

ГОУ ВПО «СПбГМУ
им. акад. И.П.Павлова Росздрава»

Современный подход к
определению острофазных
белков

Галкина О.В.

Острофазные белки - БОФ

- Острофазный ответ - совокупность локальных и системных реакций организма на тканевое повреждение, вызванное различными причинами - инфекцией, травмой, воспалением, опухолевым ростом
- Белки острой фазы - группа белков, обладающих различными физиологическими свойствами, концентрация которых в периферической крови и других биологических жидкостях достоверно меняется в острую фазу воспаления

Классификация острофазных белков

Положительные белки острой фазы	Отрицательные белки острой фазы
С-реактивный белок	Трансферрин
Гаптоглобин	Альбумин
α 1-антитрипсин	Транстиретин
Сывороточный амилоид А	Преальбумин
Орозомукоид	
Фибриноген	

Изменения концентрации БОФ при умеренном воспалении



(В.В. Вельков, 2005)

Очередность возрастания маркеров воспаления

- IL-6

- ▶ СРБ

- ▶ АЛЬФА 1-АТИТРИПСИН

- ▶ ОРОЗОМУКОИД

- ▶ ЦЕРУЛОПЛАЗМИН

- ▶ ГАПТОГЛОБИН

- ▶ альбумин

Увеличение
концентрации
в 10-100 раза

Увеличение
концентрации
в 2-5 раза

- *Международный Комитет по Стандартизации гематологических исследований рекомендовал количественное определение СРБ как более предпочтительное, чем СОЭ.*

Классификация БОФ по степени увеличения концентрации при травме

Группа	Белок	Концентрация в сыворотке в норме (г/л)
«Главные» реактанты – увеличение в 20 - 1000 р. в течение 6-12 час.	СРБ, сывороточный амилоид А	0,005 0,001 – 0,03
Умеренное увеличение (2 -5 раз) в течение 24 час.	α1-антитрипсин α1 -антихимотрипсин α1 – кислый гликопротеин Гаптоглобин Фибриноген	1,4 – 3,2 0,3 -0,6 0,4 -1,3 0,5 -3,2 1,8 -3,5

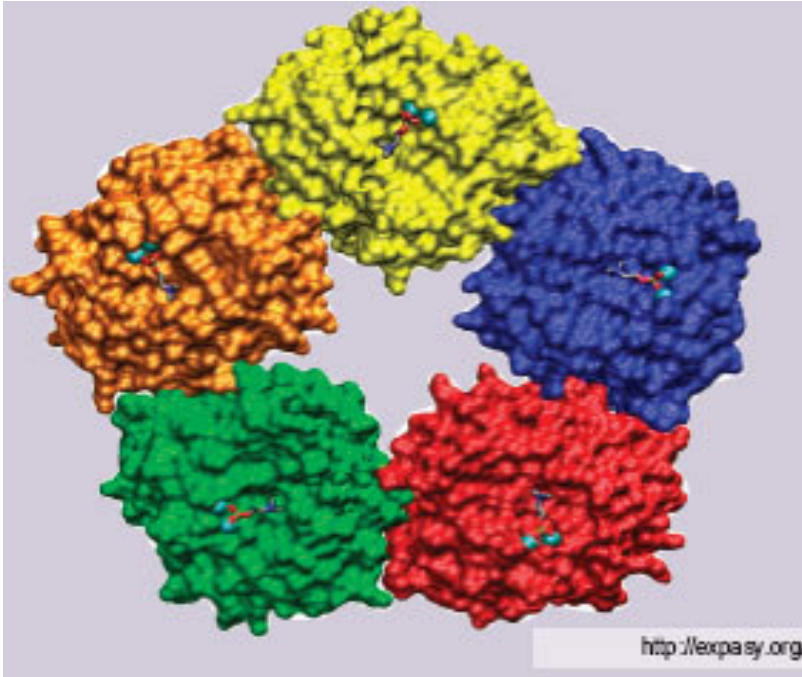
Классификация БОФ по степени увеличения концентрации при травме

Группа	Белок	Концентрация в сыворотке в норме (г/л)
Увеличение концентрации на 20 -60-% в течение 48 час.	С3	0,5 -0,9
	С4	0,1 – 0,4
	Церулоплазмин	0,2 -0,5
Нейтральные реактанты - уровень остается в пределах нормы	IgG	8 -20
	IgA	0,9 – 4,5
	IgM	0,6 -2,5
	α 2-макроглобулин	1,2 -3,2

Уровень СРБ при различных воспалительных процессах

- ❖ **10-30 мг/л** - при вирусных инфекциях, метастазировании опухолей, вялотекущих хронических и некоторых системных ревматических заболеваниях
- ❖ **40-100 мг/л** (до 200 мг/л) - при бактериальных инфекциях, при обострении некоторых хронических воспалительных заболеваниях и при повреждении тканей (хирургические операции, острый инфаркт миокарда)
- ❖ **300 мг/л** - тяжелые генерализованные инфекции, ожоги, сепсис

С-реактивный белок (CRP)



