

# VYŠETŘENÍ BÍLKOVIN V KREVNÍM SÉRU A V MOČI. ELEKTROFORÉZA PROTEINŮ.

---

## Témata k zopakování

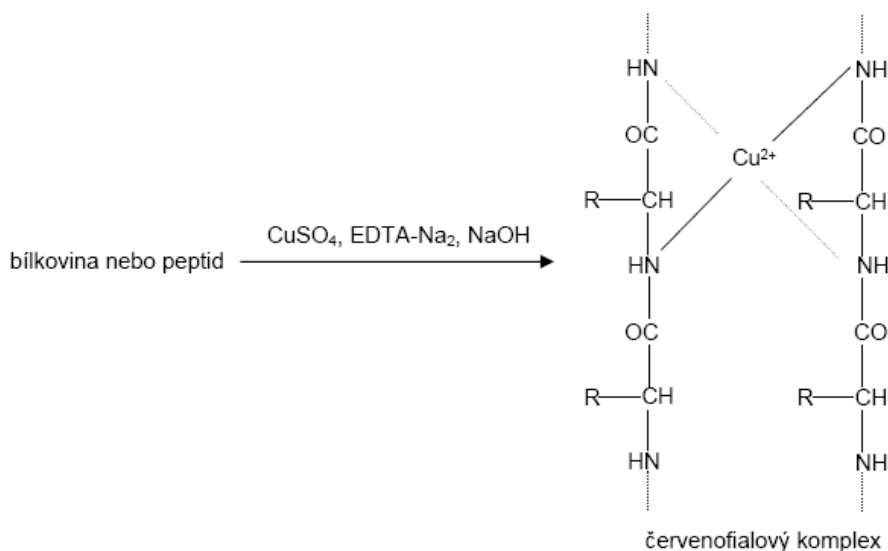
Proteiny v krevní plazmě/séru, jejich funkce. Elektroforéza proteinů krevní plazmy. Proteinurie a její typy.

## Úvod

V krevní plazmě se nachází několik desítek různých bílkovin. Liší se svým zastoupením, funkcí a strukturou. Většina bílkovin plazmy s výjimkou imunoglobulinů je syntetizována v játrech. Z hlediska funkce lze bílkoviny v plazmě klasifikovat do několika skupin: jsou to bílkoviny s transportní funkcí, bílkoviny bránící infekci, bílkoviny zapojené do srážení krve a fibrinolýzy, enzymy a jejich inhibitory, bílkoviny chránící před účinkem volných radikálů a další. Bílkoviny v plazmě mají dále význam pro udržení koloidně-osmotického tlaku a acidobazické rovnováhy, plní rovněž funkci pohotové proteinové rezervy.

## 1 Stanovení celkových proteinů v séru biuretovou reakcí

Látky obsahující minimálně dvě peptidové vazby reagují s ionty  $\text{Cu}^{2+}$  v alkalickém prostředí za vzniku červenofialového komplexu. Měří se absorbance v pásu kolem 550 nm, intenzita zbarvení komplexu je přímo úměrná koncentraci bílkovin.



Biuretové činidlo (např. Erba-Lachema) obsahuje:

síran měďnatý 15 mmol/l – poskytuje  $\text{Cu}^{2+}$  pro tvorbu komplexů s peptidovými vazbami,

NaOH 5 mol/l – alkalizující složka,

EDTA.Na<sub>2</sub> 0,18mmol/l (event. vínan sodno-draselný 32 mmol/l) – chelatační (komplexotvorná) sloučenina, která brání srážení  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .

Po smíchání séra s biuretovým činidlem reaguje alkalický roztok mědi okamžitě s dostupnými povrchovými peptidovými vazbami a reakce dobíhá, jak se postupně obnažují další vazby při denaturaci bílkoviny.

Reakce se nazývá podle biuretu, nejjednodušší sloučeniny, která s měďnatými solemi v alkalickém prostředí reaguje. Biuret ve své molekule obsahuje dvě peptidové vazby:  $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ . Aminokyseliny a dipeptidy nereagují.

## Hodnocení

Referenční rozpětí koncentrace celkových proteinů v krevním séru 65–85 g/l.

K *hypoproteinemii* dochází při poruše proteosyntézy u jaterních chorob, u podvýživy a v průběhu těžkých akutních infekčních chorob nebo rozsáhlých nádorových onemocnění, též při nadměrných ztrátách albuminu v exsudátech nebo moči. Relativní pokles koncentrace nastává při zředění plazmy (objemné infúze nebo zástava vylučovací činnosti ledvin).

