Datum:	Jméno: Skupina:

CVIČENÍ 9: Vyšetření funkce ledvin II

Úvod

Viz CVIČENÍ 8: Vyšetření funkce ledvin I.

9.1 Důkaz proteinurie

Normálně proniká bazální membránou glomerulů do filtrátu jen malá část plazmatických proteinů, z nichž většina je resorbována v tubulech ⇒ denně je v moči nejvýše několik mg málo rozměrných plazmatických globulinů o M_r<60000 a glykoproteinů z epitelu dutého systému ledvin a vývodných cest, což není běžnými zkouškami na proteinurii prokazatelné.

proteinurie = vylučování více než 150 mg proteinů za den

- fyziologická (jde o glomerulární proteinurii, viz dále); neškodná, zvl. u mladých osob při zhoršeném prokrvení ledvin, např. po tělesné námaze, silných emocích, horečce, dlouhém stání (= ortostatická proteinurie)
- patologická; příčiny:
  - prerenální
  - renální
  - postrenální

Přes den je vylučování proteinů močí asi 2× vyšší než v noci (závislost na poloze těla a námaze) ⇒ vyšetření na proteinurii se musí provádět z první ranní moči, abychom zachytili noční klidovou proteinurii. Při pozitivním výsledků vyšetření několik dní po sobě opakujme, abychom odlišili fyziologickou přechodnou proteinurii od patologické.

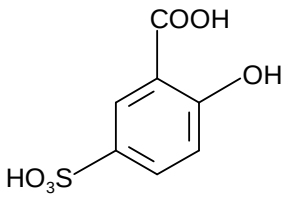
Při zjištění proteinurie provést následující vyšetření:

- hematurie
- morfologické vyšetření močového sedimentu
- mikrobiologické vyšetření moči

podle potřeby:

- funkční zkoušky ledvin (glomerulární filtrace, tubulární funkce)
- kvantitativní stanovení proteinurie (biuretová reakce)
- určení typu proteinurie (SDS PAGE = elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS)

9.1.1 Průkaz proteinurie sulfosalicylovou kyselinou



5-sulfosalicylová kyselina

denaturuje bílkoviny → tvorba zákalu až sraženiny podle množství bílkoviny

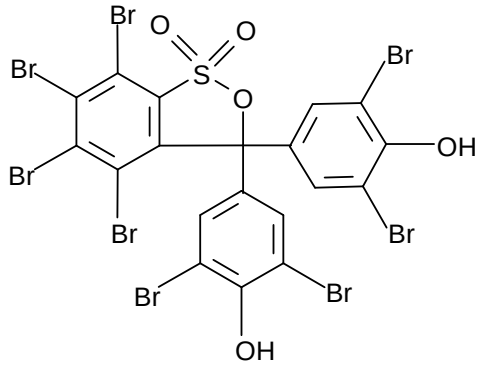
Provedení (viz skripta)

Výsledky a hodnocení (viz pravidla níže):

Hodnocení

pozitivní zkouška - při koncentraci bílkovin od 100 mg l^{-1}
slabě pozitivní zkouška - slabý zákal, nemusí prokazovat proteinurii, potvrdit další zkouškou
negativní zkouška - další zkoušky se neprovádějí

9.1.2 Průkaz proteinurie diagnostickými proužky albuPHAN



tetrabromfenolová modř
3,3´,3´´,4,5,5´,5´´,6-oktabromfenolsulfonftalein

Indikační zóna na konci proužku je nasycena tetrabromfenolovou modří a kyselým pufrem o pH=3. Tetrabromfenolová modř je acidobazický indikátor sulfoftaleinového typu. Vykazuje proteinovou chybu - tj. v přítomnosti proteinu nabude zbarvení odpovídající vyšší hodnotě pH, než které v indikační zóně proužku zajišťuje pufr. Indikátor je pufrován na pH žluté formy a bílkovina posunuje zbarvení do žlutozelené až modré. Kromě toho má albuPHAN indikační zónu na určení pH, která obsahuje směsný acidobazický indikátor.