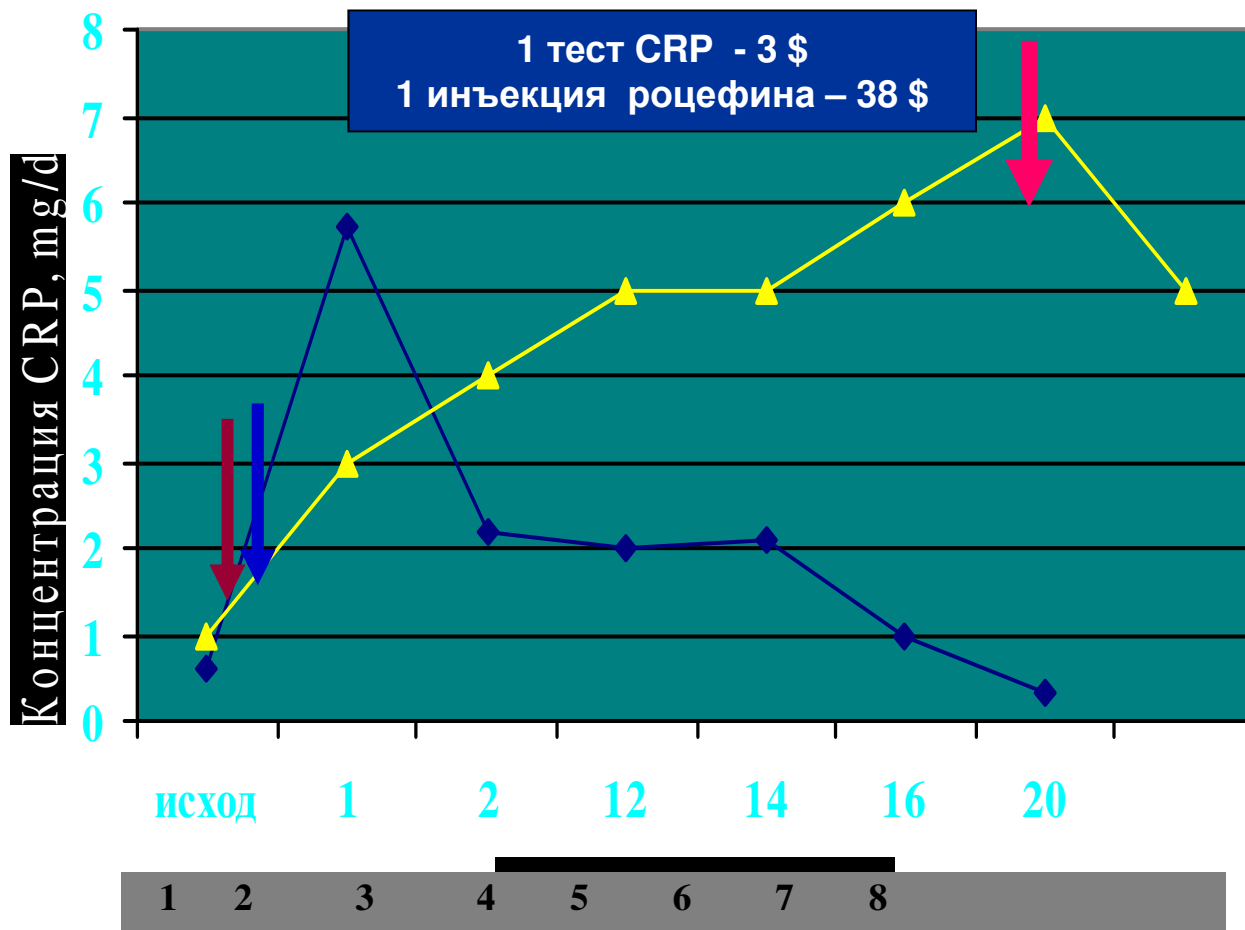
CRP - высокочувствительный маркер острых воспалительных процессов, инфекций и других болезненных состояний, при которых встречаются тканевые поражения (некроз).

Синтез – в печени, под влиянием IL-6

При воспалении:

↑↑ через 6-8 часов,
max – через 48 часов.

Динамика изменения концентрации CRP в ходе антибиотикотерапии



CRP -
лабораторный
скальпель для
«биохимической
эндоскопии»

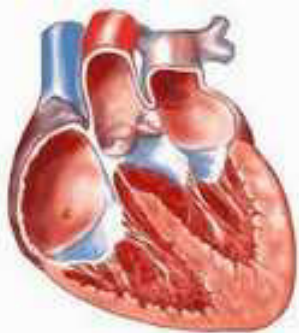


СРБ и сердечно-сосудистая патология

hsCRP важно определять :

- ❖ на ранних стадиях кальцификации клапанов и стенозирования аорты – маркер прогрессирования заболевания
- ❖ при нестабильных формах ИБС – повышенный СРБ предвестник повторной дестабилизации атеросклеротической бляшки
- ❖ после стентирования и шунтирования коронарных артерий – маркер риска рестенозов и повторных эпизодов ишемии миокарда





Концентрация СРБ и риск развития сердечно-сосудистых осложнений

<i>Базовый уровень СРБ</i>	<i>Риск сосудистых осложнений (эксцесс)</i>
< 1,0 мг/л	МИНИМАЛЬНЫЙ
1,1 – 1,9 мг/л	НИЗКИЙ
2,0 – 2,9 мг/л	УМЕРЕННЫЙ
>3 мг/л	ВЫСОКИЙ

W. Koenig (2001)

СРБ и сердечно-сосудистая патология

- При стабильной и нестабильной стенокардии:
 - уровень СРБ коррелирует
 - ✓ со степенью выраженности и тяжестью атеросклероза
 - ✓ с гемостатическими, липидными, инфекционными факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний
- При инфаркте миокарда уровень СРБ коррелирует :
 - ✓ с факторами риска ИБС
 - ✓ с размером участка некроза

Рекомендации Американской ассоциации сердца (2003г.)

1. Прогностическая ценность вч СРБ выше, чем всех остальных маркеров воспаления (класс IIa, уровень доказательности B)
2. Оценка вч СРБ как независимого маркера риска должна производиться у всех пациентов с факторами риска ИБС одновременно с клиническим обследованием, выявлением сопутствующих заболеваний, оценкой функции левого желудочка и других маркеров (включая тропонин), (класс IIa, уровень доказательности C)

Рекомендации Американской ассоциации сердца (2003г.)