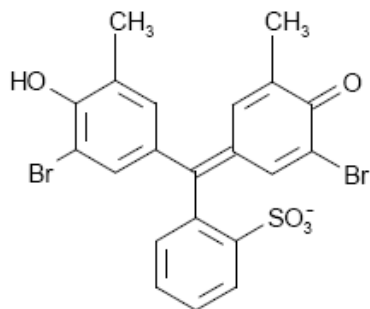
*Hyperproteinemie* je méně častým nálezem. Příčinou bývá dehydratace organismu při nadměrné ztrátě tekutin (dlouhodobé žíznění, vysilující průjmy, zvracení), nebo zvýšená syntéza imunoglobulinů (např. v průběhu chronických zánětů nebo u tzv. gamapatií).

## 2 Stanovení albuminu v séru

Albumin je kvantitativně nejvýznamnější protein krevní plazmy. Jeho hlavní funkce jsou udržení onkotického tlaku krevní plazmy, pufrací účinek a funkce transportní. Je syntetizován v hepatocytech a odtud uvolňován do plazmy, u dospělých asi 14 g za den. Poločas odbourání je přibližně 19 dní.

**Princip:** Albumin váže poměrně specificky bromkresolový purpur (5,5'-dibrom-*o*-kresol-sulfoftalein, BCP). Toto barvivo je acidobazický indikátor s barevným přechodem v rozpětí pH 5,2–6,8 a jeví jako některé jiné indikátory tzv. *proteinovou chybu*, to znamená, že absorpční maximum komplexu albumin-barvivo se posouvá k vyšší vlnové délce. Jinými slovy, změna zbarvení acidobazického indikátoru je způsobena jeho vazbou na bílkovinu (albumin) a nikoli změnou pH roztoku. Reakce probíhá ve slabě kyselém prostředí, za přítomnosti povrchově aktivních látek. Obecně se využívají ta barviva, která tvoří ochotněji komplex s albuminem než s ostatními bílkovinami séra. Na stejném

principu spočívá i detekce proteinurie diagnostickými proužky albuPHAN. Protože lidský a animální (např. bovinní) albumin mají různé afinity k barvivu, kalibrace musí být prováděna lidským albuminem.



bromkresolový purpur (BCP)

Činidlo pro stanovení albuminu obsahuje:

bromkresolový purpur nebo bromkresolovou zeleň (jiný acidobazický indikátor vykazující proteinovou chybu),

pufr, slabě kyselý pH, např. sukcinátový pufr pH 4,2 - udržuje slabě kyselý pH,

azid sodný – konzervant, biocid (Erba-Lachema).

## Hodnocení

Referenční rozpětí koncentrace albuminu v krevním séru je 35–53 g/l. Zvýšení koncentrace albuminu nastává zřídka, obvykle je známkou dehydratace.

*Hypoalbuminemie* je nejčastěji odrazem buď snížené proteosyntézy v jaterních buňkách (patologické procesy v játrech nebo nedostatečný přívod bílkovin potravou) nebo nadměrných ztrát albuminu (např. močí, u rozsáhlých popálenin nebo u chronických zánětů trávicího ústrojí), které nemohou být kompenzovány ani zvýšenou proteosyntézou v játrech. Hodnoty jsou ovlivněny také změnami jeho distribuce (únik do ascitu, volé tekutiny v dutině břišní). Albumin má poločas 15–20 dnů, neklesá tedy u akutních poruch. U chronických jaterních chorob jeho hladina postupně klesá, obvykle se současným vzestupem gama-globulinů, takže celková koncentrace bílkovin se nemění. Hladina albuminu klesá i u pokročilých cholestáz, současně stoupají  $\beta$ -globuliny. Výrazné snížení je typické hlavně pro alkoholické cirhózy, kdy se přidruží i porucha výživy a nepříznivý vliv alkoholu na proteosyntézu.

