

Laboratórna diagnostika zápalového procesu Proteíny akútnej fázy a kapilárová elektroforéza

Reakcia akútnej fázy

Pri zápale reaguje telo nešpecifickou imunitnou odpoveďou, tzv. reakciou akútnej fázy (acute phase reaction, APR).

Sprostredkovateľmi sú cytokíny (napr. interleukín-1, interleukín-6, interferón...). Sú uvoľňované endotelovými bunkami, fibroblastami, makrofágmi a granulocytmi do krvného riečiska, ktorým sa dostávajú do pečene.

Pri infekciách, poškodení tkanív, malígnych procesoch alebo porušení imunitného systému tieto imunokompetentné bunky spolu s kortizolom vyvolávajú v orgáne produkciu cca 20 rôznych proteínov akútnej fázy (acute phase proteins, APPs).

Lokálne pôsobenie APR má ohraničiť infekciu a eliminovať toxíny a škodlivé látky prostredníctvom fagocytózy.

Systémové účinky majú chrániť organizmus pred endotoxínmi a vyvolať obrannú reakciu. Pritom sa zvyšuje aj telesná teplota a dochádza k leukocytóze.

Rozlišujeme pozitívne a negatívne APPs.

U pozitívnych APPs sa koncentrácia v rámci zápalového ochorenia zvyšuje o viac ako 25%. Naproti tomu, u negatívnych APPs klesá.

C-reaktívny proteín

Dôležitým markerom pre rozpoznanie zápalu v akútnej fáze je C-reaktívny proteín (CRP). Ide o glykoproteín, ktorý je vďaka svojej štruktúre schopný viazať veľký počet patogénnych baktérií alebo intracelulárnych antigénov. Rozpoznáva cudzorodé molekuly a prostredníctvom väzby zmení štruktúru molekuly (opsonizácia baktérií). Následne je možná aktivácia komplementového systému,

stimulácia fagocytózy a produkcia protizápalových cytokínov.

Meranie koncentrácie CRP tak slúži na rozpoznanie mikrobiálnych infekcií, akútnych nekrotických lézií tkanív pri traumách, operáciách a autoimunitných ochorení, ktoré sú spojené so zápalom (napr. reumatoidná artritída, imunitne sprostredkovaná vaskulitída). Najpotentnejším stimulom je bakteriálna infekcia.

Pri akútnej infekcii alebo traume sa začína produkcia CRP v plazme po 6h, maximum dosiahne po 48h, klesá s polčasom rozpadu 48h. Rozsah poškodenia tkanív alebo zápalu určuje výšku nárastu CRP. Po úspešnej terapii však takisto rýchlo klesá.

Z tohto dôvodu je CRP vynikajúcim markerom pre posúdenie úspešnosti cielenej antibiotickej terapie u psa.

Okrem toho reaguje CRP výrazne skôr ako leukocyty, ktoré potrebujú niekedy až tri dni, kým dôjde k ich vzostupu.

U mačky sa zdá, že CRP sotva reaguje pri zápalovej reakcii, preto je pre diagnostiku zápalu nevhodný.

Sérový amyloid A

SAA je APP s nízkou molekulovou hmotnosťou, ktorý sa v plazme vyskytuje naviazaný na High Density Lipoprotein (HDL). Je to prekursor amyloidného proteínu A, hlavného proteínu a-amyloidu. V rozhodujúcej miere sa podieľa na rozvoji amyloidózy a iných chronických zápalov.

Po stimulácii interleukínom-6 sa syntetizuje v pečeni v rámci APR.

Diagnosticky sa SAA uplatňuje pri rozpoznávaní vírusových a bakteriálnych zápalov a tiež nemikrobiálnych „low grade“ zápalov.

SAA sa zvyšuje cca 8h po začiatku APR, hornú hranicu referenčného rozmedzia však prekračuje skôr ako CRP. Avšak je zvýšený častejšie ako CRP aj pri ľahších infekciách, napr. pri mnohých vírusových infekciách.

Reaguje citlivejšie pri „low grade“ zápaloch a súži tak na odlíšenie vírusových zápalov od bakteriálnych.

Diagnosticky využiteľný je u koňa, psa, mačky a hovädzieho dobytká.