4. Уровень вч СРБ не должен определяться во всей взрослой популяции с целью выявления сердечно-сосудистого риска (класс III, уровень доказательности C)

5. Измерение уровня вч СРБ необходимо проводить не ранее, чем через две недели после исчезновения симптомов любого острого заболевания или обострения хронического заболевания. У пациентов с уровнем вч СРБ > 10 мг/л, определяющимся при повторном исследовании через 2 недели, необходимо исключить наличие воспалительных заболеваний (класс IIa, уровень доказательности B)

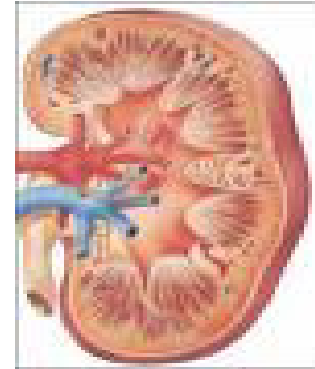
Table 1 - Risk of MI in terms of increased apo B/apo A-I ratios

	Low risk	Moderate risk	High risk
Men	0.40 – 0.69	0.70 – 0.89	0.90 – 1.10
Women	0.30 – 0.59	0.60 – 0.79	0.80 – 1.00

Adapted from AMORIS¹¹ and INTERHEART¹¹ studies.

Микроальбуминурия

Микроальбуминурия –маркер эндотелиальной дисфункции - признан независимым фактором риска сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности.



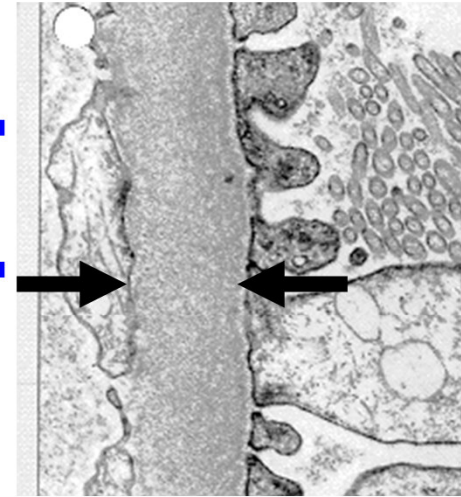
В физиологических условиях прохождение белков через клубочковый фильтр определяется:

- размером пор базальной мембраны,
- молекулярной массой белка (белки М.М. более 60 кДа задерживаются в плазме, белки, имеющие М.М. менее 15 кДа свободно фильтруются),
- формой и электрическим зарядом молекулы белка,
- градиентом концентрации белка в плазме и почечном фильтрате.



Шпросвет капсулы

нефропатии
при нарушении
гемодинамики



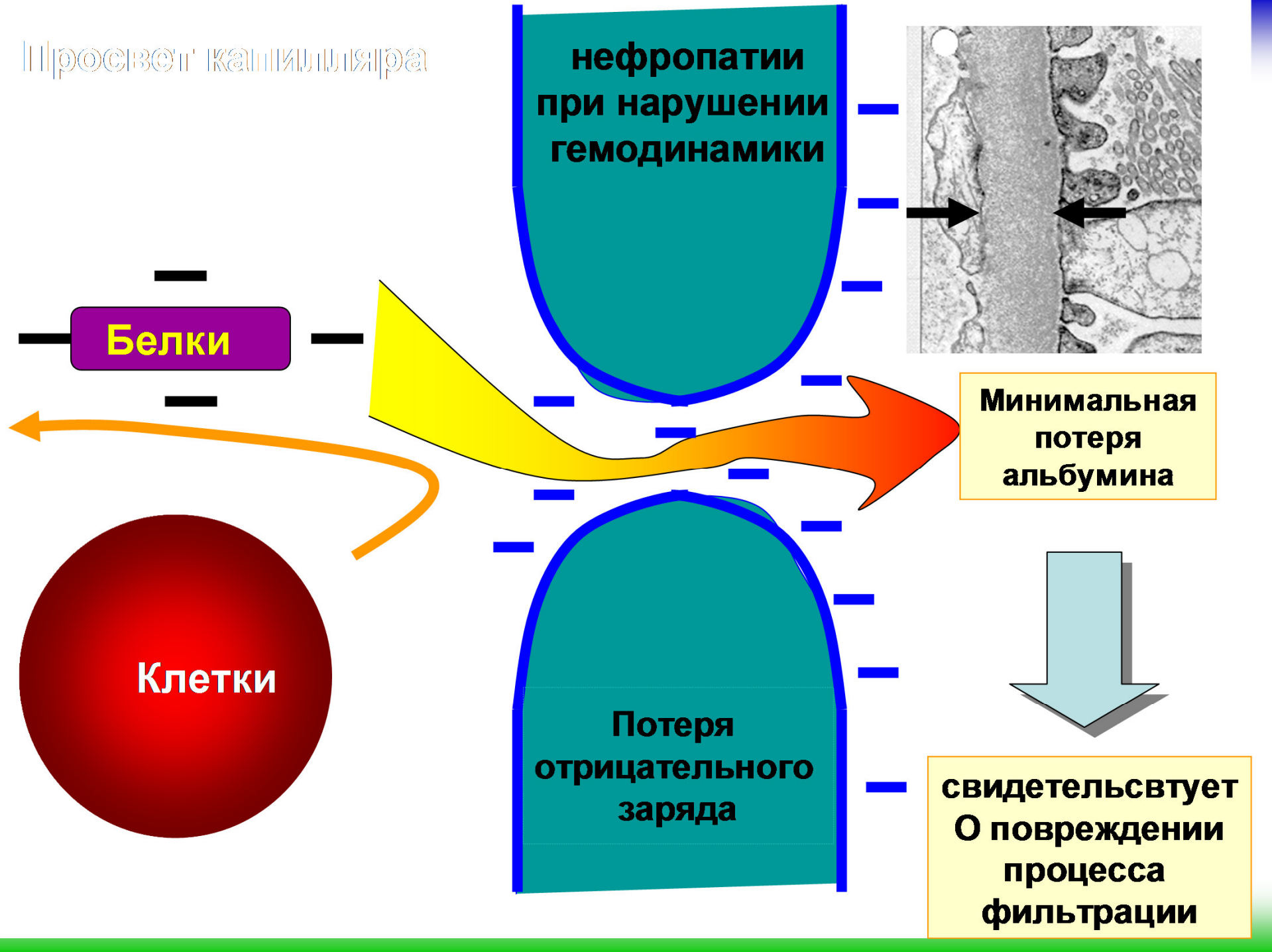
Белки

Минимальная
потеря
альбумина

Клетки

Потеря
отрицательного
заряда

свидетельствует
О повреждении
процесса
фильтрации



Индексация альбуминурии/протеинурии

Индексация, описание и границы (альбумин, мг/креатинин, г)