### 3 Elektroforéza proteinů

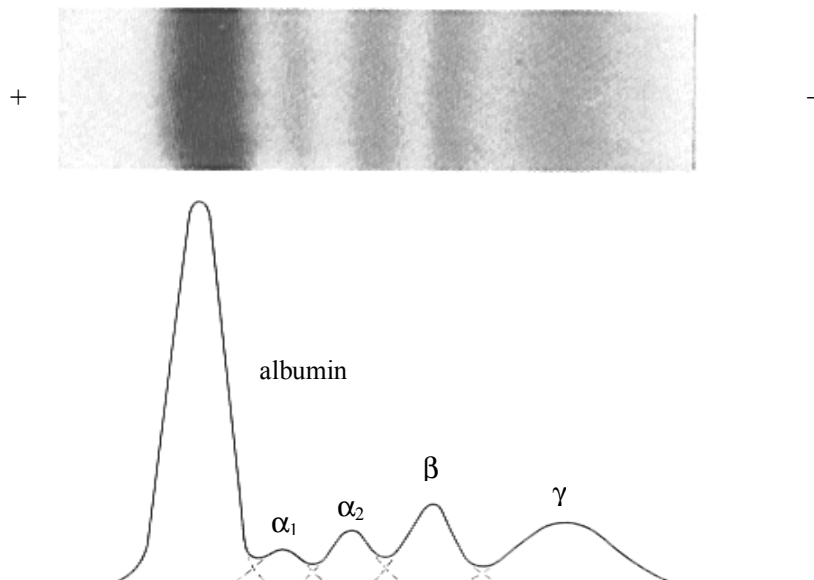
Elektroforézu lze použít k separaci a kvantitativnímu hodnocení hlavních proteinových frakcí lidského séra. Proteiny migrují v elektrickém poli různou rychlostí, která závisí na jejich struktuře, elektrickém napětí, pufru (pH a iontová síla), elektroendoosmóze a charakteru nosiče.

Indikace tohoto vyšetření jsou:

1. diagnostika nebo kontrola průběhu zánětlivých onemocnění, hepatopatií, onemocnění se ztrátami bílkovin (nefrotický syndrom, exsudativní enteropatie, popáleniny), maligních tumorů, revmatických chorob, paraproteinemií,
2. doplňkové vyšetření při patologickém nálezů jiných laboratorních testů (zvýšení sedimentace erytrocytů, proteinurie, hypoproteinemie apod).

#### 3.1 Hodnocení

Proteiny lidského séra/plazmy se rozdělí do 5 základních zón. Elektroforeogram se hodnotí denzitometricky při vlnové délce 570 nm jako podíl integrované absorbance jednotlivých frakcí z celkové absorbance separovaného vzorku. Orientační hodnocení lze provést i vizuálně.



Elektroforeogram a denzitogram proteinů lidského séra na acetylcelulose při pH 8,6.

Pořadí jednotlivých frakcí (podle klesající pohyblivosti):

Proteinová frakce	Charakteristika	Referenční rozmezí	Příklady
Albumin	výrazný pás v čele	0,52–0,70	Prealbumin, albumin
$\alpha_1$ -Globuliny	nevýrazný úzký pás	0,02–0,05	$\alpha_1$ -Glykoprotein, $\alpha_1$ -antitrypsin
$\alpha_2$ -Globuliny	difúzní pás	0,05–0,10	Ceruloplasmin, haptoglobin
$\beta$ -Globuliny	často rozděleny na $\beta_1$ a $\beta_2$	0,06–0,13	Transferrin, fibrinogen
$\gamma$ -Globuliny	velmi široký pás	0,10–0,19	Imunoglobuliny

Pro některé patologické stavy jsou změny ve spektru sérových proteinů charakteristické. V rané fázi akutních zánětlivých onemocnění dochází ke zvýšení  $\alpha_1$ - a  $\alpha_2$ -globulinů (tzv. *reaktantů akutní fáze*), později se zvyšují  $\gamma$ -globuliny a snižuje albumin. Pro chronické záněty je typické zvýšení  $\gamma$ -globulinů. Rovněž další onemocnění jsou spojena s výraznými změnami spektra proteinů, např. nefrotický syndrom, některé maligní tumory, mnohočetný myelom a jiné monoklonální gamapatie.

Podrobnější dělení základních elektroforetických frakcí umožňují imunoelektroforetické metody.

### 3.2 Bílkovinné frakce při elektroforéze krevního séra/plazmy a příklady proteinů

#### A. Albumin

- **prealbumin (transthyretin)** - transportní protein pro tyreoidální hormony (hlavně  $T_4$ ). Vytváří komplex s retinol-binding proteinem (RBP) - transportuje vitamin A. Brání ztrátám vit.A do moči.
- **albumin** - onkotický tlak, pufrční účinek, transport (viz výše).

*Snížení:* proteinová malnutrice, těžké hepatopatie.

#### B. Alfa1-globuliny

- **alfa1-inhibitor proteáz (alfa1-antitrypsin, AAT)** – vzniká v játrech, zvýšená koncentrace při zánětech, snížená koncentrace u těžkých hepatopatií nebo deficitu AAT.
- **alfa1-kyselý glykoprotein (orosomukoid)** – vzniká v játrech, stoupá u u akutních zánětů, klesá při porušení proteosyntézy.
- **alfa1-fetoprotein** – tumorový marker, vyšetřován v těhotenství (prenatální screening vrozených vývojových vad)
- **alfa1-lipoprotein (HDL)** – transport cholesterolu z tkání do jater
- **alfa1-mikroglobulin** – stoupá při snížení glomerulární filtrace.

