

Proteine II.

Explorarea proteinelor plasmaticice.

Dozarea proteinelor totale prin metoda biuretului. Dozarea albuminei prin metoda colorimetrică. Separarea proteinelor plasmaticice prin electroforeză.

Proteine plasmaticice: funcții biologice, valori normale. Albumine, globuline. Raport albumine globuline. Semnificație diagnostică. Frațiuni proteice separate prin electroforeză. Disproteinemii

Proteinele sunt componente fundamentale ale plasmei, fiind identificate mai mult de 100 de fracțiuni cu funcții biologice variate. Concentrația proteinelor plasmaticice poartă numele de *proteinemie*.

Proteinemia este unul dintre parametrii sanguini menținuți constanți prin mecanisme complexe care realizează echilibrul între cantitatea de proteine sintetizate de ficat sau intestin și cea utilizată de organism.

Valoarea normală a proteinemiei la persoanele adulte este cuprinsă între **6,5 – 8,5 g/100 ml** plasmă. Măsurarea proteinemiei furnizează informații generale despre gradul de afectare a unui organ.

Variațiile proteinemiei sunt determinate de două cauze principale:

- modificarea volumului apei din plasmă; hiperproteinemia apare în cazul unei deshidratări ca urmare a hemoconcentrării, iar hipoproteinemia apare în cazuri de hemodiluție;
- modificarea concentrației uneia sau mai multor proteine indici ai unor stări patologice.

Se înregistrează hipoproteinemie în afecțiunile însoțite de pierderi de proteine (renale, digestive) sau de un bilanț azotat negativ.

Hiperproteinemia este mai rar întâlnită, pe lângă hemoconcentrarea prin deshidratare, un alt exemplu fiind producerea excesivă a γ -globulinelor.

Variații fiziologice pot să apară în funcție de: vârstă, sarcină, efort, ciclu menstrual, temperatură.

Variații patologice ale proteinemiei:

Hipoproteinemii	Hiperproteinemii
Afecțiuni hepatice: ciroză hepatică, intoxicații cu benzen etc. Afecțiuni renale: glomerulonefrite, sindrom nefrotic Stări de șoc după arsuri, hemoragii Colagenoze Sindrom de malnutriție	Stări de deshidratare: vărsături, diaree Diabet zaharat sau insipid Infecții acute și cronice Hepatite virale evolutive Mielom multiplu Macroglobulinemia Waldenström

Din totalitatea metodelor de dozare a proteinelor din lichidele biologice, pentru determinarea cantitativă a proteinelor totale plasmaticice se folosesc metode colorimetrice: biuretului, de legare a unor coloranți (Coomassie blue, albastru de bromfenol, verde de bromcrezol).

Investigarea clinică a proteinelor plasmaticice presupune realizarea următoarelor determinări:

- dozarea proteinelor totale plasmaticice;
- dozarea albuminei și determinarea raportului albumine/globuline;
- dozarea fibrinogenului plasmatic;
- separarea electroforetică a proteinelor plasmaticice pentru stabilirea raportului între diferitele tipuri de proteine;
- investigarea prin metode imunochimice a unor proteine specifice.

Proteinele plasmatice se diferențiază nu numai prin funcțiile lor specifice, dar și prin anumite proprietăți determinate de conținutul diferit în aminoacizi, ceea ce le conferă posibilitatea de a se încărca electric diferit.

Între diversele proteine plasmatice există un echilibru dinamic, reglat prin mecanisme de control complexe. În diverse stări patologice apar modificări ale raporturilor dintre diferitele componente, denumite *disproteinemii*.

Prin *precipitare selectivă cu săruri neutre sau solvenți organici* s-au separat următoarele fracțiuni majore: *albumină* -3,5 –5,5 g/100ml;

globuline-1,5 – 3,5 g/100ml;

fibrinogen- 0,2 –0,4 g/100ml plasmă.