A0	A1	A2	A3	A4
Оптимальная	Повышенная	Высокая	Очень высокая	Нефротическая
<10	10-29	30-299	300-1999*	≥2000**

* - соответствует суточной протеинурии
>0,5 г

** - соответствует суточной протеинурии
>3,5 г.

Рекомендуемая частота обследований пациентов с ХБП в зависимости от ее стадии и индекса альбуминурии

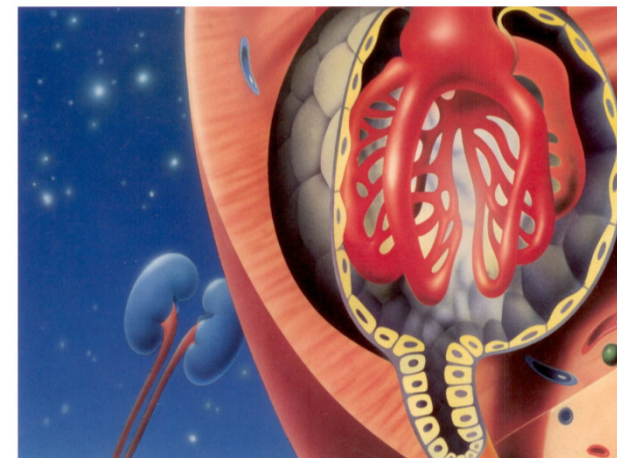
Стадия ХБП	Индекс альбуминурии				
	A0	A1	A2	A3	A4
1-2	Ежегодно	Ежегодно	ежегодно	не реже 6 мес	не реже 3 мес
3А - В	не реже 6 мес	не реже 6 мес	не реже 6 мес	не реже 3 мес	не реже 3 мес
4*	не реже 3 мес	не реже 3 мес	не реже 3 мес	не реже 6 нед	не реже 6 нед
5*	не реже 6 нед	не реже 6 нед	не реже 6 нед	не реже 6 нед	не реже 6 нед

Влияние факторов различного генеза на уровень альбумина в моче

Повышение концентрации	Снижение концентрации
Гематурия	Ингибиторы АПФ
Инфекции мочеполовых путей	Нестероидные противовоспалительные препараты
Лихорадка	Низкомолекулярный гепарин
Высокобелковая диета	Низкобелковая диета
Повышенная физическая нагрузка	
Загрязнение вагинальным (уретальным секретом)	

Алгоритм определения концентрации альбумина в моче

- Определение суточной потери белка с мочой
- В пробах с низкой ($< 400\text{мг/сут}$) или нулевой концентрацией белка определять уровень альбумина иммунотурбидиметрическим методом
- При необходимости (по просьбе клиницистов) определять альбумин в пробах с высокой концентрацией общего белка в разведении



Сывороточный амилоид А (А-SAA)

Нормальный белок сыворотки

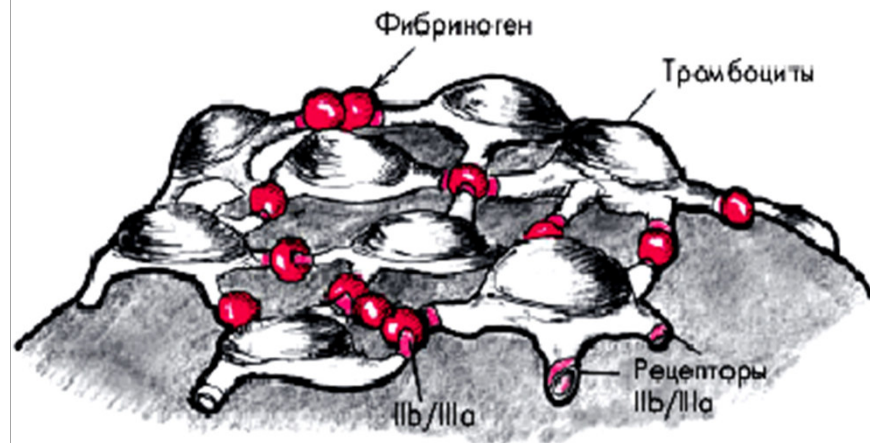
Синтезируется гепатоцитами

Индуктор – IL-1

Концентрация в сыворотке повышается при:

- Остром воспалении
- Опухолях
- Беременности
- Ревматических заболеваниях

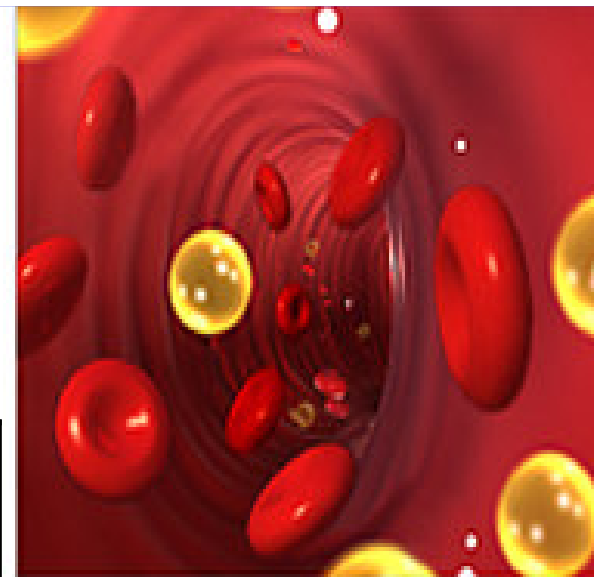
Фибриноген



Чувствительный маркер
воспаления
и некроза тканей

Повышенный уровень	Сниженный уровень
Острое воспаление	Патология печени
Инсульт (1-е сут)	ДВС-синдром
Беременность	Дефицит вит. С , В12
Гипотиреоз	
Инфаркт миокарда	Хронический миелолейкоз
Прием эстрогенов, оральных контрацептивов	Прием анаболических гормонов, андрогенов , рыбьего жира
Злокачественные опухоли	

