

# **Plazmafehérjék és plazmaenzimek vizsgálata**

1. A plazmafehérjék funkció szerinti felosztása
2. A klinikumban alkalmazott fontosabb fehérje meghatározási módszerek
3. Plazmafehérje elektroforézis
4. A szérundefhérjék elektroforetikus képének változása I.
5. A szérundefhérjék elektroforetikus képének változása II.
6. A radiális immundiffúzió elve
7. Rakéta elektroforézis
8. Az Ouchterlony - féle kettős immundiffúziós technika
9. Plazmafehérje és immunelektroforézis
10. Immunelektroforézis elve
11. Immunelektroforézis monoclonalis gammopathiában
12. Immunfixáció
13. A plazmafehérjék kóros változásai I.
14. A plazmafehérjék kóros változásai II.
15. Laboratóriumi leletek multiplex myelomában
16. Plazmaenzimek laboratóriumi vizsgálata I.
17. Plazmaenzimek laboratóriumi vizsgálata II.
18. A myocardialis infarctus laboratóriumi diagnosztikája
19. A myocardialis ischaemia és az acut coronária szindróma biokémiai markerei
20. Emelkedett plazma kreatin - krináz aktivitás okai
21. Emelkedett plazma gamma – glutamil – transzpeptidáz szint okai
22. Emelkedett plazma aszpartát amino – transzferáz szint diagnosztikája
23. Gyulladásos megbetegedések laboratóriumi diagnosztikája
24. ACPR meghatározása különböző kórképekben
25. Vörösvérsejt – süllyedés (Westergren)
26. A gyulladás vizsgálatában használt eljárások
27. Akutfázis – fehérjék
28. Specifikus fehérje meghatározások a klinikai gyakorlatban

# A PLAZMAFEHÉRJÉK FUNKCIÓ SZERINTI FELOSZTÁSA

1.

## 1. *Transzportfehérjék:*

albumin, transferrin, cöruoplazmin, haptoglobin, hemopexin, transzkortin, TBG, lipoproteinek  
az albumin specifikusan köt kismolekulájú anyagokat is: gyógyszerek, zsírsavak, Ca, Zn

## 2. *Enzimek:*

- plazma-specifikus enzimek: pl.: pszeudokolinészteráz, lipoprotein lipáz
- nem plazma-specifikus enzimek:  
exokrin enzimek: amiláz, lipáz, peptidázok  
intracelluláris enzimek: pl.: LDH, GGT, ALP, ASAT, ALAT

## 3. *Proteolitikus enzimrendszerek, proteázinhibitorok, modulátor fehérjék:*

- véralvadási-, fibrinolitikus-, kallikrein-kinin-, komplement-rendszer
- $\alpha_1$ -antitripszin,  $\alpha_2$ -makroglobulin, antithrombin-III,
- akut fázis fehérjék, C-reaktív protein, cytokinek, interleukinek

## 4. *Proteohormonok:*

inzulin, glukagon, parathormon, kalcitonin

## 5. *Immunglobulinok:*

IgG, IgM, IgA, IgE, IgD

## 6. *Tumormarkerek*

## 7. *Fiziko-kémiai aktivitású fehérjék:*

kolloidozmotikus hatás, puffereelés

# A KLINIKUMBAN ALKALMAZOTT FONTOSABB FEHÉRJEMEGHATÁROZÁSI MÓDSZEREK

## *1. Szérum-összfehérje meghatározás:*

Biuret-reakció

## *2. Szérum-fehérje frakciók elválasztása – mérése*

elektroforézis (cellulózacetát fólia)

## *3. Specifikus fehérjemeghatározási módszerek:*

Immunkémiai módszerek:

Szemikvantitatív módszerek:

Immunelektroforézis

Immunfixáció

Kettős immundiffúzió (Ouchterlony)

Kvantitatív módszerek:

Radiális immundiffúzió(RID)

Rakéta elektroforézis

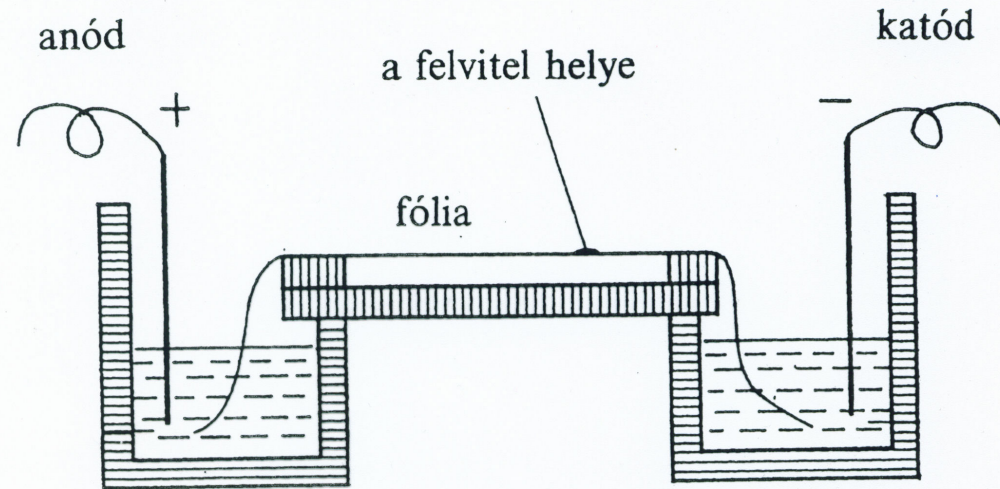
Nephelometria (fényszórás elve)

Radioimmunassay (RIA)

Enzimimmunoassay (EIA)

Fluorescens immunoassay (FIA)

# PLAZMAFEHÉRJE ELEKTROFORÉZIS



Alb     $\alpha_1$      $\alpha_2$      $\beta$      $\gamma$

**Albumin:** 40 g/l  
**alfa-1 globulinok**  
 alfa-1 antitripszin: 3 g/l  
 alfa-1 savas glikoprotein: 1 g/l  
**alfa-2 globulinok**  
 haptoglobin: 2 g/l  
 alfa-2 makroglobulin: 2,5 g/l  
 coeruloplasmin: 0,3 g/l

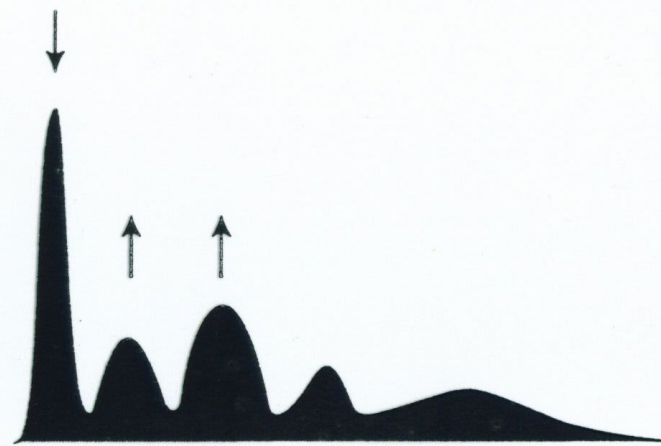
**béta globulinok:**  
 transferrin: 3 g/l  
 low density lipoprotein: 1 g/l  
 komplement komponensek: 1 g/l  
**gamma globulinok:**  
 IgG: 14 g/l  
 IgA: 3,5 g/l  
 IgM: 1,5 g/l  
 IgD: 0,03 g/l  
 IgE: nyomokban

# A SZÉRUMFEHÉRJÉK ELEKTROFORETIKUS KÉPÉNEK VÁLTOZÁSA



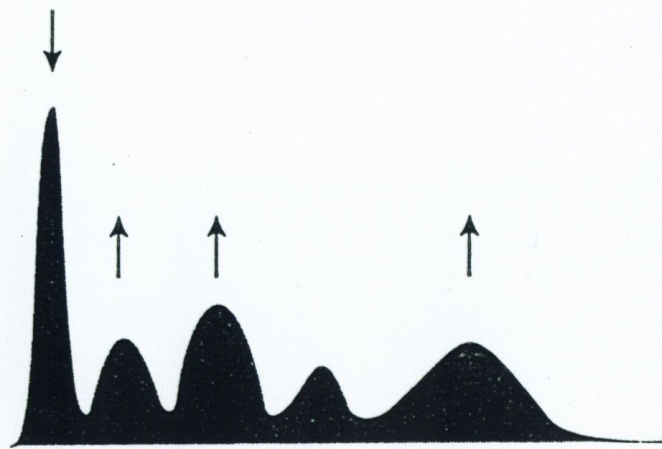
Alb  $\alpha_1$   $\alpha_2$   $\beta$   $\gamma$