Raportul între *albumină* /*globuline* este 1,3-1,9.

Albumina plasmatică, datorită proprietăților sale, conferă o stabilitate coloidală. O micșorare a albuminiei, asociată cu o creștere a unei fracțiuni globulinice, determină o labilizare a plasmei și duce la precipitarea proteinelor în condiții în care plasma normală ar fi stabilă. Din acest motiv, pentru evidențierea calitativă a modificării raportului între fracțiunile proteice, s-au folosit *teste de disproteinemie* care puteau să evidențieze creșterea unei fracțiuni globulinice (testul cu timol, testul Kunkel cu ZnSO_4) sau scăderea albuminei (testul de labilitate coloidală cu HgCl_2).

Pentru aprecierea exactă a modificării diferitelor fracțiuni proteice este necesară:

- dozarea separată a albuminei și a globulinelor pentru a afla raportul albumină/globuline;
- separarea electroforetică a proteinelor plasmatice;
- dozarea specifică a unor globuline.

Concentrația globulinelor se poate și calcula prin diferența între proteinele totale și albumină

Albumina este proteina cu cea mai mare concentrație plasmatică, îndeplinind două funcții biologice importante: *contribuie la presiunea coloid-osmotică* ce menține echilibrul fluidelor în țesuturi și *asigură transportul diferitelor substanțe în sânge* (ioni Ca^{2+} și Mg^{2+} , bilirubină, acizi grași, unele medicamente, coloranți).

Variații fiziologice se înregistrează în funcție de vârstă (valoarea medie este mai mare la naștere, scade după 9 luni; valori medii scăzute apar la persoanele peste 60 ani).

Variațiile patologice ale albuminiei se caracterizează prin *hipoalbuminemie*, *analbuminemie* (absența albuminei) sau *bisalbuminemie* (prezența a două benzi pentru albumină la electroforeză, determinată de o albumină cu caracteristici moleculare neobișnuite).

Hipoalbuminemie se întâlnește în: malnutriție, afecțiuni hepatice cronice (când crește concentrația globulinelor pentru a menține proteinemia în limite acceptabile), afecțiuni digestive, afecțiuni renale.

Fibrinogenul este o altă proteină plasmatică ce se investighează deoarece modificări ale concentrației acesteia apar în unele afecțiuni. *Hiperfibrinogenemie* însoțește procesele inflamatorii (pneumonie, pleurezii, reumatism polarticular acut), traumatismele, neoplasmul hepatic, afecțiunile coronariene. *Hipofibrinogenemie* apare în afecțiuni hepatice grave, leucemii, neoplasm de pancreas.

Modificări semnificative ale raportului albumină/globuline s-au observat, mai ales, în afecțiuni renale și hepatice, dar și în cazul unor boli mai rare caracterizate prin creșterea exagerată a unor globuline (de ex., mielom multiplu).