Haptoglobín

Haptoglobín je α -glykoproteín a tvorí sa v pečeni, ale aj v pľúcach, tukovom tkanive, slezine a v obličkách. Tento APP viaže v plazme voľný hemoglobín (fHb), ktorý je toxický a proinflatórnny. fHb obsahuje železo, ktoré, keď sa vyskytuje neviazané, pôsobí škodlivo tvorbou kyslíkových radikálov. Pri intravazálnej hemolýze bráni haptoglobín strate železa obličkami viazaním fHb. Okrem toho chráni Hp bunky pred oxidatívnym poškodením. Hp má inhibičný účinok na chemotaxiu granulocytov, fagocytózu a baktericídne pôsobenie. Ďalej sa zdá, že inhibuje proliferáciu mastocytov.

Diagnostickú výpovednú hodnotu majú znížené a zvýšené koncentrácie Hp. Znížené hodnoty sú indikátorom pre in vivo hemolýzu, zvýšené hodnoty sa vyskytujú pri APR, v spojení so zápalmi, infekciami a autoimunopatiami.

Na ďalšiu diagnostiku sa používa u hovädzieho dobytká.

Elektroforéza sérových proteínov

Ďalším dôležitým kritériom pre diagnózu a posúdenie priebehu akútnych a chronických zápalov je elektroforéza. Je prospešná aj pri stanovení monoklonálnych gamapatií a syndrómov so stratou proteínov.

Separácia globulínov nastáva pri alkalickom pH na základe náboja, izoelektrických bodov a molekulárnej hmotnosti proteínov.

Kapilárová elektroforéza

Pri kapilárovej elektroforéze sa oddeľovanie proteínov uskutočňuje v tekutom, alkalickom médiu (pH 9-10) v kapiláre s úzkymi pórmí. Ide o kapiláru s vnútorným priemerom 50-200 μ m, ktorá je vložená do poľa s napätím

cca 7000 V. K separácii dochádza v smere ku katóde na základe náboja a pohyblivosti. V ideálnom prípade tak vznikajú jasné zóny s jednotlivými komponentmi. Neutrálne molekuly tiež putujú ku katóde, avšak neoddelia sa. Frakcie proteínov sa potom na katóde kvantifikujú prostredníctvom UV merania. Zhotoví sa extinkčno-frekvenčná krivka z ôsmich frakcií:

albumín, alfa 1 a alfa 2 globulín, beta 1 a beta 2 globulín (evt. celkový beta), gama globulín. Z výhodného pomeru objem/povrch vyplýva veľmi efektívny proces separácie a dobrá možnosť automatizácie procesu merania.

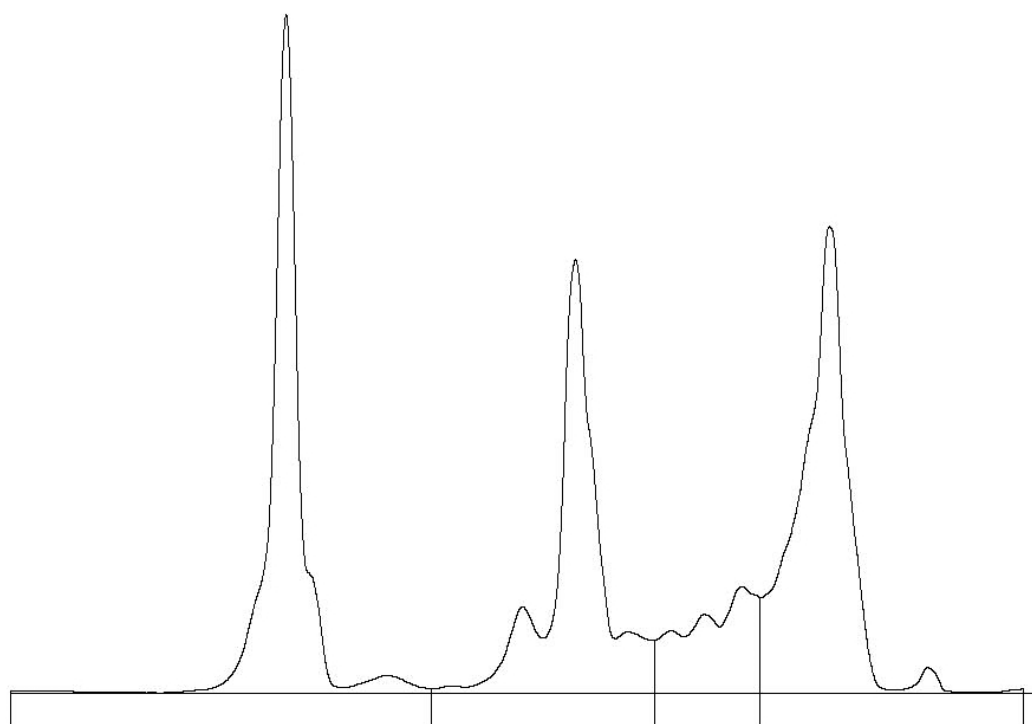
Elektroforéza slúži na zaradenie ochorení alebo skupín ochorení s pomocou tvaru krivky (elektroforeogramu). Okrem toho je možné posúdenie zápalovej aktivity ochorenia a nakoniec je také schematické zobrazenie užitočné pri hodnotení priebehu ochorenia.