Egészséges



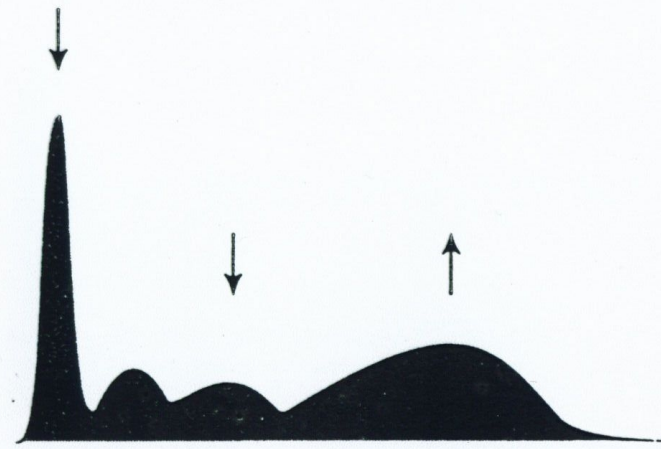
Alb  $\alpha_1$   $\alpha_2$   $\beta$   $\gamma$

Akut gyulladás



Alb  $\alpha_1$   $\alpha_2$   $\beta$   $\gamma$

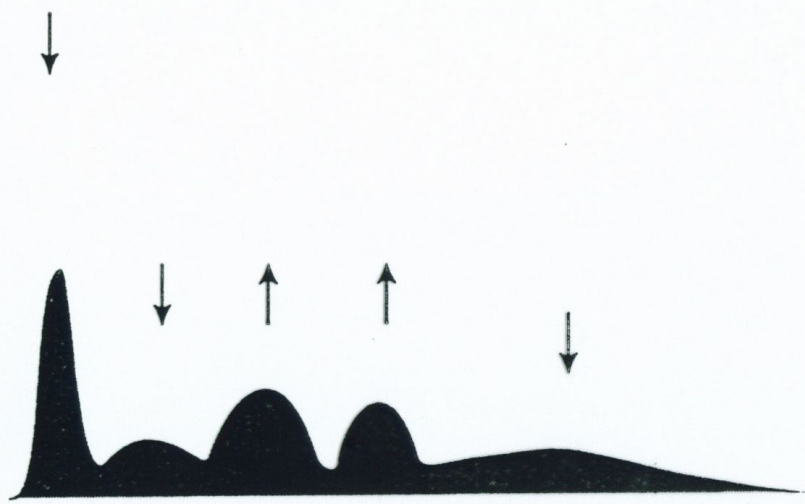
Krónikus gyulladás



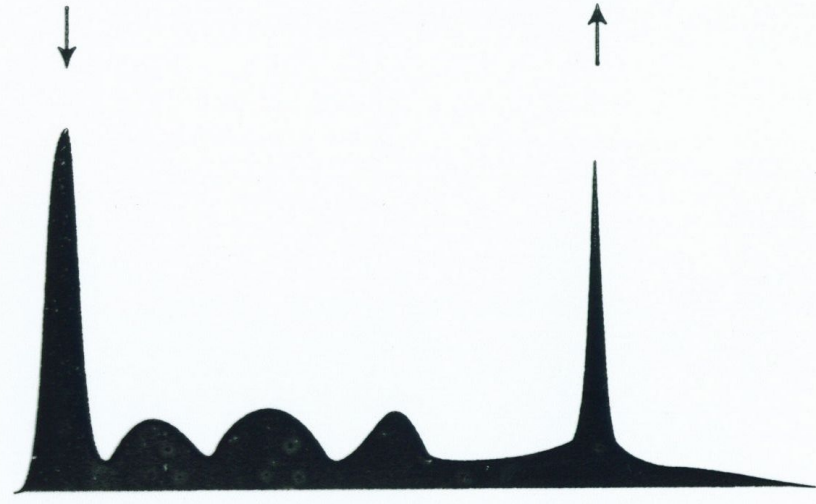
Alb  $\alpha_1$   $\alpha_2$   $\beta$   $\gamma$

Májcirrhosis

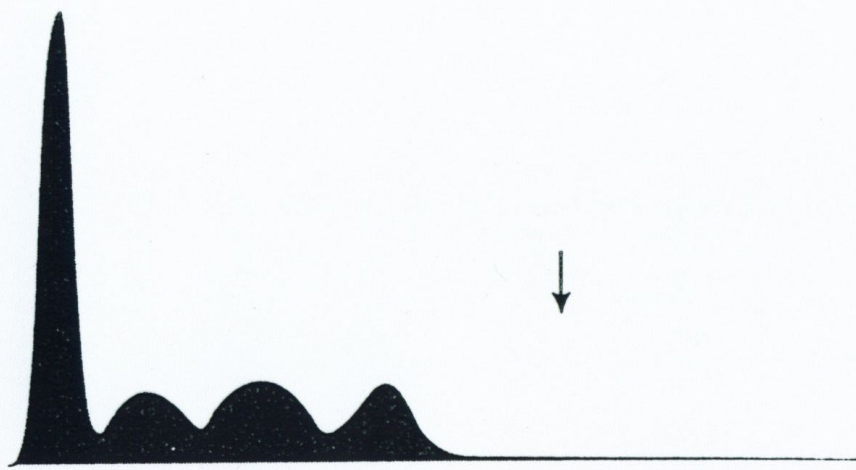
# A SZÉRUMFEHÉRJÉK ELEKTROFORETIKUS KÉPÉNEK VÁLTOZÁSA



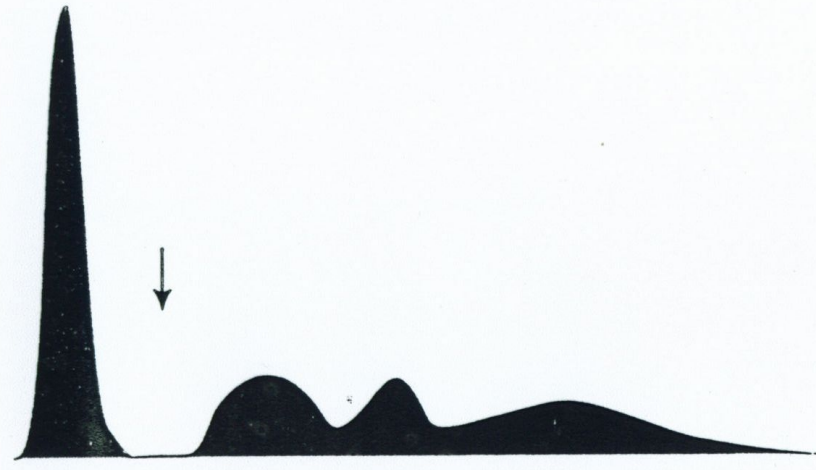
Alb  $\alpha_1$   $\alpha_2$   $\beta$   $\gamma$   
**Nephrosis syndrome**



Alb  $\alpha_1$   $\alpha_2$   $\beta$   $\gamma$   
**Monoklonális gammopathia**