Tipuri de disproteinemie

1. Disproteinemie reactivă din inflamația acută:

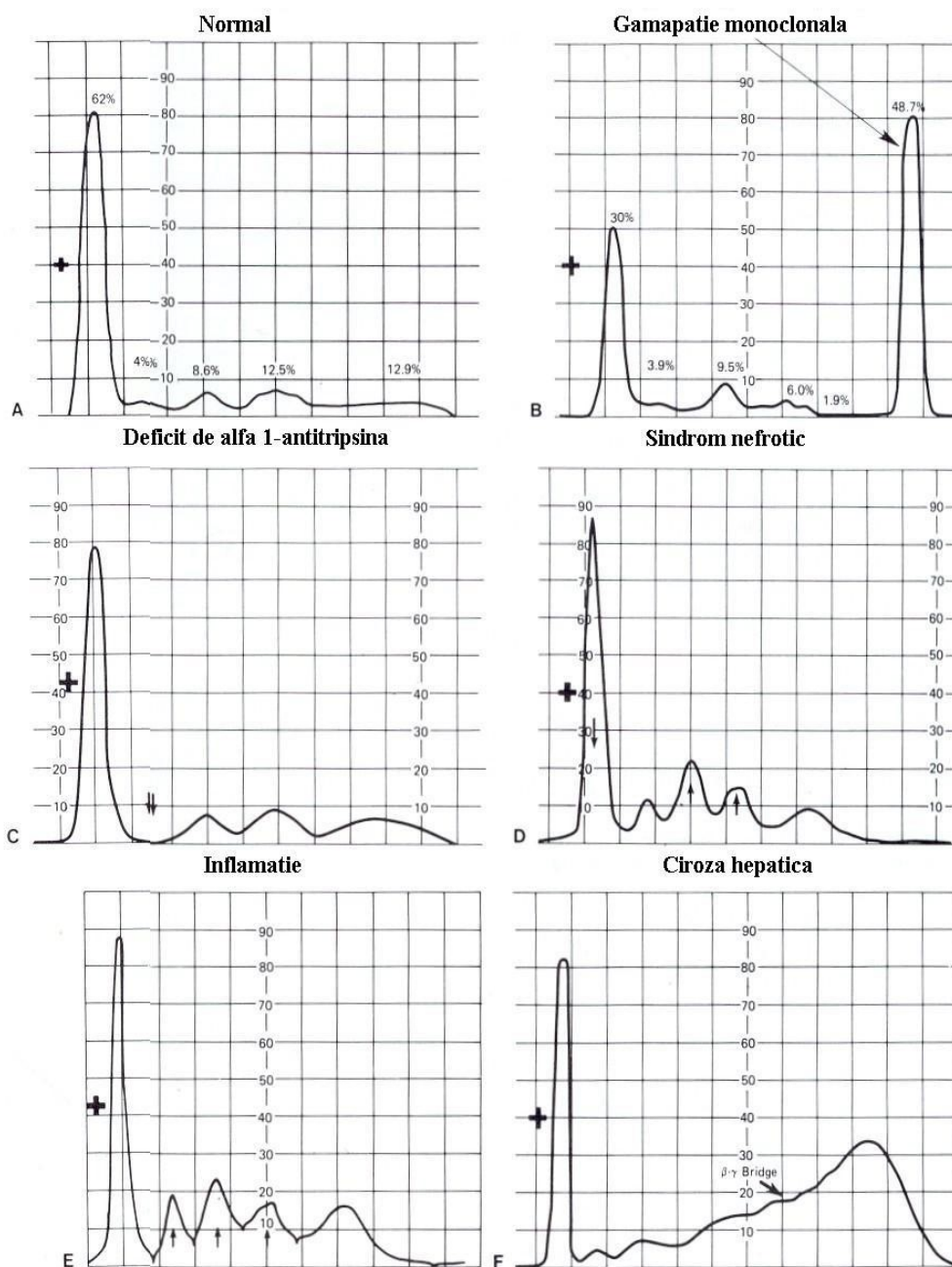
Proteinele de fază acută (PFA) sunt proteine a căror concentrație plasmatică se alterează ca răspuns diverse stări inflamatorii: infecții, stări postoperatorii, necroză tisulară. Un grup dintre acestea reprezintă *PFA pozitive* deoarece concentrația plasmatică este crescută, iar alt grup reprezintă *PFA negative*, concentrația plasmatică scăzând în situațiile amintite.

PFA pozitive	PFA negative
α 1-antitripsina α 1-antichimotripsina haptoglobina	Albumina Prealbumina Transferina

Proteina C reactivă Ceruloplasmina Fibrinogenul Componenta C3 a complementului Proteina serică A a amiloidului (orosomucoid)	Proteina care leagă retinolul (RBP)
--	-------------------------------------

Determinarea PFA, în special proteina C reactivă, este utilizată pentru detectarea și urmărirea pacienților cu afecțiuni inflamatorii acute.