Provedení (viz skripta)

Výsledky a hodnocení (viz pravidla níže):

Hodnocení

Zdraví dospělí: do 150 mg den^{-1} proteinů v moči, z toho max. koncentrace albuminu je 20 mg l^{-1}. albuPHAN indikuje albumin od koncentrace 100 mg l^{-1}, na globuliny a

glykoproteiny je méně citlivý. Žlutě zelený odstín odpovídající zbarvení mezi políčky srovnávací stupnice „neg.“ a „300 mg l^{-1}“ se hodnotí jako stopy.

<u>Falešně pozitivní výsledky:</u> u pacientů užívajících léčiva na bázi chininu a chinolinu, v neobvykle alkalických močích (pH≈8), v neutrálních koncentrovaných močích s vysokou pufrační kapacitou. Test provést znovu s novým papírkem po okyselení moči několika kapkami zředěné kyseliny na pH = 5 až 6.

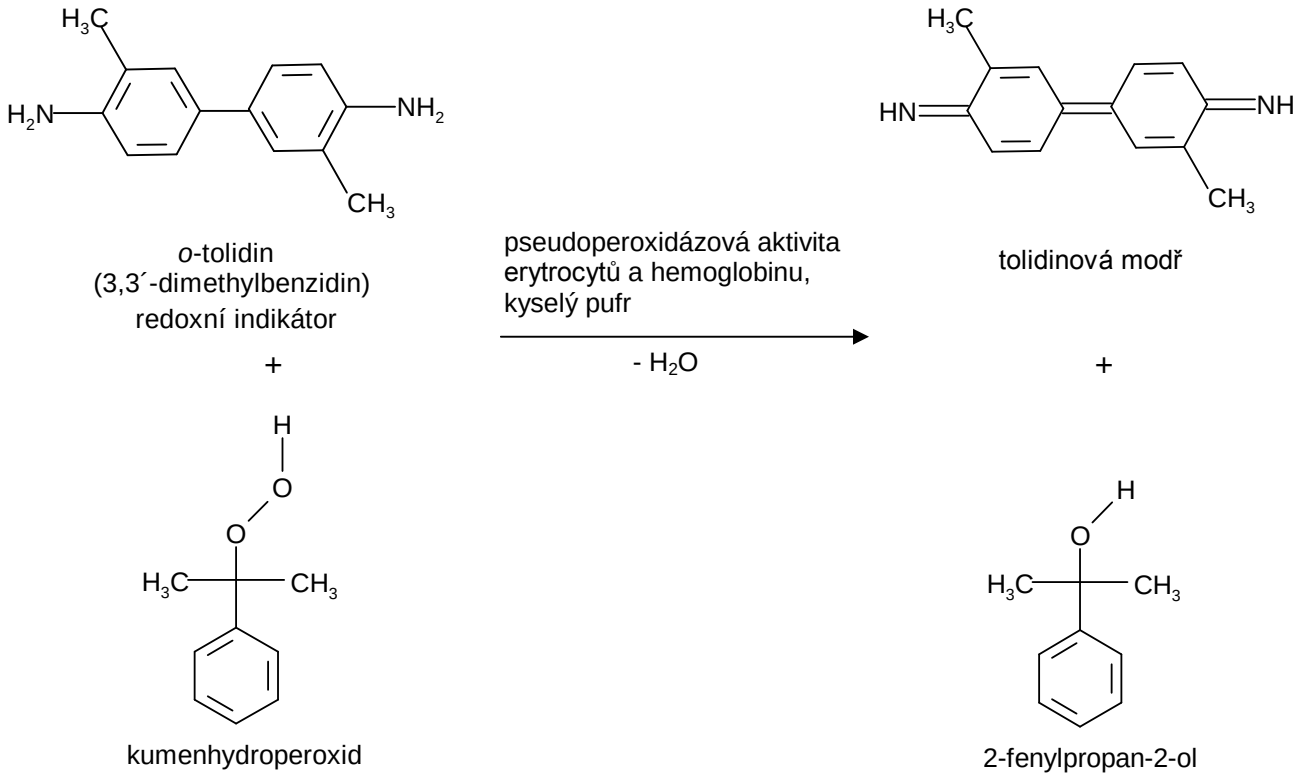
9.2 Zjištění krevního barviva v moči

Močí zcela zdravých lidí se vyloučí až milión erytrocytů za den, což nelze prokázat běžnými chemickými zkouškami.