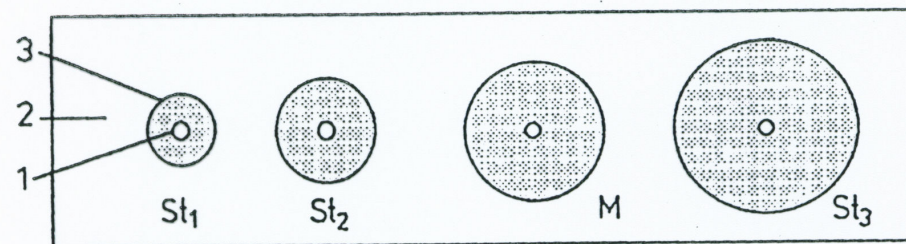
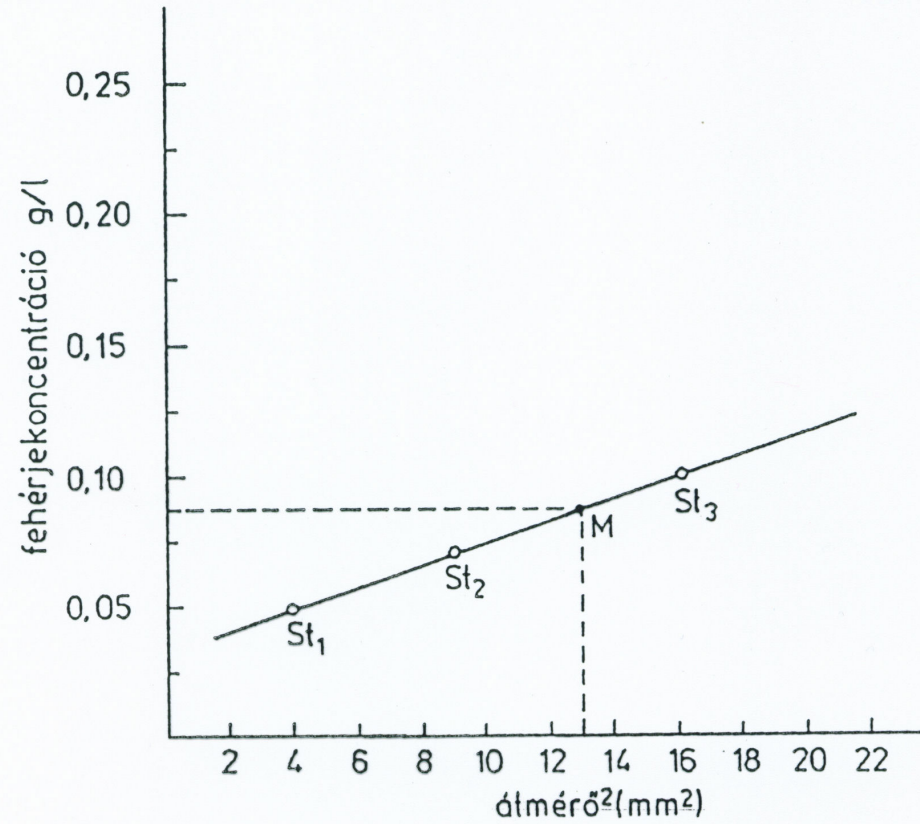


Alb  $\alpha_1$   $\alpha_2$   $\beta$   $\gamma$   
**Hypogammaglobulinaemia**



Alb  $\alpha_1$   $\alpha_2$   $\beta$   $\gamma$   
**Alfa-1-antitripszin hiány**

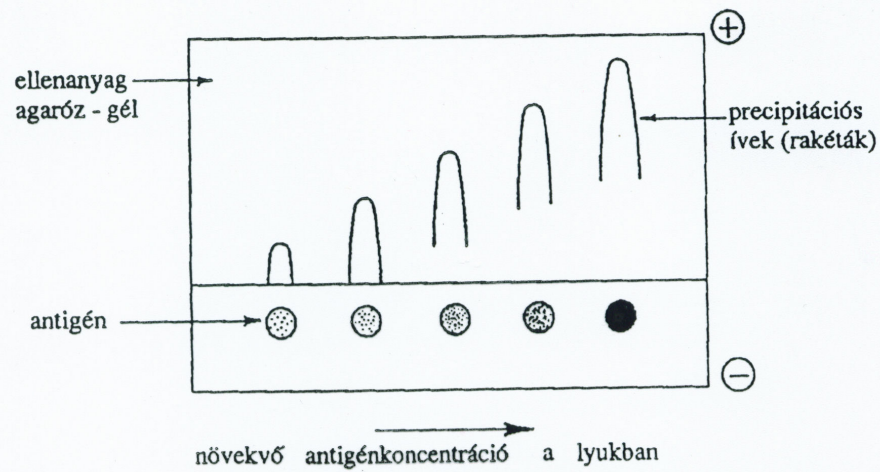
## A RADIÁLIS IMMUNDIFFÚZIÓ ELVE



A radiális immundiffúzió elve. St<sub>1-2-3</sub>: ismert koncentrációjú standard fehérjeoldat;  
 M: vizsgálandó ismeretlen fehérjeoldat (szérum); r: átmérő; 1: mintafelvitel helye;  
 2: ellenanyagot tartalmazó agar-gel; 3: precipitációs gyűrű

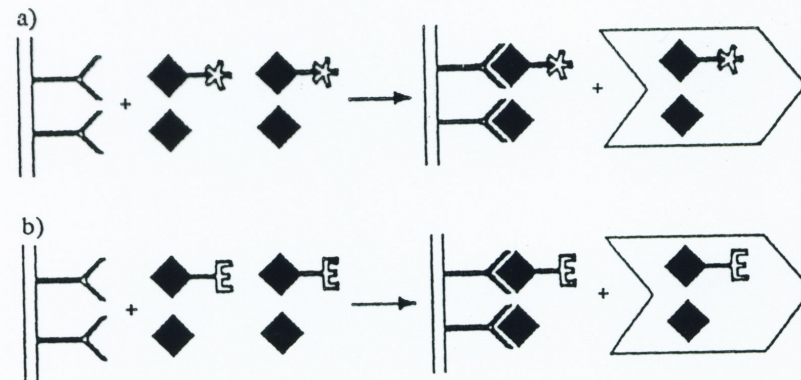


### RAKÉTA ELEKTROFORÉZIS



A rakéta elektroforézis elve

### A RIA ÉS ELISA MÓDSZER

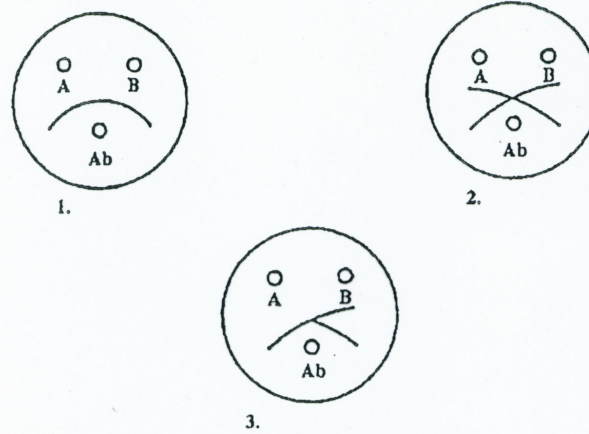


A RIA (a) és ELISA (b) módszer elve. Az inkubáció befejeztével a szabadon maradt összetevőket a rendszerből eltávolítják.

Az Ag+Ab komplexet radioaktivitás (RIA) vagy enzimaktivitás (ELISA) alapján mérik.

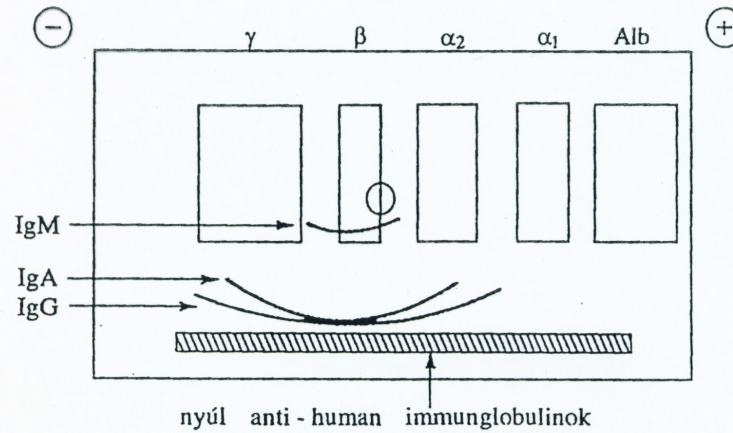
◆-☆ radioaktív jelzéssel ellátott antigén