Корреляция средних значений концентрации фибриногена с ИБС



#ADA

Пациенты с ИБС	Пациенты без ИБС
3,15 мг/мл (n=109)	2,9 мг/мл (n= 1280)
3,56 мг/мл (n=92)	3,30 мг/мл (n=608)
3,92 мг/мл (n=40)	3,00 мг/мл (n=209)
3,27 мг/мл (n=15)	2,60 мг/мл (n= 1659)

α 1-Антитрипсин

- Высокий уровень
 - прогрессирующие опухоли с метастазами в печень
 - прием эстрогенов
 - беременность (III триместр)

- Низкий уровень
 - хронические обструктивные заболевания легких
 - нефротический синдром без воспаления

Врожденный дефект: гепатит новорожденных, эмфизема (молодые, курильщики)

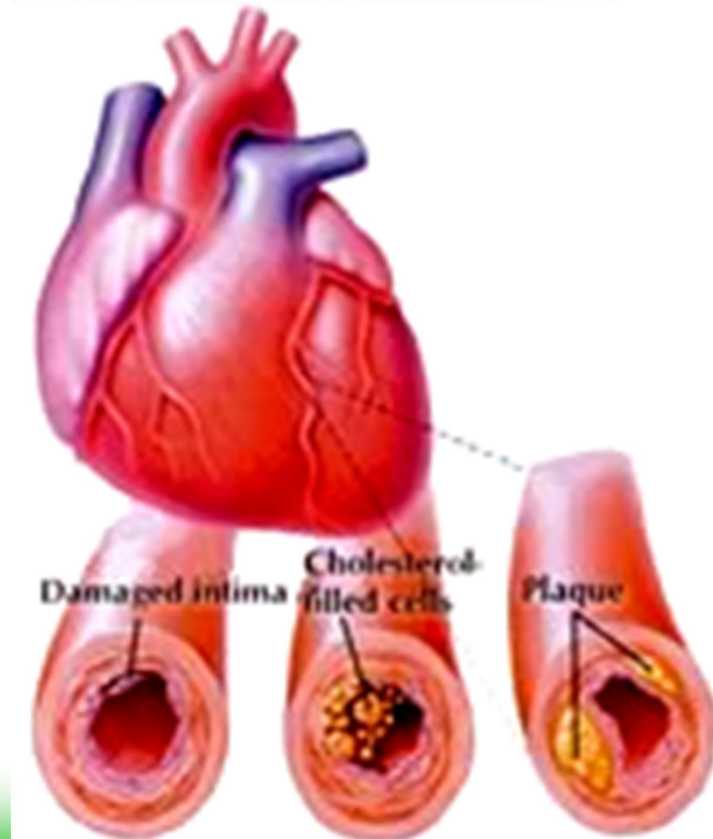
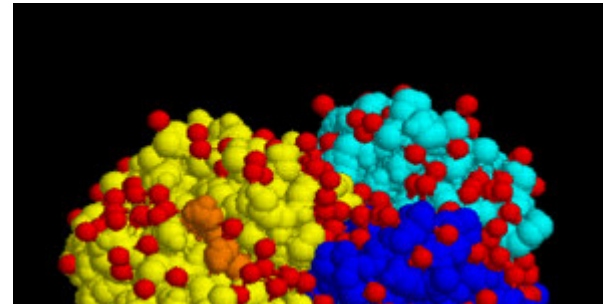


Гаптоглобин

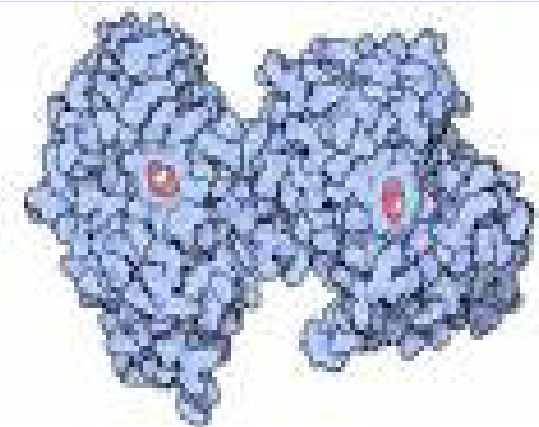
- Белок, связывающий гемоглобин через его белковую часть
- Комплекс удаляется клетками ретикулоэндотелиальной системы
- Ингибирует свободно-радикальные реакции - перекисное окисление липидов и разложение перекиси водорода
- Высокая концентрация – воспаление, аутоиммунные заболевания, болезнь Ходжкина, опухолевый рост, кортикостероидная терапия
- Низкая концентрация - внутри/внесосудистый гемолиз, патология печени, терапия эстрогенами и /или контрацептивами. У хирургических больных – показатель скрытого гемолиза

Гаптоглобин и сердечно-сосудистая патология

- ❖ Уровень гаптоглобина коррелирует со степенью тяжести поражения сердца при ИБС
- ❖ Установлена взаимосвязь уровня гаптоглобина
 - с размерами инфаркта миокарда, характером поражения миокарда и наличия осложнений
 - степенью поражения сердечной мышцы при ИБС



Трансферрин



- гликопротеин, обратимо связывающий железо и переносящий его с током крови по организму.