hematurie = výskyt většího množství erytrocytů v moči; narůžovělé až masové zbarvení (spektroskopicky lze prokázat hemoglobin (Hb)), u masivní hemoglobinurie až zbarvení černého piva od hematinu (vzniká degradací Hb)

hemoglobinurie = přítomnost volného hemoglobinu v moči

myoglobinurie = přítomnost svalového myoglobinu v moči



Leukocyty (Leu) mají vysokou peroxidázovou aktivitu, některé baktérie obsahují také peroxidázu ⇒ přítomnost Leu a některých baktérií v moči může způsobit pozitivitu zkoušky na Hb i v jeho případné nepřítomnosti. V tomto případě zkoušku zopakovat z povařeným vzorkem (inaktivace peroxidáz). Pokud by i potom vyšel Hb pozitivní, je skutečně přítomen (pseudoperoxidázová aktivita Hb zůstává zachována i po povaření).

Provedení (viz skripta)

Výsledky a hodnocení (viz pravidla níže):

Hodnocení

negativní výsledek - žlutá indikační zóna
pozitivní výsledek - žlutozelená až modrá indikační zóna, intaktní erytrocyty způsobují nerovnoměrné zbarvení - hematurii potvrdí nález četných erytrocytů v močovém sedimentu

↓ citlivosti testu: přítomnost většího množství redukujících látek - vitamin C (při vysokém dávkování), uráty (v příliš koncentrovaných močích), gentisát (antirevmatikum).

Falešně pozitivní výsledek: přítomnost Fe^{3+}, I^-, stop silných oxidačních činidel (desinfekčních prostředků obsahujících chlor, chlornan, chloramin).

9.3 Stanovení bílkovin v moči

Nález bílkoviny v moči → vhodné stanovit celkové množství bílkovin vyloučených za 24 h (fyziologické rozmezí 40 - 100 mg den^{-1}, hraniční hodnota je 150 mg den^{-1}).
Část jsou bílkoviny plazmatické (albumin), část bílkoviny secernované v tubulech (Tammův-Horsfallův protein).
Při normální diuréze je koncentrace bílkovin v moči tak nízká, že se běžnými metodami vůbec neprokáží.
Diagnostika proteinurií: stanovit hmotnostní koncentraci bílkovin v g l^{-1}, při znalosti diurézy je možno spočítat ztrátu bílkovin v g den^{-1}; je výhodné určit spektrum vylučovaných proteinů k posouzení selektivity a k rozlišení původu proteinurie (elektroforéza v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu, stanovení albuminu a β2-mikroglobulinu)

9.3.1 Kvantitativní stanovení bílkovin v moči biuretovým činidlem

Bílkoviny v moči se vysrážení kyselinou chloristou, pak se provede stanovení biuretovým činidlem. Princip biuretové reakce, viz CVIČENÍ 7: Vyšetření bílkovin v krevním séru, úloha 7.1.

Provedení (viz skripta)

Výpočet hmotnostní koncentrace proteinů v krevním séru: $\rho_x = \frac{A_x}{A_{STD}} * \rho_{STD}$

A_x.....absorbance vzorku při 545 nm (bezrozměrné číslo)
A_{STD}..... absorbance standardu při 545 nm (bezrozměrné číslo)
ρ_x..... hmotnostní koncentrace proteinů ve vzorku (g l^{-1})
ρ_{STD}..... hmotnostní koncentrace proteinů v kalibračním roztoku (g l^{-1})

Výsledky a hodnocení (viz pravidla níže):

Hodnocení

Proteinurie:
mírného stupně - do 500 mg den^{-1}
středního stupně - do 1500 mg den^{-1}
výrazná - více než1500 mg den^{-1}; více než 3,5 g den^{-1} - nebezpečí vzniku nefrotického syndromu (proteinurie, hypoproteinemie (hypalbuminemie), periferní edémy, hyperlipidemie)

9.3.2 Kvalitativní stanovení bílkovin v moči elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

Princip a provedení: viz videozáznam.

