмоцитомы	↓	↓	↓	↑↑	↓	β_1-Плазмоцитомы, β_1-плазмоклеточная лейкемия и макроглобулинемия Вальденштрема
γ-глобулиновые плазмоцитомы	↓	↓	↓	↓	↑↑	γ-Плазмоцитомы, макроглобулинемия и некоторые ретикулезы

Для интегральной оценки протеинограмм используется А/Г коэффициент (альбумино-глобулиновое соотношение), составляющий в норме 1–2 отн. ед.

Белки острой фазы (БОФ) – большая группа белков сыворотки крови, синтезирующаяся в печени, концентрация которых возрастает при наличии воспаления, сдавления, ожога, бактериальной или вирусной инфекции (табл.10).

Таблица 10

Классификация БОФ по степени увеличения их концентрации в сыворотки крови

Группы БОФ	**Степень увеличения концентрации БОФ**	**БОФ**	**Концентрация в сыворотке крови здорового человека (г/л)**
1 гуппа	«Главные» БОФ, уровень которых возрастает при повреждении очень быстро (в первые 6-8 часов) и значительно (в 20-100 раз, в отдельных случаях - в 1000 раз).	С-реактивный белок (СРБ)	< 0,005
		Амилоидный белок А сыворотки	
2 гуппа	Белки, концентрация которых может умеренно увеличиваться (в 2-5 раз) в течении 24 ч	Орозомукоид (кислый α□-гликопротеид)	0,4 - 1,3
		α□- Антитрипсин	1,4 - 3,2
		Гаптоглобин	0,5 - 3,2
		Фибриноген	1,8 - 3,5 (плазма)
3 группа	Незначительное увеличение концентрации (на 20 - 60%) в течение 48ч	Церулоплазмин	0,2 - 0,5
		С3 – комплект	0,5 - 0,9
		С4 – комплект	0,1 - 0,4

4 группа	Нейтральные БОФ (белки, концентрация которых может оставаться в пределах нормальных значений, однако они принимают участие в реакциях острой фазы воспаления).	Иммуноглобулин G	8 - 20
		Иммуноглобулин A	0,9 - 4,5
		Иммуноглобулин M	0,6 - 2,5
		α_2-Макроглобулин	1,2 - 3,2
5 группа	"Негативные" БОФ, уровень может снижаться на 30-60 % в течение 12 - 18 ч	Альбумин	37 - 53
		Трансферрин	2,3 - 4,3
		Преальбумин	0,25 - 0,45

Данные белки запускают каскад реакций для отграничения воспалительного очага, от неповрежденных тканей, восстановление нарушенной структуры и функции.

Синтез белков острой фазы активируется под действием провоспалительных цитокинов (интерлейкины – 1, 6, 11, факторы некроза опухолей, γ-интерферон).

Особенностью большинства БОФ является их неспецифичность и высокая корреляция концентраций в крови с активностью заболевания, стадией процесса и массивностью повреждения, что и определяет ценность этих тестов для мониторинга течения заболеваний и контроля эффективности лечения. Изменение концентрации различных белков в условиях повреждения и воспаления варьирует в широких пределах.

Основные методы, используемые для определения БОФ, следующие:

1.Инструментальные: нефелометрия, иммунотурбидиметрия.

Эти два метода примерно равноценны по чувствительности, специфичности, трудоемкости и стоимости исследования. Серийность и автоматизация исследований делает эти методы оптимальными для больших и средних лабораторий, выполняющих десятки и сотни анализов в день.

2. *Методы, не требующие оборудования: радиальная иммунодиффузия.* Полностью готовые к употреблению иммунодиффузионные планшеты позволяют проводить количественный анализ С-реактивного белка и других белков ОФ без приборов и дополнительных реагентов. Они рекомендованы для небольших лабораторий, выполняющих ограниченное число исследований (от одного до 20 анализов) в день.

3. *Латекс-агглютинация* может использоваться как быстрый полуколичественный метод определения С-реактивного белка. Его назначение - скрининг повышенных концентраций, после чего следует перейти к мониторингу с использованием количественных методов.

Тесты на БОФ используемые в клинической практике.

1. *При остром заболевании*. Во всех случаях следует определять С-реактивный белок, концентрация которого повышается уже спустя 6–8 часов после начала острого заболевания, при отсутствии лечения достигая максимума на 2–3 сутки. Наиболее высокие уровни СРБ наблюдаются при бактериальной инфекции (100 мг/л и выше). При эффективной терапии концентрация СРБ снижается уже на следующий день, если же этого

не происходит, с учетом изменений уровней СРБ решается вопрос о выборе необходимого антибактериального лечения. При вирусной инфекции концентрация СРБ может повышаться лишь незначительно (меньше 20 мг/л), что используется для дифференцирования вирусной инфекции от бактериальной.

2. *При сопутствующей бактериальной инфекции.* При любых заболеваниях, либо после операции присоединение бактериальной инфекции, будь то местный процесс или сепсис, сопровождается повышением уровней белков ОФ.

3. *При некрозе тканей.* Некроз тканей вызывает острофазный ответ, аналогичный таковому при бактериальной инфекции. Это возможно при инфаркте миокарда, опухолевом некрозе тканей почки, легкого, толстого кишечника. Если обнаруживается повышение концентрации белков ОФ, но не удается выявить явных признаков воспаления, следует обследовать больного на наличие злокачественного заболевания.

4. *Для контроля эффективности лечения хронических заболеваний.* Существует корреляция между активностью воспаления, массивностью повреждения тканей и концентрацией белков ОФ. При этом следует измерять в динамике концентрацию нескольких белков ОФ, что позволит быстро улавливать ответ на лечение. Например, при системном васкулите контроль за уровнями СРБ используется как объективный тест, позволяющий минимизировать дозы стероидов. При отторжении почечного трансплантата острофазный ответ является одним из ранних индикаторов отторжения.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1.Белковый состав плазмы крови.

2. Функции белков крови.

3. Синтез белков в печени, РЭС, клетках иммунной системы.

4. Общий белок в сыворотке крови, гипо- и гиперпротеинемия.

5. Методы определения содержания общего белка в крови.

6. Определения содержания общего белка в моче.

7. Общая характеристика белковых фракции.

8. Альбумины, гипер- и гипоальбунемия.

9. α1-Глобулины: α1- протеиназный ингибитор, α1-кислый гликопротеин.

10. α2-Глобулины: α2-макроглобулин, гаптоглобин, церуло-плазмин.

11. β-Глобулины: трансферрин, гемопексин.

12. γ-Глобулины: иммуноглобулины, гипер-гаммаглобулинемия.

13. Белки острой фазы воспаления, классификация, характеристика.

14. Тесты на белки острой фазы используемые в клинической практике.

15. Типы протеинограмм.

16. Протеинограмма при остром и хроническом воспалении.

17. Протеинограмма при нарушении функций почечного фильтра и злокачественных новообразованиях.

18. Протеинограмма при гепатитах, циррозах печени, механической желтухе.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием ее цели и задачи, схемы и методики определения общего белка крови и мочи, классификации белковых фракций, белков ОФ по степени увеличения их концентрации в сыворотки крови, таблицы нормальной протеинограммы.

2. Расшифровать протеинограммы при различных патологических состояниях организма человека. Дать заключение с внесением в протокол.

3. Записать тесты на белки острой фазы используемые в клинической практике. Дать заключение с внесением в протокол.