Высокий уровень	Низкий уровень
Дефицит железа	Воспалительные процессы
Прием эстрогенов	Цирроз печени.
Прием андрогенов	Ожоги
Прием глюкокортикоидов	Гемохроматоз
Прием оральных контрацептивов.	Злокачественные опухоли

Орозомукоид – α -1-кислый гликопротеин

Высокий уровень	Низкий уровень
Острая фаза воспаления	Прием эстрогенов
Рецидив злокачественных новообразований	

- Инфаркт миокарда: концентрация орозомукоида коррелирует с площадью некроза миокарда



Преальбумин

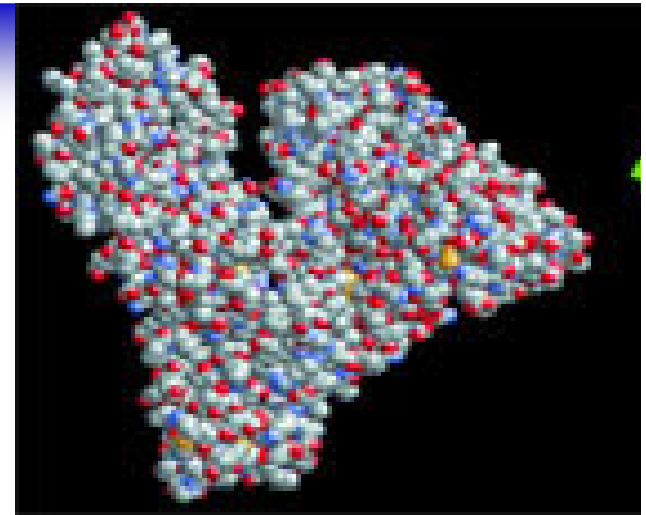
- Отрицательный белок острой фазы
- Образует комплексы с ретинолом и его связывающим белком , препятствуя потере ретинола с мочой

Повышенный уровень: клубочковые и канальцевые протеинурии, терапия преднизолоном, алкоголизм

Пониженный уровень: острофазный ответ, заболевания печени, недостаточность питания

Период полужизни – 2 дня → оценка нутрицидного статуса у пациентов с/без ХПН

ПРЕАЛЬБУМИН → ТРАНСФЕРРИН → АЛЬБУМИН



Лабораторные критерии недостаточности питания

Показатель	Степень недостаточности питания		
	Лёгкая	Средняя	Тяжёлая
Альбумин, г/л	35-30	30-25	<25
Преальбумин, мг/л	-	150-100	<100
Трансферрин, г/л	2-1,8	1,8-1,6	<1,6
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	1,8-1,5	1,5-0,9	<0,9

Система комплемента

- Комплемент – это система сывороточных белков, которая может активироваться в результате взаимодействия некоторых инициальных компонентов системы с комплексами антиген-антитело или с другими активирующими систему агентами.

Изменение концентрации С3 при патологии

С3↑ при:
инфаркте миокарда
ревматизме, амилоидозе
онкологических заболеваниях
вирусном гепатите
пневмококковой пневмонии
язвенном колите
ревматоидном артрите

С3↓при:
остром гломерулонефрите,
СПИДе
эндокардите,
малярии
бактериальном сепсисе
паразитемии
первичном биллиардном циррозе печени

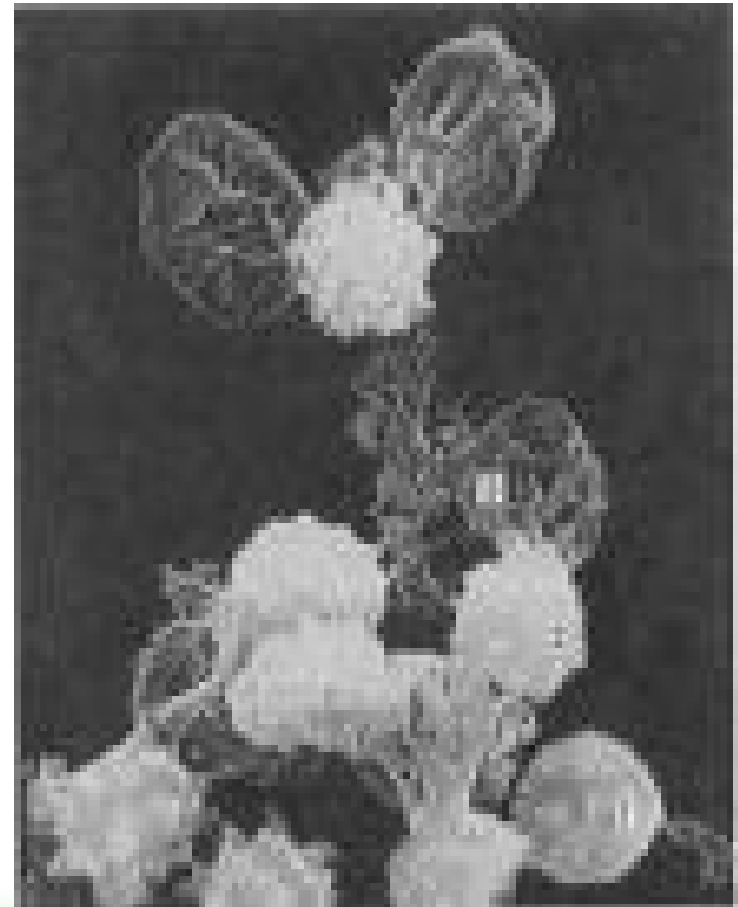
Лабораторные алгоритмы

- **Оценка функционального состояния печени:**
альбумин/преальбумин сыворотки
- **Оценка воспалительного ответа, гемолиза, влияния стероидной терапии:**
трансферрин, СРБ, орозомукоид, гаптоглобин
- **Оценка риска кардиоваскулярных заболеваний:**
 - hsСРБ, гомоцистеин, альбумин/креатинин мочи
 - hsСРБ, холестерин, ЛПВП, ЛПНП
- **Выявление анемии:**
трансферрин, СРБ

Оценка гемолиза *in vivo*

Гаптоглобин и орозомукоид

- ↑↑ - выраженный гемолиз
- ↑ Орозомукоид и N гаптоглобин →
реакция острой фазы с умеренным гемолизом *in vivo*