◆-E indikátor enzimhez kötött antigén



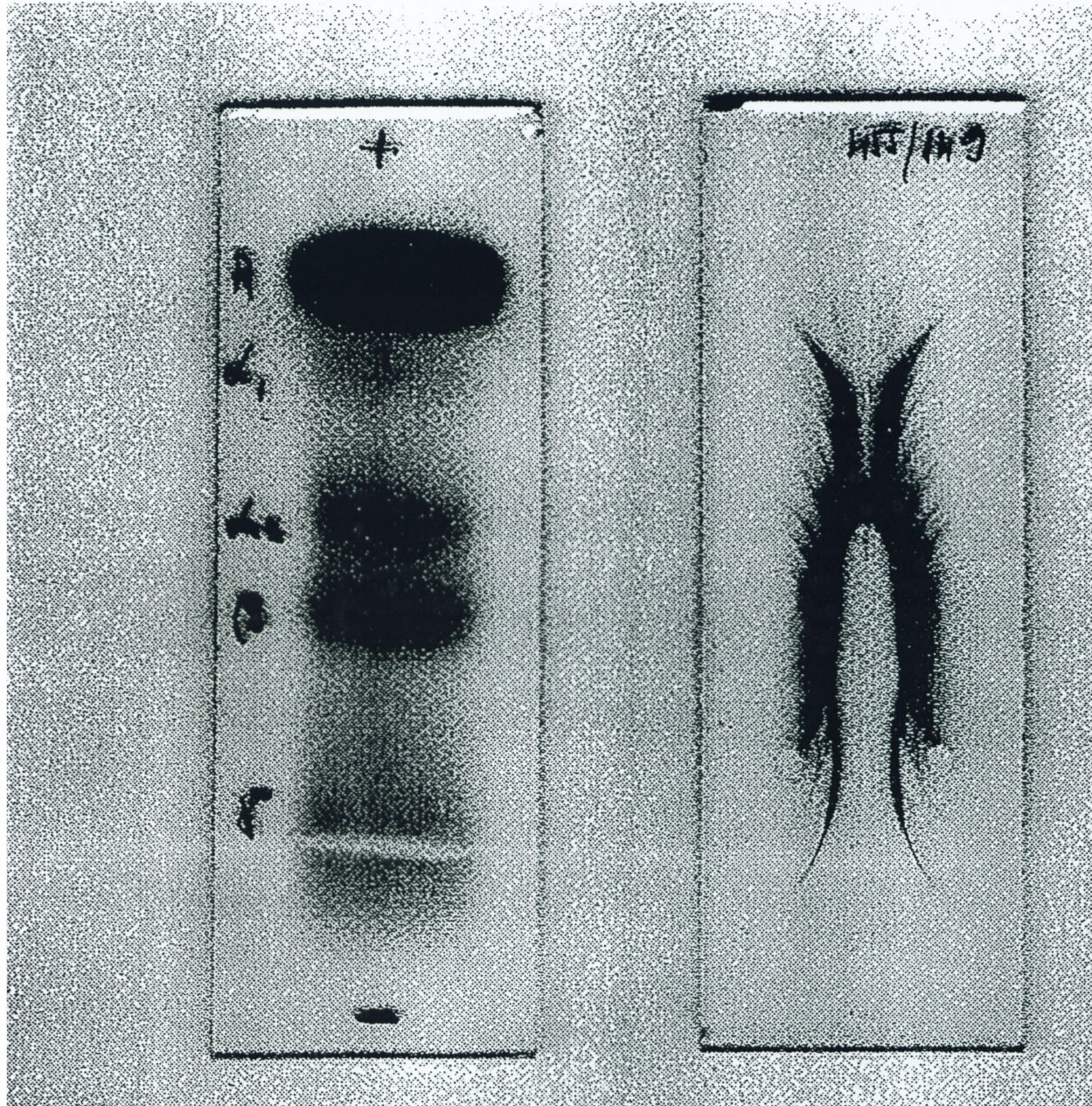
Az Ouchterlony-féle kettős immundiffúziós technika. A és B antigén immunológiailag  
 1. azonos; 2. nem azonos; 3. részlegesen azonos. A precipitáció meggátolja az  
 antitest további diffúzióját.

### IMMUNELEKTROFORÉZIS



A human szérum nagyobb immunoglobulin-osztályainak demonstrálása immunelektroforézissel. A vályúban a human szérummal szemben termelt nyúl-antiszérum van. A szérumban található főbb elektroforetikus frakciókat a precipitációs ívek jelzik. Az IgG precipitációs íve a  $\gamma$ -régiótól az alfa<sub>2</sub>-mobilitásig terjed