Obrázok: Kapilárová elektroforéza

Albumínová frakcia:	-prealbumín -albumín - α -lipoproteín (HDL)
α -globulín	alfa 1: - kyslý α -glykoproteín - α -antitrypsín alfa 2: - α -makroglobulín -haptoglobín
β -globulín	beta 1: -hemopexín -transferín beta 2: -C4 komplement -CRP -C3 komplemet
γ -globulín	imunoglobulíny

Obrázok 1:

Pes s akútnym zápalom (α -globulín) a produkciou imunoglobulínov (beta-, gamaglobulíny)



Kapilárová elektroforéza

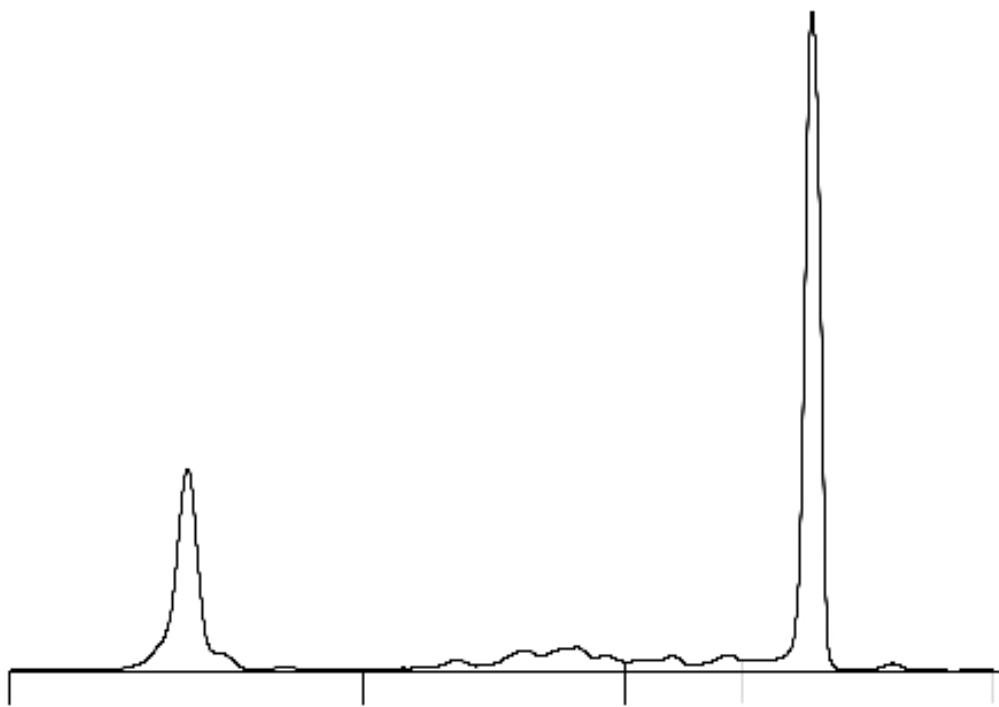
<u>Frakcia</u>	<u>%</u>	<u>g/l</u>
albumín	28,7	41,33
alfa	27,5	39,60
beta	10,7	15,41
gama	33,1	47,66

<u>Pes</u>	
albumín	47-59%
α -globulín	9-15%
β -globulín	14-24%
γ -globulín	8-18%

Alb/glob = 0,40

Celkové proteíny 144 g/l

Obrázok 2:
Mačka s monoklonálnou gamapatiou (gamaglobulín)



Kapilárová elektroforéza

<u>Frakcia</u>	<u>%</u>	<u>g/l</u>	<u>Mačka</u>	
albumín	27,3	44,09	albumín	45-60%
alfa	11,8	19,06	α-globulín	8-15%
beta	5,5	8,88	β-globulín	10-20%
gama	55,4	89,47	γ-globulín	10-28%

Alb/glob = 0,38

Celkové proteíny 161,5 g/l