Оценка реакции острой фазы с помощью α 1-кислого гликопротеина, α 1-антитрипсина, СРБ

	α 1 кислый гликопротеин	α 1-антитрипсин	СРБ
Реакция острой фазы	↑	↑	↑
Повышенный уровень кортикостероидов	↑	=	=
Повышенный уровень эстрогенов	=	↑	=
Начало реакции острой фазы	=	=	↑
Стихание реакции острой фазы	↑	↑	= ↑

Повышение уровня белков острой фазы при бактериальной инфекции новорожденных

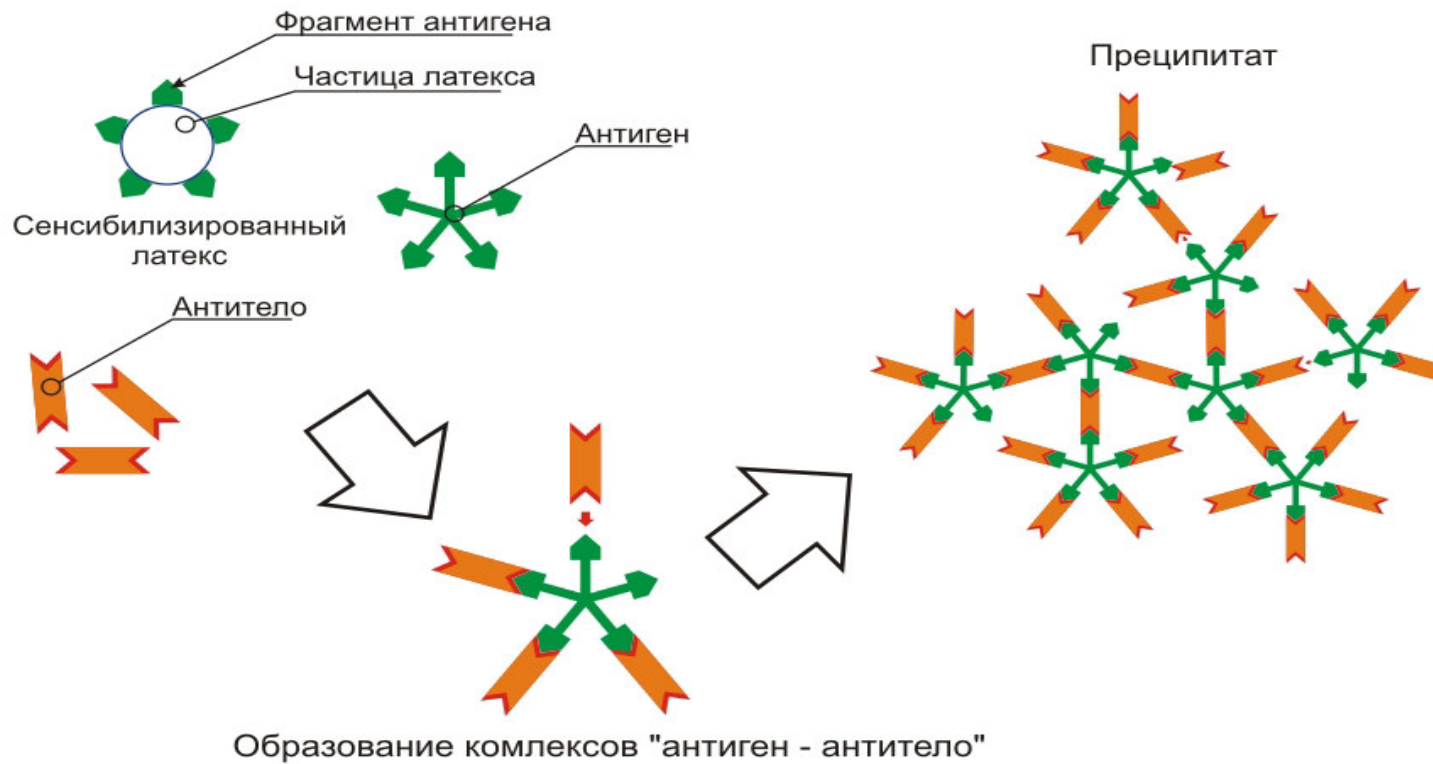
α 1-кислый гликопротеин	171 %
α 1-антихимотрипсин	171 %
СРБ	180 %
Гаптоглобин	169 %