### C. Alfa2-globuliny

- **alfa2-makroglobulin** – inhibitor endoproteáz. Velká molekula, špatně proniká glomerulem, koncentrace bývá zvýšená u nemocných s nefrotickým syndromem. Klesá u akutní pankreatitidy.
- **haptoglobin** – váže pevně molekulu hemoglobinu, komplex je rychle vychytán buňkami RES. Vyrůstá u akutních stavů. Pokles při poruchách proteosyntézy v játrech. Nízká až téměř neměřitelná koncentrace svědčí pro intravaskulární hemolýzu.
- **ceruloplazmin** - váže a transportuje měď. Fyziologicky vyrůstá v těhotenství.
- **ferritin** – zásobní bílkovina obsahující Fe, v krvi normálně nízká koncentrace. Vyrůstá při nadbytku Fe, klesá při nedostatku Fe.

### D. Beta-globuliny

- **transferrin** – syntéza v játrech. Transportuje Fe. Vyrůstá při nedostatku Fe v organismu. Vznikne-li však nedostatek Fe následkem malnutrice a chybějí-li současně i bílkoviny, k vzestupu koncentrace transferinu nedochází. Pokles nastává při přebytku Fe a porušení proteosyntézy. U alkoholiků, jako průkaz chronické konzumace alkoholu, se stanovuje tzv. bezsacharidový transferin (carbohydrate deficient transferrin, CDT).
- **hemopexin** – váže volný hem. Koncentrace klesá u hemolytické anémie a stoupá u akutních stavů.
- **složky komplementu (C3 a C4) – komplement** - komplex proteinů obsažených v neaktivní formě v plazmě. Nejčastěji se stanovuje C3 a C4. Jejich aktivace nastává při akutním zánětu.
- **beta-lipoprotein (LDL)** – transport cholesterolu z plazmy do tkání (včetně jater).
- **beta2-mikroglobulin** – je součástí HLA systému na povrchu buněk. Tumorový marker. Zvýšená koncentrace může být příčinou amyloidózy.
- **C-reaktivní protein** - bílkovina krevní plazmy, jejíž označení se odvozuje od schopnosti vázat se na polysacharidový obal pneumokoků C. Má významnou roli při nespecifické imunitní odpovědi, která se objevuje v počáteční fázi po penetraci antigenů do organismu a působí při stimulaci fagocytózy. CRP je dominující bílkovina akutní fáze s rychlou odpovědí (začíná po 6 h, max. za 48 h). Její koncentrace významně stoupá při **zánětlivé** reakci a při maligním **nádorovém** bujení. Normální koncentrace do 5 mg/l.
- **Fibrinogen** – pouze **plazmatická** bílkovina. Pohybuje se mezi frakcemi  $\beta$  a  $\gamma$ . Vzestup je součástí akutní odpovědi organismu, vysoké koncentrace tedy nacházíme u zánětů; pokles u hepatopatií nebo při zvýšené spotřebě (intravaskulární koagulopatie).

### E. Gama-globuliny

- **Ig G** – největší podíl plazmatických imunoglobulinů. Vyrůstá hlavně v chronické fázi zánětu.
- **Ig A** – sekreční typ protilátek.
- **Ig M** – vyrůstá hl. v akutní fázi zánětu.
- **Ig D**
- **Ig E** – nárůst je typický pro alergie.

Hypoimmunoglobulinemi (hypogamaglobulinemie): fyziologické poruchy u novorozenců, dědičné poruchy syntézy, získané poruchy syntézy u nádorů, ztráta imunoglobulinů např. při nefrotickém syndromu

Hyperglobulinemie – polyklonální při chronických zánětech, chronických hepatopatiích, autoimunitní choroby, monoklonální – mnohočetný myelom aj. monoklonální gamapatie.

### **3.3 Základní elektroforetické typy**

#### **Typ akutního zánětu**

Celková bílkovina je normální, lehké snížení albuminu.

Nejvýraznější je vzestup  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  globulinů, často i  $\beta_2$ -globulinů.

#### **Typ chronického zánětu**

Vzestup  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  globulinové frakce (méně výrazný než u akutního zánětu).

Široký pruh  $\gamma$ -globulinové frakce (polyklonální hyperimmunoglobulinemie).

Nález je provázen poklesem koncentrace albuminu.

#### **Typ chronické hepatopatie**

U nemocných s fibrózou až cirhózou nacházíme snížený podíl albuminu,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  globulinů i  $\beta_2$ -globulinů. Typický je nález  $\gamma$ -globulinové frakce,, difuzní a přímo nasedající na  $\beta$ -globuliny ( $\beta$ - $\gamma$  bridging).