- La electroforeză, cresc α_1 și α_2 -globulinele, scade albumina, crește fibrinogenul;
2. Disproteinemia reactivă din inflamația cronică: cresc γ -globulinele;
 3. Disproteinemia prin pierdere renală de proteine: scad proteinele totale, albumina, cresc marcat α_2 -globulinele și, mai puțin, β -globulinele, iar în formele severe scad γ -globulinele;
 4. Disproteinemia prin pierdere enterală de proteine: scad proteinele totale, cresc α_2 -globulinele;
 5. Disproteinemia din afecțiunile hepatice depinde de etiologia și de stadiul evolutiv al afectării hepatice: hepatite virale – scade albumina, cresc γ -globulinele moderat;
hepatite cronice – cresc difuz γ -globulinele;
ciroză hepatică – apare o “punte $\beta - \gamma$ ”;
neoplasm hepatic – în stadii mai avansate scade albumina, cresc α_1 și γ - globulinele, fiind prezentă α -fetoproteina;
 6. Disproteinemia cu hipergamaglobulinemie monoclonală:
mielom multiplu; macroglobulinemie Waldenström;
boala lanțurilor grele.



Aspectul densitometric al proteinelor serice în condiții normale și patologice

Separarea proteinelor serice prin electroforeză în gel de agaroză

Principiu: Sub acțiunea unui câmp electric exterior, proteinele plasmatice se separă în mai multe fracțiuni în funcție de viteza de migrare determinată de încărcarea electrică diferită. Se lucrează la valori de $pH > 8$, pentru ca nici o proteină să nu fie la pH izoelectric.

Fracțiunile separate între catod (-) și anod (+) se colorează cu un colorant proteinofil ce se atașează grupărilor aminice ale unor aminoacizi din structura proteinelor.

Imaginea obținută după separare și colorare poartă denumirea de *electroforegramă*.

Reactivi:

1. Gel de agaroză pregătit astfel: 0,8 g agaroză se lasă peste noapte în 50 ml apă bidistilată într-un vas acoperit. A doua zi se adaugă 50 ml tampon veronal-medinal cu pH 8,6 și se încălzește pe baia de apă până la dizolvarea agarozei. Agaroză fierbinte se filtrează printr-un tifon;
2. Tampon veronal-medinal pH 8,6, $\mu = 0,05$: 1,84 g veronal + 10,3 g medinal se aduce la un litru cu apă distilată și se controlează pH -ul;

3. Amidoschwarz 1%: 1 g amidoschwarz 10D, 450 ml alcool etilic, 150 ml acid acetic glacial, 500 ml apă distilată.

Mod de lucru:

Aplicarea probelor. Pe lame de microscop, se toarnă 3 ml agaroză 0,8% fierbinte. Lamele se lasă pe o suprafață perfect orizontală 5-10 minute pentru întărirea gelului și se folosesc imediat. Se ștanțează un șanț de 6-7 mm paralel cu latura mică a lamei. În șanțul făcut se introduc 4-5 μ l ser de analizat colorat cu albastru de bromfenol pentru urmărirea migrării în câmp electric.

Migrarea probelor. Se plasează lamele pregătite în aparatul de electroforeză. Legătura între lame și soluția tampon din cuve se face prin fâșii de hârtie Whatman.

Se aplică un curent cu intensitatea de 3 mA /cm lamă.

Prelucrarea probelor. După terminarea migrării în câmp electric urmează:

- fixarea - 30 minute în baie de acid tricloracetic 10% în acid acetic 5% sau un alt fixator;
- uscarea – preparatele se acoperă cu hârtie de filtru umezită și se lasă la temperatura camerei peste noapte;
- colorarea – lamele uscate se spală cu apă de robinet și se colorează cu amidoschwarz 1 % timp de 1 h. Se spală apoi în trei băi de apă de robinet. Se usucă la aer.