Метод иммунотурбидиметрии

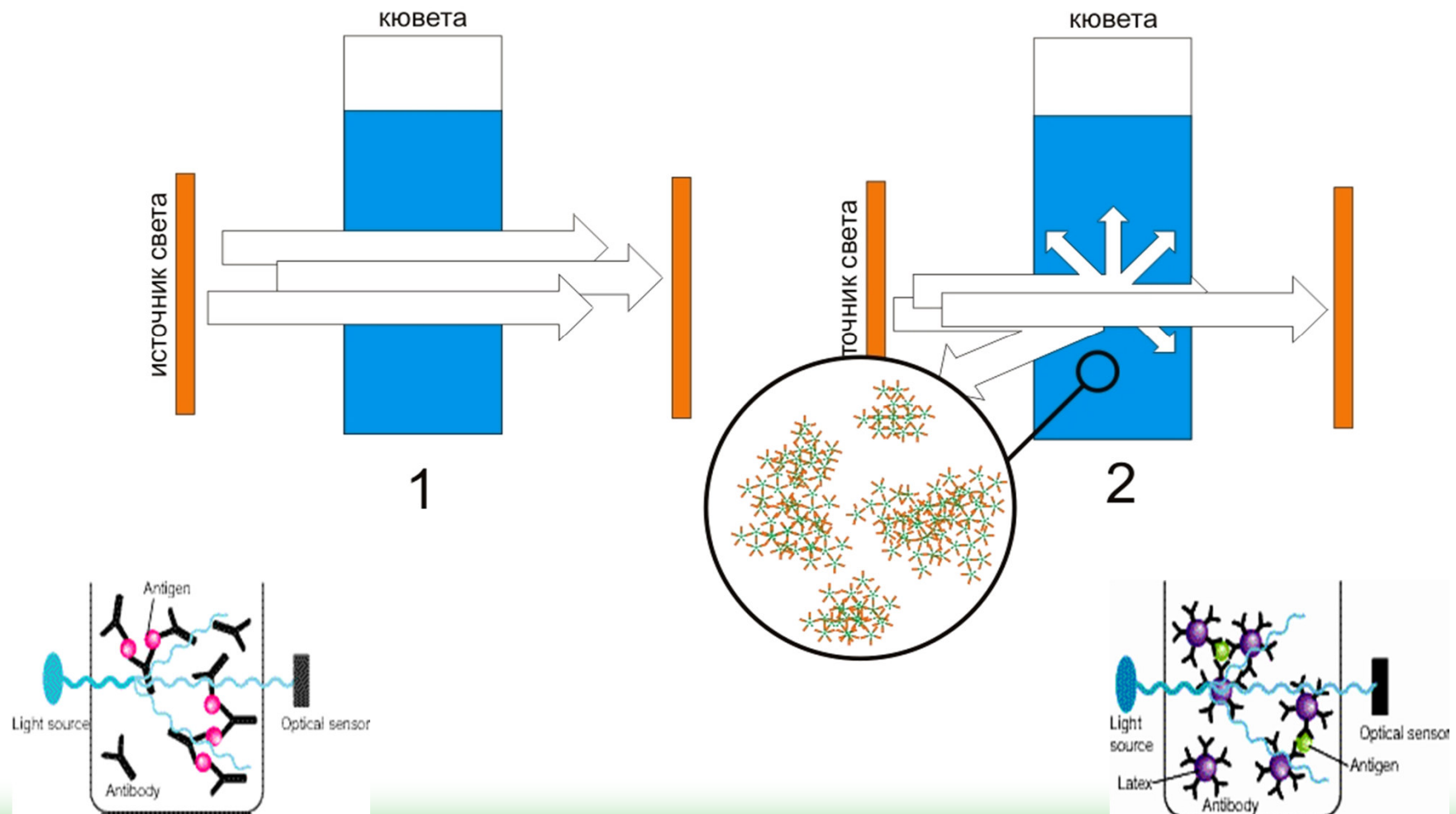
Метод иммунотурбидиметрии основан на фотометрической оценке результатов реакции между белками и антителами к ним, происходящей в жидкой фазе.

- **На скорость реакции влияют:**
 - ✓ тип диагностических антител
 - ✓ состав и вязкость реакционной среды
 - ✓ концентрация электролитов
 - ✓ концентрация и локализация антигенных детерминант
 - ✓ время и температура инкубации смеси

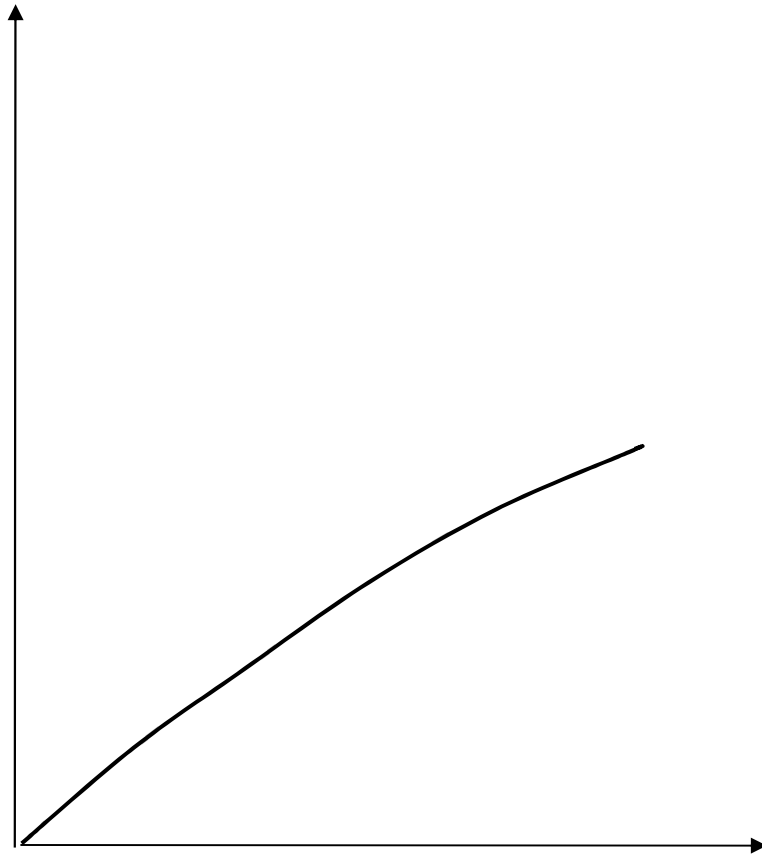
Принцип иммунотурбидиметрии



Измерение оптической плотности растворов



Калибровочный график



Калибровочный график, характерный для определения индивидуальных белков иммунотурбидиметрическим методом.

Для построения графика требуется не менее 5 точек – 5 калибраторов.

Условия, необходимые для проведения анализов турбидиметрическим методом

- Использовать только новые одноразовые наконечники для дозаторов
- Использовать поверенные дозаторы
- Обязательно проставлять контрольные пробы в каждой серии измерений
- Не смешивать реагенты различных лотов
- Не работать с просроченными реагентами
- Не использовать для исследования хилезные, резко гемолизированные и проросшие сыворотки крови; добиваться стандартных условий взятия и хранения образцов

Особенности турбидиметрического метода

- Быстрота выполнения (малые затраты рабочего времени) по сравнению с иммуноферментным методом (ELISA), при этом стоимость набора реагентов значительно ниже
- Малое количество манипуляций
- Минимальный расход биологического материала
- Широкий концентрационный диапазон измерений

Спасибо за внимание!