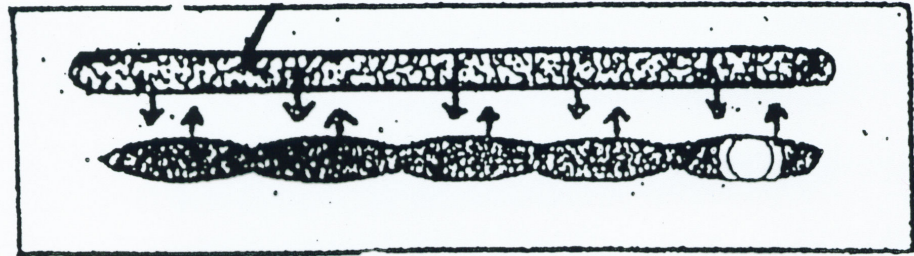
elfo.tif



# IMMUNELEKTROFORÉZIS



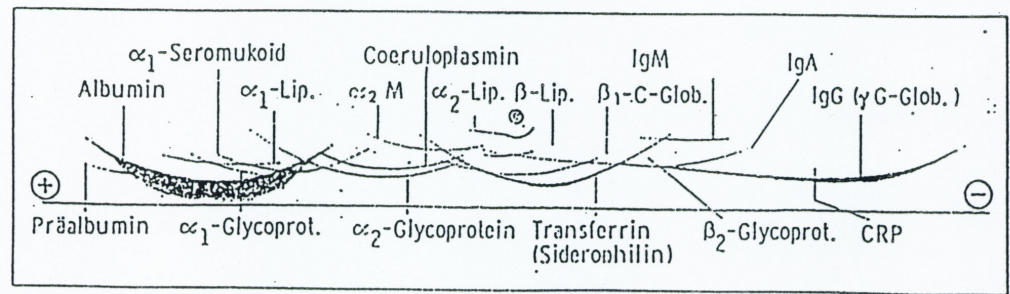
Plazmafehérje elektroforézis



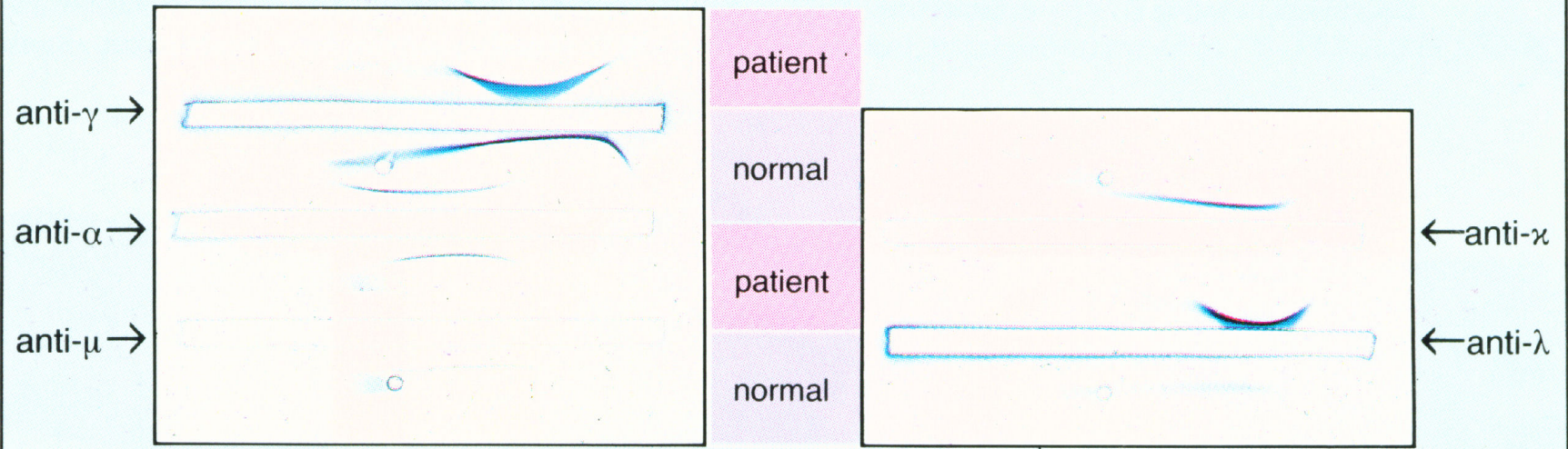
Immundiffúzió



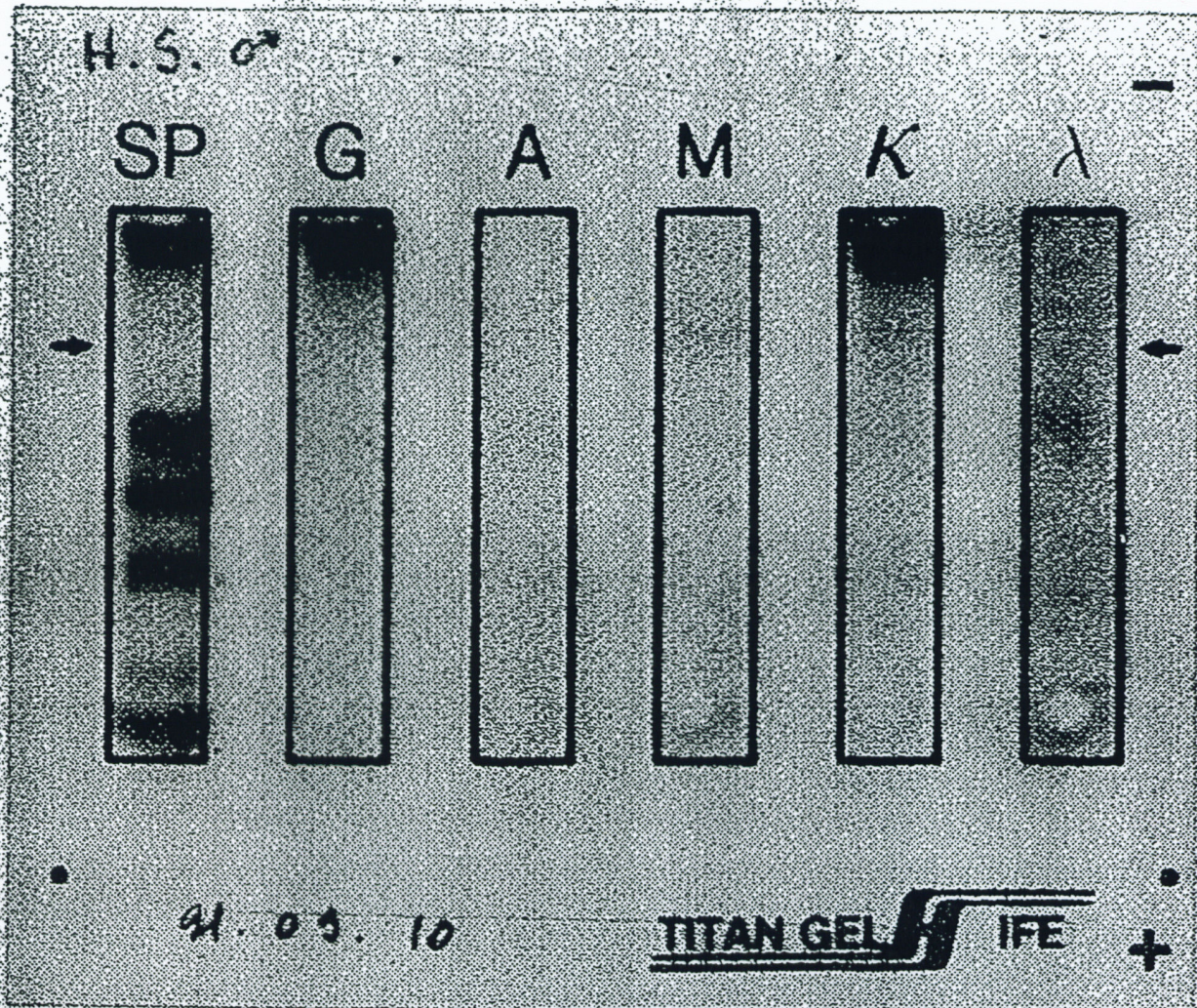
Precipitáció



### Multiple Myeloma: Immunoelectrophoresis



immfix.tif



**Normál plazmafehérje-koncentráció: 60-80 g/l**

## **Relatív eltérések:**

Relatív hyperproteinaemia – Dehydratio

Relatív hypoproteinaemia - Hyperhydratio

## **Abszolút eltérések:**

### ***Abszolút hypoproteinaemia***

Csökkent fehérjeszintézis:

Súlyosan hiányos táplálkozás

Malabsorptio

Súlyos májparenchyma-károsodás  
(cirrhosis)

Tumoros cachexia

Fokozott fehérjevesztés:

Vesén át: nephrosis syndroma

Bélen át: exsudativ enteropathia

Bőrön át: kiterjedt égés

Nagy mennyiségű ascites lebocsátása

### ***Abszolút hyperproteinaemia:***

Fokozott fehérjeszintézis

Monoklonális gammopathiák

(plasmocytoma, morbus Waldenström)

## *Dysproteinaemia:*

a plazmafehérje összetevők aránya változik meg, mely nem jár szükségszerűen az összfehérje-koncentráció megváltozásával

pl.: akut gyulladás  
krónikus gyulladás  
májcirrhosis  
nephrosis syndroma

## *Defectdysproteinaemia:*

valamely plazmafehérje teljes hiánya, leggyakrabban genetikus ok következtében

pl.: alfa-1 antitripszin hiány  
agammaglobulinaemia  
cöruol plazmin hiánya (morbus Wilson)

## *Paraproteinaemia:*

extrém mértékű monoklonális fehérjeszaporulat a plazmában

pl.: plasmocytoma  
Morbus Waldenström



**Laboratóriumi leletek multiplex myelomában:***Biokémiai:*

- paraprotein a szérumban
- paraprotein a vizeletben (Bence-Jones-protein) – csak az esetek 50%-ban mutatható ki
- szérumban:
  - urea, kreatinin ↑
  - kalcium és húgysav ↑
  - normál alkalikus foszfatáz aktivitás
  - csökkenés a normál immunglobulinokban

*Haematologiai:*

- vörösvérsejt-süllyedés ↑
- anaemia – rendszerint normochrom, normocyter
- pénztekercsképződés

**Paraproteinek multiplex myelomában:***Fehérje:**Gyakoriság:*

IgG	55%
IgA	22%
IgD	1,5%
Bence-Jones	50%
Csak Bence-Jones	20%

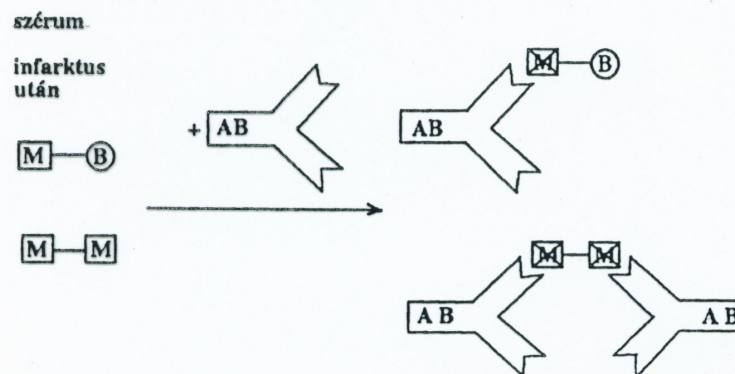
IgE és IgM paraprotein igen ritkán fordul elő  
Az esetek 1%-ban paraprotein nem mutatható ki

**Enzimaktivitás egysége IU, U:**

1 U az aktivitása annak az enzimnek, amely 1  $\mu$ mol szubsztrát átalakítását katalizálja 1 perc alatt standard körülmények között (37 ° C).

**Enzimaktivitás mérése:** Általában optikai tesztekkel történik, melynek során NADH, vagy NADPH és NAD<sup>+</sup>, illetve NADP<sup>+</sup> abszorpciós spektrumai közti különbséget használjuk.

**Izoenzimek elkülönítése:** általában elektroforézissel



A CK-MB aktivitás immungátlós módszerrel történő meghatározásának elve. A CK-M alegységek aktivitását a CK-M alegység elleni antitestek (AB) szelektíven és mennyiségileg gátolják anélkül, hogy a CK-B alegység aktivitását befolyásolnák. A CK-MB aktivitásra a CK-B alegység aktivitásából következtethetünk. CK-MB aktivitás= 2x CK-B alegység aktivitás.