Citirea rezultatelor. Imaginile se interpretează utilizând un integrator sau densitometru ce face determinări cantitative stabilindu-se, pe baza curbelor de distribuție a spoturilor, procentul fiecărei fracțiuni în parte.

La electroforeza în gel de agaroză sau pe film de acetat de celuloză a proteinelor se separă 5 fracțiuni majore distribuite între anod și linia de start în ordinea: *albumină*, α_1 -globuline, α_2 -globuline, β -globuline și γ -globuline.

Procentual, fracțiunile separate sunt repartizate astfel:

- albumina 52 – 68 % din totalul proteinelor plasmatice;
- α_1 -globuline 2,4 – 5,3 %;
- α_2 -globuline 6,6 – 13,5 %;
- β -globuline 8,5 – 14,5 %;
- γ -globuline 10,7 – 21 %.

Aceste fracțiuni nu sunt omogene ele fiind reprezentate de mai multe proteine care au aproximativ aceeași mobilitate electroforetică.

1. Dozarea proteinelor plasmatice prin metoda biuretului

Principiu: Se bazează pe reacția pe care peptidele (care conțin cel puțin două legături peptidice) și proteinele o dau cu ionii de cupru (Cu^{+2}), în mediu alcalin, cu formarea complexului de culoare violet. Intensitatea culorii violet apărute este proporțională cu concentrația proteinelor în proba analizată. Nu este o metodă foarte sensibilă, fiind necesară o concentrație între 1-20 mg/ml.

Reactivi:

1. Reactiv biuret – KI
 - a) Soluție stoc: 4,5 g tartrat de sodiu și potasiu în 40 ml hidroxid de sodiu 0,2 N. Se adaugă amestecând 1,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dizolvat în 10 ml apă, apoi 0,5 g iodură de potasiu și se aduce la 100 ml cu hidroxid de sodiu 0,2 N. Se conservă indefinit, în sticlă brună.
 - b) Diluant: 5 g KI se dizolvă în 1000 ml hidroxid de sodiu 0,2 N. Se conservă indefinit, în sticlă brună. Reactiv de lucru: se diluează 1 volum soluție stoc cu 4 volume diluant. Se poate utiliza o săptămână, păstrându-se ambalat în sticlă brună.
2. Ser fiziologic (NaCl 0,9%);
3. Soluție standard de albumină serică bovină 7%.

Mod de lucru:

Reactivi	Probă	Standard	Martor
Plasmă	0,1	-	-
Ser fiziologic	-	-	0,1
	-	0,1	-

Standard de proteină Reactiv biuret	5	5	5
--	---	---	---

Se agită eprubetele . Se lasă în repaus 30 de minute. Se citesc extincțiile la 546 nm.

Calcul: $\text{g proteină}/100 \text{ ml} = 7 \times (E_P - E_M) / (E_S - E_M)$

2. Dozarea albuminei plasmatice prin metoda cu verde de bromcrezol

Principiu: La legarea sa de verdele de bromcrezol, în mediu acid, albumina determină o modificare a culorii colorantului de la galben-verzui la verde-albăstrui.

Reactivi:

1. Reactiv de culoare: soluție tampon citrat 30 mM pH 4,2 și verde de bromcrezol 0,26 mM, detergent Brij 35: 3 g/l;
2. Standard de albumină 3,5 g/dl.
3. Ser fiziologic (NaCl 0,9 %).

Mod de lucru:

Reactivi	Probă	Standard	Martor
Plasmă	0,02	-	-
Standard de albumină	-	0,02	-
Apă distilată	-	-	0,02
Reactiv	2	2	2

Se amestecă, se lasă 10 minute la temperatura camerei și se citesc extincțiile la lungimi de undă în intervalul 540-628 nm (578 nm).

Calcul: $\text{g albumină}/100 \text{ ml} = 3,5 \times (E_P - E_B) / (E_S - E_B)$

Metoda este liniară până la 8 g albumină/100 ml.