U akutní hepatitidy je obraz akutního zánětu. U těžkého průběhu klesá albumin a  $\alpha_2$ -globuliny.

#### **Typ nefrotického syndromu**

Typický je veliký pokles koncentrace albuminu, obvykle i  $\gamma$ -globulinů. Naproti tomu  $\alpha$ , často i  $\beta$ -globuliny výrazně stoupají.

#### **Malnutriční typ**

Typická je hypoalbuminemie a pokles  $\beta_1$ -globulinů. Je-li současně nedostatek železa, změny v  $\beta_1$ -globulinech se nemusí projevit. Někdy bývá pozorováno zvýšení  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$  globulinů.

#### **Monoklonální hyperimmunoglobulinemie (monoklonální gamapatie)**

Úzký proužek monoklonálního imunoglobulinu kdekoli od  $\alpha_1$  po  $\gamma$  frakci. Bývá nižší koncentrace albuminu. U těžších stavů vymizí frakce  $\gamma$ -globulinů.

## 4 Průkaz proteinurie

Za fyziologických okolností proniká bazální membránou glomerulů do filtrátu jen malá část plazmatických proteinů, z nichž je většina resorbována v tubulech. V moči se pak za den fyziologicky vyloučí nejvýše několik miligramů málo rozměrných globulinů krevní plazmy s  $M_r < 60\,000$  a glykoproteinů z epitelu dutého systému ledvin a vývodných cest. Běžné zkoušky na proteinurii toto množství neprokáží.

Jako *proteinurie* se označuje vylučování více než 150 mg proteinů za den.

V průběhu dne je vylučování proteinů močí u zdravého člověka asi dvakrát větší než v noci (závislost na poloze těla, na námaze). Proto je nutné vyšetřovat první ranní moč (zachycení noční klidové proteinurie). Při pozitivním výsledku opakujeme vyšetření několik dní po sobě, abychom odlišili fyziologickou přechodnou proteinurii od patologické (z příčin prerenálních, renálních nebo postrenálních). "Neškodné" fyziologické proteinurie se vyskytují zvláště u mladých osob při zhoršeném prokrvení ledvin, např. po tělesné námaze, silných emocích, dlouhém stání.

Po zjištění proteinurie musí nezbytně následovat vyšetření hematurie, morfologické vyšetření močového sedimentu, mikrobiologické vyšetření moči, podle potřeby funkční zkoušky ledvin, kvantitativní stanovení proteinurie a určení jejího typu (např. SDS-elektroforézou v polyakrylovém gelu nebo imunochemicky).

Jen podle koncentrace proteinů nelze usuzovat na závažnost příčiny, někdy i nepatrná proteinurie může být příznakem velmi závažného stavu.

### 4.1 Průkaz proteinurie sulfosalicylovou kyselinou

Působením sulfosalicylové kyseliny bílkovina denaturuje, což se projeví tvorbou zákalu až sraženiny v závislosti na množství přítomné bílkoviny.

#### Hodnocení

Zkouška je velmi citlivá (lze prokázat bílkoviny v koncentraci asi od 100 mg/l), je proto vhodná pro screeningová vyšetření. Pokud je negativní, je zbytečné provádět další zkoušky. Slabě pozitivní výsledek ještě proteinurii nemusí prokazovat, musí být potvrzen některou další zkouškou.

### 4.2 Průkaz proteinurie diagnostickými proužky albuPHAN

K důkazu se využívá tzv. *proteinové chyby* některých acidobazických indikátorů. Tyto indikátory mění své zbarvení v přítomnosti proteinů a vykazují zdánlivě jinou hodnotu pH, než odpovídá skutečnosti. Příkladem jsou indikátory sulfoftaleinového typu. Indikační zóna na konci proužku je nasycena uvedeným indikátorem a kyselým pufrem o hodnotě pH 3. Po smočení v roztoku obsahujícím proteiny indikátor nabude zbarvení odpovídající podstatně vyšší hodnotě pH, než které v indikační zóně zajišťuje pufr (indikátor vykazuje proteinovou chybu).



## Hodnocení

Exkrece proteinů močí u zdravých dospělých do 150 mg/den, z toho množství albuminu není větší než 20 mg/l. Proužky albuPHAN indikují albumin již od koncentrace 100 mg/l, na globuliny a glykoproteiny jsou méně citlivé. Žlutě zelený odstín, slabší než odpovídá barevnému poli stupnice 1 (300 mg/l), se hodnotí jako "stopy". Při proteinurii vzniká zbarvení žlutě zelené až modré.