## 1. *Plazmaspecifikus enzimek:*

Az enzimeket termelő sejtek károsodása esetén szérumban mért aktivitásuk csökken

pl.: pszeudokolinészteráz  
lipoprotein lipáz  
cöruoplazmin  
proteolitikus enzimrendszerek

## 2. *Exokrin enzimek:*

Az enzimeket termelő sejtek károsodása esetén szérumban mért aktivitásuk nő

pl.: amiláz  
lipáz  
peptidázok

## 3. *Intracelluláris enzimek:*

Az enzimeket termelő sejtek károsodása esetén szérumban mért aktivitásuk nő

<b>LDH</b>	LDH <sub>1</sub> (HHHH) - α-HBDH	szív, vvt, vesekéreg
	LDH <sub>2</sub> (HHHM)	szív, vvt, vesekéreg
	LDH <sub>3</sub> (HHMM)	
	LDH <sub>4</sub> (HMMM)	
	LDH <sub>5</sub> (MMMM)	máj, vázizom
<b>CK</b>	CK-MM (>95%)	vázizom
	CK-MB (< 5%)	szívizom
	CK-BB (< 1%)	központi idegrendszer
<b>Myoglobin</b>		szívizom
<b>Troponin T</b>		szívizom
<b>ASAT (SGOT)</b>		máj, szívizom, vázizom
<b>ALAT (SGPT)</b>		máj, vázizom
<b>ALP</b>		csont, máj, bél

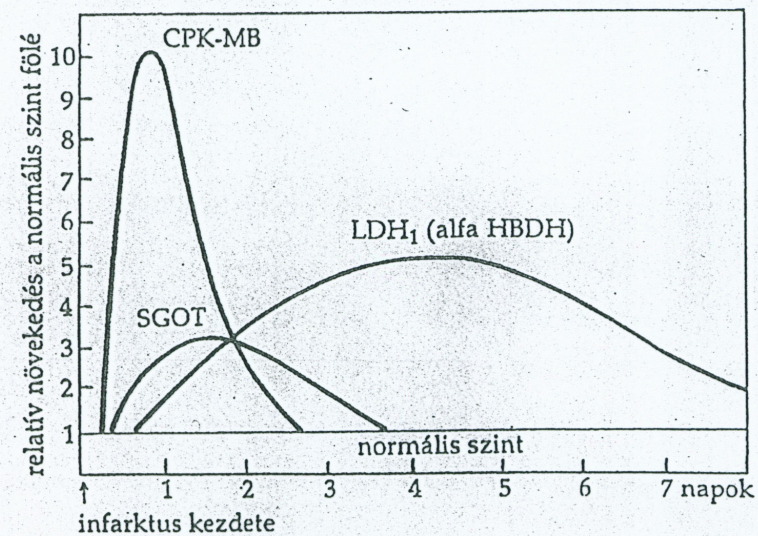
## A MYOCARDIALIS INFARCTUS LABORATÓRIUMI DIAGNOSZTIKÁJA

1. Myoglobín emelkedés (normálérték: 17-106 ng/ml ffi, 14-66 ng/ml nőknél)
2. össz CK aktivitás > 200 U/l
3. CK MB aktivitás > 25 U/l és/vagy  
> 6 % az össz CK aktivitásnak
4. CK MB mennyiség mérése mikrorészecskés enzim-immunoassay –vel  
(MEIA) ≥ 8ng/ml
5. Kardiális Troponin I (> 0,07 ng/ml) és T (> 0,05 ng/ml)

Az infarktust jelző vizsgálatok időbeli jellemzői:

	Myoglobín	CK MB mennyiség	Kardiális Troponinok	Össz CK
emelkedés kezdet	1-3 óra	2-8 óra	4-6 óra	4-8 óra
csúcsidő	6-9 óra	6-24 óra	12-18 óra	18-24 óra
emelkedés tartama	18-24 óra	1-2 nap	3-10 nap	1-3 nap

6. ASAT > 20 U/l (2-4 nap)
7. LDH >200 U/l (7-10 nap)  
αHBDH > 200 U/l



## A MYOCARDIALIS ISCHAEMIA ÉS AZ AKUT KORONÁRIA SZINDRÓMA BIOKÉMIAI MARKEREI

**IMA:** az **Ischaemia Modified Albumin** a myocardialis ischaemia szenzitív, de nem specifikus biokémiai markere, mely korai pozitívításával segíti az akut mellkasi fájdalom differenciálását, alátámasztja annak ischaemiás eredetét. Az akut koronária szindróma vagy koronária beavatkozás kezdetétől számított néhány perc múlva emelkedik a szintje, és legalább 12 órán át magas marad.

**Keletkezése:** ischaemiás szövetben az albumin N-terminális végének szerkezete reverzibilisen megváltozik, egyidejűleg csökken a molekula fémion kötő képessége.

**Meghatározása:** az albumin cobalt binding test –ACB teszt – segítségével történik. A beteg szérumához adott standard mennyiségű kobalt egy része albuminhoz kötődik. Az ischaemiás szövetben módosult szerkezetű albumin, az IMA nem köti a kobaltot. Inkubálás után a nem kötődött kobalt színes komplexet képez a reagenssel, az intenzitás kolorimetriás módszerrel mérhető.

**Normálértéke:** < 85 U/ml

### AZ AKUT KORONÁRIA SZINDRÓMA EGYÉB BIOKÉMIAI MARKEREI:

Patofiziológiai állapot:

**Koronária betegség:** rizikófaktorok, pl. koleszterin

**Koronária gyulladás:** CRP, myeloperoxidáz, szolubilis CD40 ligand

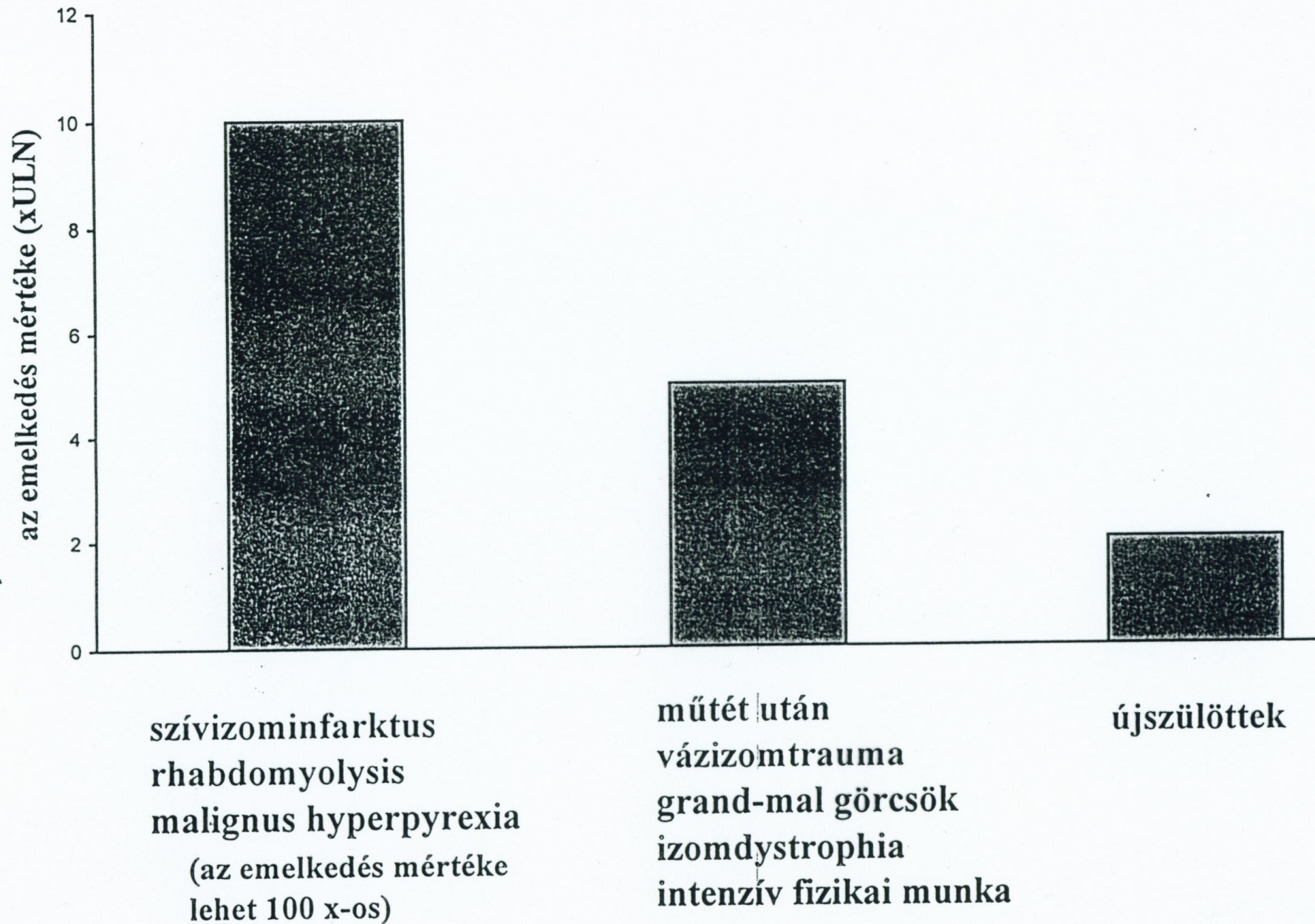
**Plakk instabilitás, ruptura:** kolin, PAPP-A (pregnancy-associated plasmaprotein A)