Falešně pozitivní výsledky se mohou vyskytovat u pacientů, kterým byly podávány chininové preparáty nebo léčiva na bázi chinolinu, nebo v neobvykle alkalických močích (pH  $\approx$  8), případně v neutrálních koncentrovaných močích s vysokou pufrací kapacitou. V těchto případech stačí okyselit vzorek několika kapkami zředěné kyseliny na pH 5–6 a provést zkoušku s novým papírkem.

## 4.3 Typy proteinurie

Podle typu bílkovin přítomných v moči rozlišujeme několik typů proteinurie.

### Glomerulární proteinurie

Dochází k ní při poškození glomerulů. Příčinou je zejména ztráta negativního náboje glomerulární membrány (kyselina sialová v povrchové vrstvě membrány). Při mírném poškození nacházíme v moči zejména albumin a bílkoviny o molekulové hmotnosti do 100 tisíc, např. transferrin. Porucha se označuje jako *glomerulární selektivní proteinurie*. Je-li poškození glomerulární membrány většího stupně, najdeme v moči i bílkoviny s větší molekulovou hmotností, např. imunoglobuliny. Jedná se o *glomerulární neselektivní proteinurii*. Pacient ztrácí močí velké množství bílkovin, gramy až desítky gramů.

### Tubulární proteinurie

Při poškození tubulárních buněk nemohou být bílkoviny, které prošly glomerulem, vstřebávány a dostávají se do definitivní moči. Typický je nález bílkovin s menšími molekulovými hmotnostmi – např.  $\beta_2$ -mikroglobulin,  $\alpha_1$ -mikroglobulin, RBP ad.

### Postrenální proteinurie

Bílkoviny pocházejí z močových cest, např. při zánětech a krváceních. V moči jsou současně leukocyty, příp. erytrocyty.

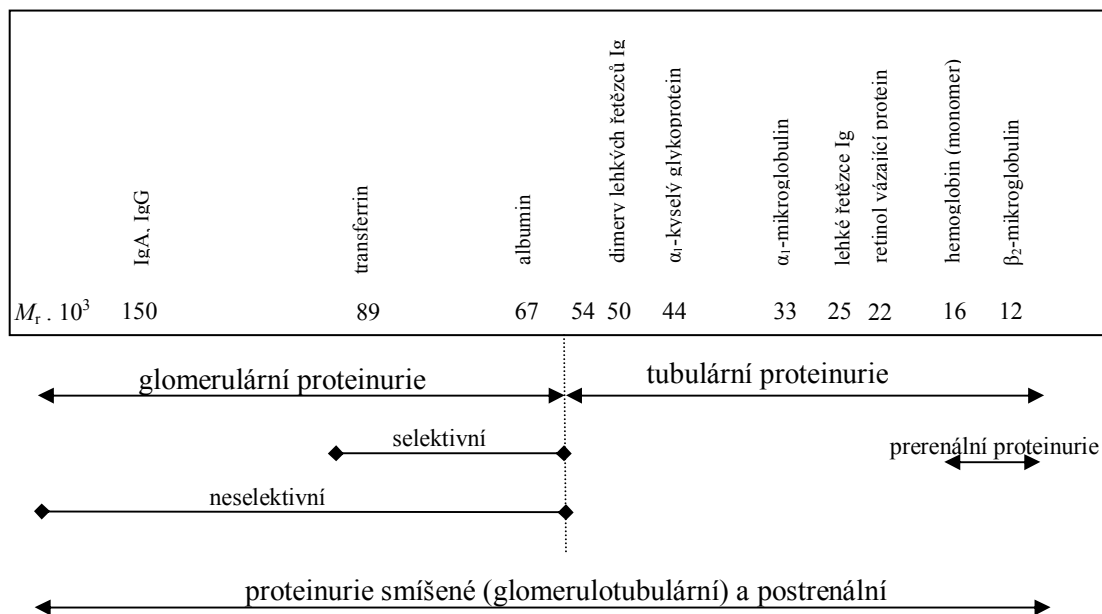
### Prerenální proteinurie

Funkce ledvin není poškozena. Pacient má v krvi bílkovinu s malou molekulou, která prochází glomerulem – např. hemoglobin při masivní hemolýze, nebo myoglobin při zhmoždění svalů, Bence – Jonesova bílkovina u mnohočetného myelomu.

## Arteficiální proteinurie

Pacient přidává bílkovinu do moči záměrně (obvykle vaječný bílek).