**Myocardialis ischaemia:** IMA, kolin, FFAu (albuminhoz nem kötött szabad zsírsav)

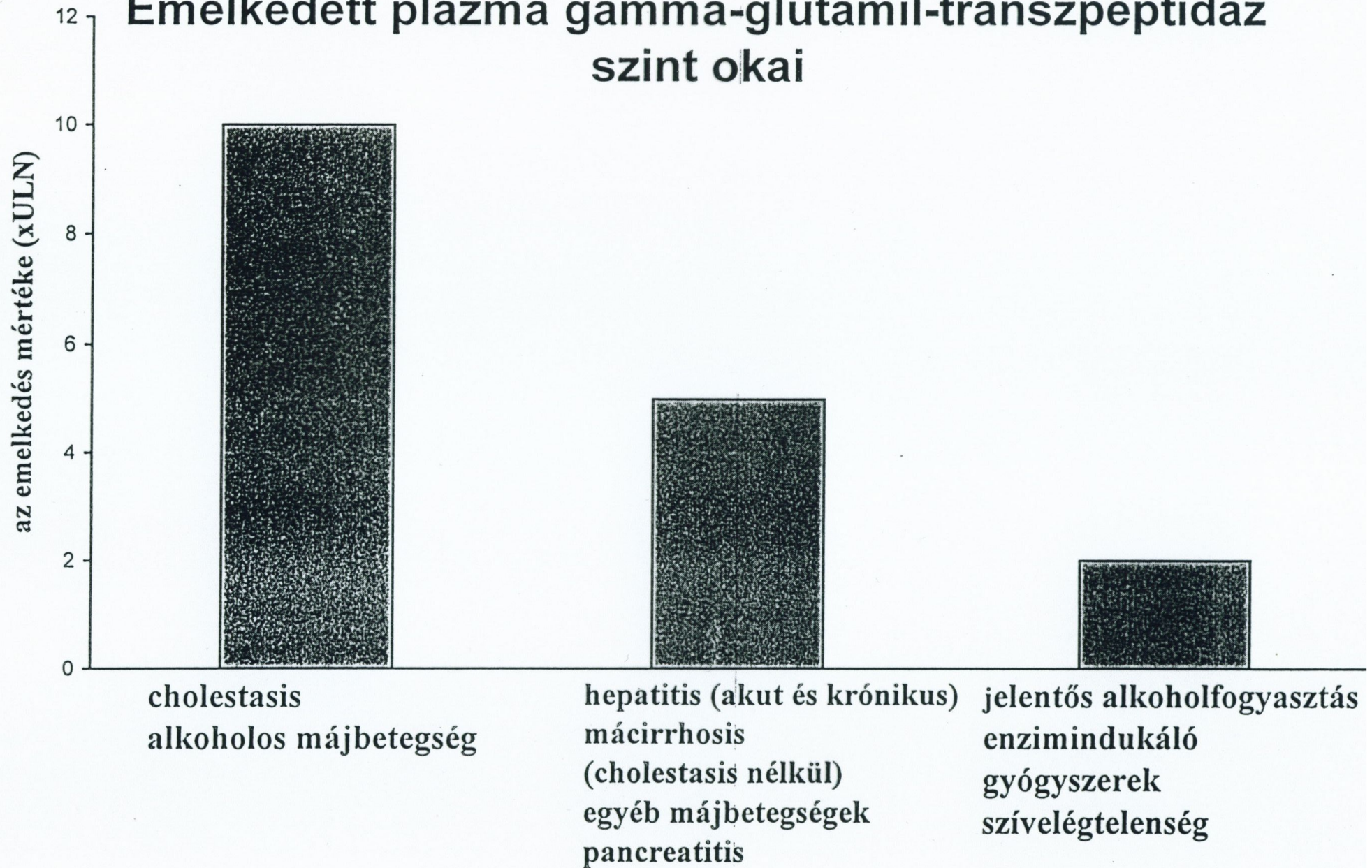
**Myocardialis nekrosis:** kardiális troponin T és I, CK-MB, myoglobin

**Kamra diszfunkció:** BNP, Nt-proBNP (B típusú natriuretikus peptid, ill. aminoterminálisa)

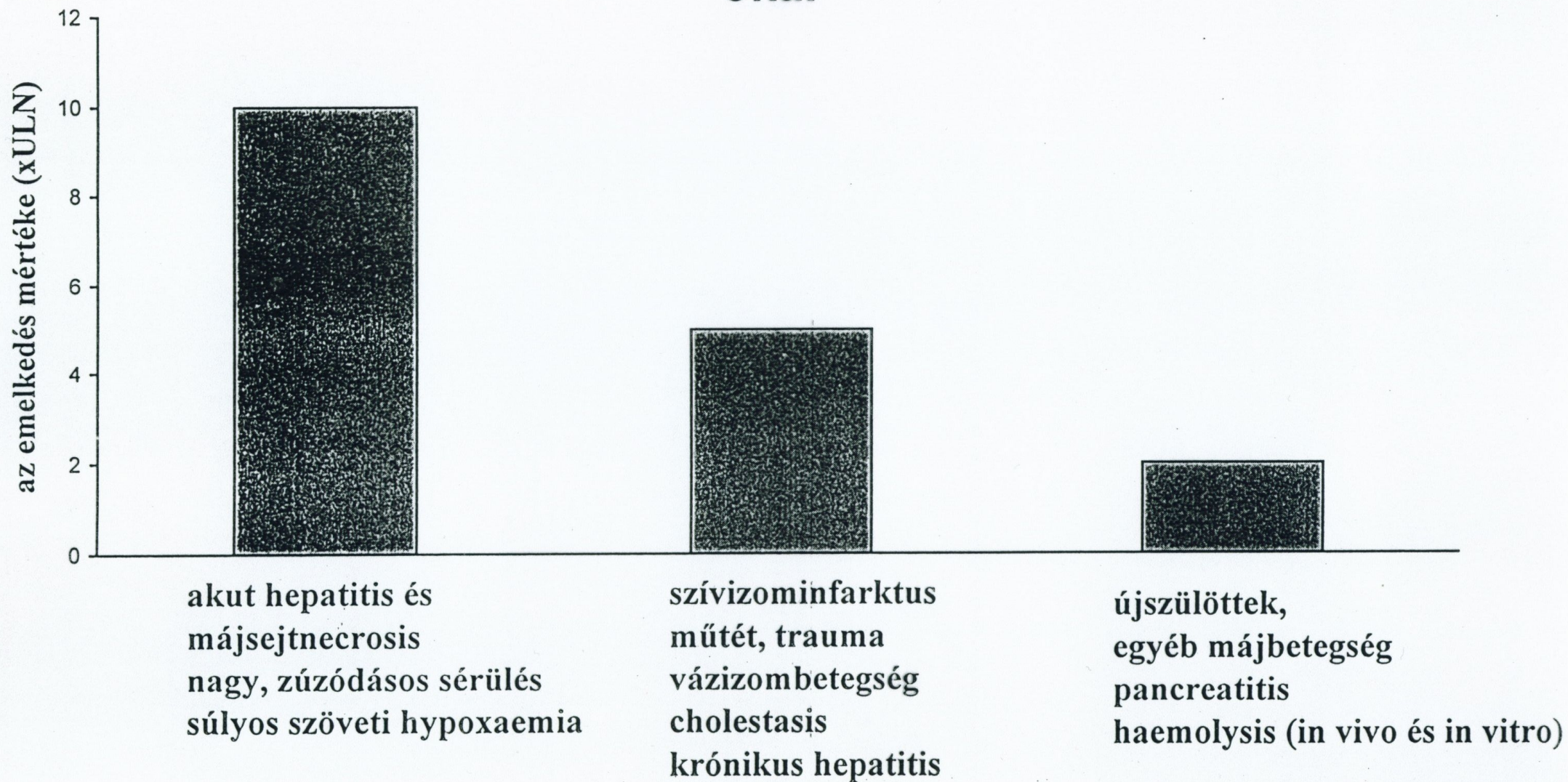
## Emelkedett plazma kreatin-kináz aktivitás okai