Rozdělení proteinurií na základě  $M_r$  přítomných proteinů



## 4.4 Průkaz Bence-Jonesovy bílkoviny v moči

Bence-Jonesova bílkovina (BJB) bývá prokazována v moči při onemocnění mnohočetným myelomem. Mnohočetný myelom vzniká proliferací klonu plazmatických buněk (aktivovaných B-lymfocytů) produkujících protilátky. V kostní dřeni vznikne zhoubný kmen těchto buněk (myelomových buněk). Od funkčních plazmocytů se liší nekontrolovaným množением a dlouhým životem v kostní dřeni. Myelomové buňky produkují monoklonální imunoglobuliny, tzv. paraproteiny, které se dají v plazmě prokázat elektroforeticky. Nejčastěji se jedná o kompletní molekulu imunoglobulinu, v některých případech se do plazmy dostanou jen lehké řetězce (kappa a lambda). Lehké řetězce snadno pronikají glomerulem a dostávají se do moči. Nazývají se Bence-Jonesova bílkovina, v moči se vyskytují ve formě monomerů, dimerů i fragmentů o nízké molekulové hmotnosti, vykazují také velký stupeň polymerace. Jejich koncentrace v moči může dosáhnout až několik desítek g/l.

Na posouzení zvýšené proteinurie se využívá reakce s kyselinou sulfosalicylovou, která slouží jako rychlý screening zvláště při podezření na přítomnost Bence-Jonesovy bílkoviny. Použití běžných diagnostických proužků Albu-Phan není vhodné, neboť tyto proužky stanovují převážně albumin a jsou výrazně méně specifické na globuliny, glykoproteiny a Bence-Jonesovu bílkovinu.

V současné době nejčastějším postupem hodnocení monoklonálních gamapatií je kombinace biochemických metodik. Jako základní screeningový postup slouží elektroforéza bílkovin séra a moče, a v případě positivity paraproteinů se poté provádí imunofixační elektroforéza bílkovin. Při imunofixaci se k provedenému elektroforeogramu přidávají protilátky proti jednotlivých imunoglobulinům a lehkým řetězcům a na základě specifické precipitace se hodnotí jejich typy. Pro kvantitativní stanovení BJB v moči se používá citlivá imunochemická metoda využívající reakce se specifickými protilátkami proti BJB s následným turbidimetrickým měřením vzniklého nerozpustného imunokomplexu.

#### **Hodnocení Bence Jonesovy bílkoviny:**

Bence Jonesova bílkovina se v moči může vyskytovat v koncentraci od několika mg/l až po desítky g/l. Stanovení Bence Jonesovy bílkoviny patří mezi důležité testy v diferenciální diagnostice monoklonálních gamapatií.

## **5 Průkaz albuminurie**

U zdravých jedinců nepřekročí obvykle vylučování albuminu močí hodnotu 30 mg/den. Při malém zvýšení permeability bazální membrány glomerulů dochází ke zvýšené exkreci proteinů se střední molekulovou hmotností, nejvíce albuminu ( $M_r$  68 000).

Zvýšené vylučování albuminu močí, které předpovídá počáteční, ještě reverzibilní, fázi nefropatie, ale které není detekovatelné kvalitativními metodami realizovanými běžnými testovacími proužky pro průkaz proteinů v moči, či jinými metodami kvalitativní analýzy, se označuje jako **albuminurie** a odpovídá koncentraci albuminu v moči v rozmezí 30 – 300 mg/24 h (dříve označováno jako mikroalbuminurie). Toto malé množství albuminu však obvykle ještě není prokazatelné běžnými testy na proteinurii, které mají citlivost nad 100 mg/l.

Stanovení se provádí v prvním nebo ve druhém ranním vzorku moče, po vyloučení manifestní proteinurie, nebo ve sbírané moči během nočního odpočinku nebo moči sbírané 24 hod. Perzistentní albuminurie je potvrzena opakovaným pozitivním nálezem ve dvou ze tří vyšetření prováděných během jednoho týdne v intervalu 3–6 měsíců. Potřeba zvýšeného počtu měření je dána vysokou hodnotou intraindividuální biologické variace albuminu v moči ( $\approx$  30 %).

#### **Důkaz albuminurie diagnostickými proužky MicroalbuPHAN**

Diagnostické proužky MicroalbuPHAN (Erba Lachema) jsou určeny pro semikvantitativní stanovení albuminurie. Proužky detekují albumin od koncentrace 30–40 mg/l. Proužek obsahuje zónu pro stanovení albuminu a zónu pro stanovení kreatininu. Test na stanovení albuminu v moči je založen na principu změny acidobazického indikátoru („proteinová chyba“) a test na stanovení kreatininu je založen na reakci kreatininu s 3,5-dinitrobenzoovou kyselinou v alkalickém prostředí.

MicroalbuPHAN lze použít jako screeningový test, pozitivní albuminurie by měla být potvrzena kvantitativním stanovením (např. imunofelometricky). Vyhodnocení lze provést vizuálně nebo za pomoci stolního analyzátoru (typ LAURA Smart, umožňující vyhodnotit poměr albumin/kreatinin)

---

**Materiál:** Diagnostické proužky MicroalbuPHAN (Erba-Lachema), vzorky moči.

---

### Provedení

- ☞ Proužek krátce (1-2 s) ponořte do vyšetřované čerstvé, nijak neupravované moči tak, aby indikační zóna byla stejnoměrně smočena. Ihned vyjmete, přebytečnou kapku otřete o okraj nádoby. Proužek ponechte ve vodorovné poloze.
- ☞ Po 1 minutě srovnajte zbarvení zón s předtištěnou barevnou stupnicí pro semikvantitativní vyhodnocení koncentrace albuminu a kreatininu, nalepenou na pouzdrě pro proužky.

### Hodnocení

Přednost má stanovení ve sbírané moči během nočního odpočinku. Ve vzorku ranní moči je přibližná horní mez fyziologické koncentrace albuminu 20 mg/l. Koncentraci albuminu hodnotíme při současném stanovení látkové koncentrace kreatininu ve stejném vzorku moči jako tzv. ACR – albumin/creatinine ratio. Fyziologické hodnoty jsou < 3,0 mg albuminu/mmol kreatininu.

Zvýšené hodnoty signalizují počátek poruchy glomerulární filtrace (např. u diabetiků v důsledku neenzymové glykace kolagenu v bazální membráně glomerulů nebo u hypertoniků v důsledku zvýšeného filtračního tlaku).

## 6 Orientační hodnocení dusíkové bilance

Pojem **dusíková bilance** vyjadřuje rozdíl mezi hmotností dusíku přijatého do organismu potravou ve formě proteinů nebo aminokyselin a hmotností dusíku, který byl z těla vyloučen.

Při orientačních výpočtech se počítá množství dusíku vyloučeného močí (za jehož míru se pokládá množství vyloučené močovinou) a ke zjištěnému množství se připočítává 1,0 g/d na ostatní ztráty dusíku (stolicí, potem).

**Hmotnost dusíku přijatého potravou** ( $N_{IN}$ ) – vzhledem k tomu, že proteiny obsahují průměrně 16 % dusíku, se vypočte ze vztahu:

$$N_{IN} = \text{hmotnost přijatých proteinů (g)} \times 0,16 \quad (\text{g}/24\text{h})$$

**Hmotnost dusíku vyloučeného močí** ( $N_{OUT}$ ) se orientačně vypočítá na základě údaje o množství vyloučené močovinou. Vychází se při tom z úvahy, že močovina činí 84 % dusíku vyloučeného močí a že 1 mmol močovinou obsahuje 0,028 g dusíku:

$$N_{OUT} = (c_{UREA})_{MOC} \times V_U \times \frac{100}{84} \times 0,028 + 1 \quad (\text{g}/24\text{h})$$

kde  $(c_{UREA})_{MOC}$  je koncentrace močovinou v moči v mmol/l,  $V_U$  diuréza v litrech.

V případě masivní proteinurie je třeba k takto vypočtené hodnotě přičíst hmotnost dusíku, vyloučenou močí ( $\rho_{\text{PROT}} \times 0,16 \times V_U$ ), kde  $\rho_{\text{PROT}}$  je hmotnostní koncentrace proteinů v moči.

- ▶ Vypočtete odpad dusíku za 24 h na základě koncentrace močoviny v moči 250 mmol/l.
- ▶ Zhodnoťte dusíkovou bilanci za předpokladu, že vyšetřovaná osoba přijala v potravě za den 90 g proteinů.

## Hodnocení

**Vyrovnaná dusíková bilance** (množství přijatého dusíku se rovná jeho ztrátám) je za normálních okolností u zdravého dospělého člověka.

**Pozitivní dusíková bilance** (vyšší příjem dusíku než jeho ztráty) je charakteristická např. pro rostoucí organismus nebo rekonvalescenci. Navození pozitivní dusíkové bilance je rovněž žádoucí u pacientů s chronickou renální insuficiencí a u dalších chorob.

**Negativní dusíková bilance** je většinou spojena se závažným poškozením zdraví (těžké infekce, úrazy, operace, popáleniny, nedostatek proteinů nebo hladovění). Organismus využívá jako zdroj energie vlastní proteiny, odpad dusíku stoupá na desítky gramů za den. Stav se zpravidla projevuje výrazným poklesem tělesné hmotnosti – ztráta 1 g dusíku odpovídá přibližně ztrátě 6,25 g proteinů, tj. 25–30 g svalové hmoty.