## Emelkedett plazma gamma-glutamil-transzpeptidáz szint okai



## Emelkedett plazma aszpartát amino-transzferáz szint okai





# GYULLADÁSOS MEGBETEGEDÉSEK LABORATÓRIUMI DIAGNOSZTIKÁJA

1. WBC mennyiségi és minőségi változások  
gyulladás esetén
2. Süllyedés gyulladás esetén > 20 mm/h, aspecifikus  
vizsgálat
3. CRP gyors és érzékeny, lefolyást jelzi

## 4. Szérumfehérjék változásai:

Albumin ↓

IgG, IgM, IgA ↑

A/G ↓

Fehérje elektroforézis:  $\alpha_1$   $\alpha_2$  ↑

Akut fázis fehérjék:

↑

$\alpha_1$ -antitripszin  
fibrinogén  
haptoglobin  
cöruoplazmin  
CRP

↓

albumin  
transzferrin

## A C – REAKTÍV PROTEIN VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ KÓRKÉPEKBEN

A C – reaktív protein ( CRP ) a májban termelődő u.n. „akut fázis fehérje”, plazmaszintje akut gyulladással járó kórképekben emelkedik.

Meghatározása: többféle módszerrel mérhető ( ELISA, immunturbidimetria, immundiffúzió, agglutinációs teszt )

Normálértéke: egészségesekben < 12 mg/l  
terhességben < 20 mg/l  
az egészségesek átlagos plazmaszintje 0,8 mg/ml

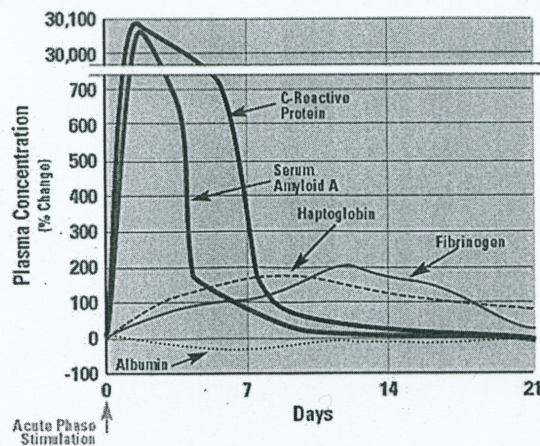
Akut gyulladással 6 órán belül megemelkedik, csúcspontját kb. 50 óra múlva éri el.

### Emelkedett CRP értékkel járó kórképek

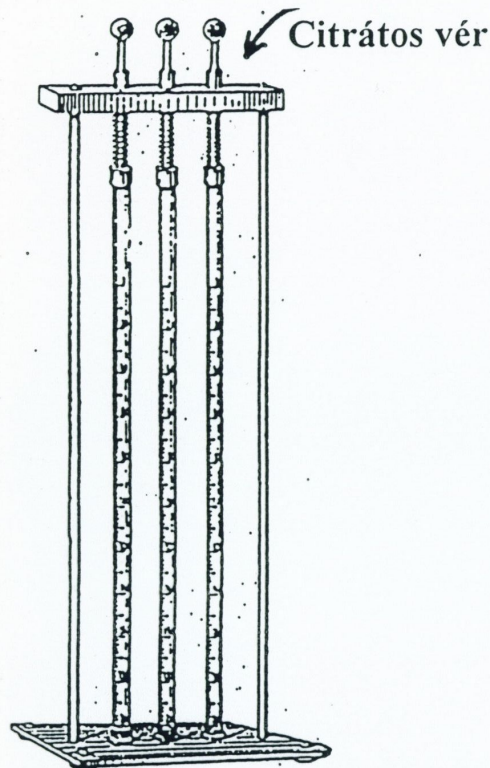
- |                        |                                     |
|------------------------|-------------------------------------|
| Rheumatoid arthritis   | Malignus betegségek                 |
| Reumás láz             | Kötőszöveti betegségek              |
| TBC                    | Bakteriális, vírusos, gombás és     |
| SLE                    | parazitás fertőzések                |
| Pneumococcus pneumonia | Egyéb, gyulladással járó folyamatok |

Az új, nagyérzékenységű CRP meghatározás ( hs CRP ) lehetővé tette a normáltartományon belüli differenciálást. Emelkedett szinttel járnak: koronárisbetegség, stroke, perifériás érbetegség. Vitatott, hogy ezekben az esetekben a CRP emelkedés a folyamatok markere vagy oki tényezője. A különböző hs CRP szintek a cardiovascularis betegség előfordulására vonatkozó rizikójelzők.

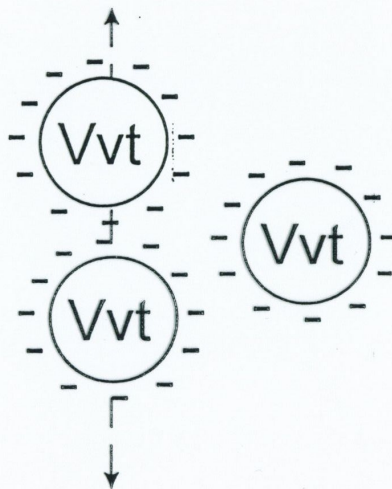
- hs CRP < 1.0 mg/l alacsony kockázat
- 1.0 mg/l < hs CRP < 3,0 mg/l átlagos kockázat
- hs CRP > 3,0 mg/l magas kockázat cardiovascularis betegség kialakulására.



## VÖRÖSVÉRSEJT-SÜLLYEDÉS (Westergren)



Elektrosztatikus hatás



Gravitáció

Vörösvérsejt-süllyedés-állvány  
Westergren pipettákkal

**Normálérték:**

ffi: 2-10 mm/h

nő: 2-20 mm/h

A süllyedés gyorsult, ha:

1. *Össz vvt-felület csökken:*  
vvt-szám csökken - anaemia  
vvt-aggregáció (pénztekercsképződés)

2. *Vvt-ek felszíni negatív töltése csökken:*

A/G csökken:

hypalbuminaemia  
globulin szaporulat  
(gyulladás, infekció, tumor)

A süllyedés lassult, ha:

Össz vvt-felület nő: polycytaemia, polyglobulia

**Fontos:** nem specifikus vizsgálat

lassan normalizálódik

terhességben fiziológiásan gyorsult

## A GYULLADÁS VIZSGÁLATÁBAN HASZNÁLT ELJÁRÁSOK

VIZSGÁLAT	ELTÉRÉS
C-reaktív protein	↑↑ (10-1000 x)
Szérum fehérje-elfo	$\alpha_1, \alpha_2$ ↑, alb. ↓
Vvs-süllyedés	gyorsult
Fehérvérsejtszám	leukocytosis
Testhőmérséklet	hőemelkedés, láz

## AKUTFÁZIS-FEHERJÉK

$\alpha_1$	$\alpha_1$ -antitrypsin $\alpha_1$ -savanyú glykoprotein (orozomukoid)
$\alpha_2$	haptoglobin coeruloplasmin $\alpha_2$ -makroglobulin
$\beta$	C-reaktív protein (CRP) C <sub>3</sub> -komplement

## NEGATÍV AKUTFÁZIS-FEHÉRJÉK

	albumin
$\beta$	transferrin

**SPECIFIKUS FEHÉRJEMEGHATÁROZÁSOK A  
KLINIKAI GYAKORLATBAN  
(az enzimdiagnosztikán kívül)**

- |                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| <b>1. Gyulladás:</b>                | akutfázis-fehérjék                         |
| <b>2. Tumor:</b>                    | tumormarkerek                              |
| <b>3. Autoimmun betegségek:</b>     | autoantitestek                             |
| <b>4. Allergiás megbetegedések:</b> | IgE  |
| <b>5. Paraproteinaemia:</b>         | paraproteinek                              |
| <b>6. Anaemia:</b>                  | Hgb, haptoglobin,<br>ferritin, transferrin |
| <b>7. Szívinfarktus:</b>            | myoglobin, troponin T                      |
| <b>8. Vesebetegség:</b>             | $\beta_2$ -mikroglobulin                   |
| <b>9. Endokrin betegségek:</b>      | peptidhormonok                             |
| <b>10. Terhesség:</b>               | hCG, AFP                                   |