4 Vyhodnoťte modelové elektroforeogramy a určete pravděpodobný typ proteinurie.

Ke studiu: dělení proteinurií podle místa původu

1. Prerenální
2. Renální
   - glomerulární
     - selektivní
     - neselektivní
   - tubulární (kompletní, inkompletní)...
   - } smíšená
3. Postrenální (subrenální)
4. Arteficiální

1. **Prerenální:** při ↑ plazmatické koncentraci nízkomolekulárních snadno filtrovatelných proteinů, jejichž filtrace může překročit reabsorpční kapacitu proximálního tubulu. V moči jsou monomery, ev. dimery lehkých řetězců imunoglobulinů nebo hemoglobinu, nebo myoglobin.
2. **Renální, glomerulární:** ↑ permeability glomerulů ⇒ přestup molekul bílkovin do glomerulárního filtrátu a odtud do moči.
   selektivní: postižení vnější části bazální membrány a podocytů, v moči je hlavně albumin (M_r=68000) a transferrin (M_r=89000), bílkoviny s větší M_r (zejména imunoglobuliny) nelze v moči prokázat
   neselektivní: postižení vnitřní části bazální membrány a mesangia, do moči kromě albuminu a transferrinu pronikají i proteiny s větší M_r, především imunoglobulin třídy G
   Renální, tubulární: při porušené zpětné resorpci profiltrovaných nízkomolekulárních bílkovin v proximálním tubulu (toxické poškození tubulů, pyelonefritidy).
   kompletní: vylučovány všechny proteiny s M_r=10000 až 70000 (α_1-antitrypsin, α_1-kyselý glykoprotein, protein vázající retinol, β_2-mikroglobulin)
   inkompletní: v moči jsou tzv. mikroproteiny (inkompletní tubulární mikroproteinurie), tj. proteiny s M_r=10000 až 40000 (α_1-kyselý glykoprotein, β_2-mikroglobulin)
   Renální, smíšená: kombinace viz schéma, nejčastěji je u chronické renální insuficience.
3. **Postrenální:** při krvácení, růstu maligních tumorů a zánětech v močových cestách či v močovém měchýři.
4. **Arteficiální:** pacient přidá do moči bílkovinu úmyslně (obvykle vaječný bílek).

9.4 Průkaz mikroalbuminurie

Zdravý člověk - vylučování albuminu močí do 30 mg den^{-1}.
Mikroalbuminurie - >20 -100 mg l^{-1} albuminu (M_r=68000) v moči (citlivé imunochemické testy), objevuje se v počáteční reverzibilní fázi nefropatie, je způsobena malým zvýšením permeability bazální membrány glomerulů ⇒ ↑ exkrece proteinů se střední M_r, nejvíce albuminu
Proteinurie - nad 100 mg l^{-1} proteinů v moči (běžné méně citlivé testy).

Stanovení se provádí v čerstvé ranní moči, po vyloučení manifestní proteinurie. Perzistentní mikroalbuminurie je potvrzena opakovaným pozitivním nálezem ve dvou ze tří vyšetření prováděných během jednoho týdne.

9.4.1 Důkaz mikroalbuminurie diagnostickými proužky Micral-Test II

Stanovení je založeno na kombinaci chromatografické a imunochemické metody (detailní popis ve skriptech). Proužky dodává Roche Diagnostics.

Provedení (viz skripta)

Výsledky a hodnocení (viz pravidla za úlohou 9.4.2):

9.4.2 Imunonefelometrické stanovení mikroalbuminurie

Proteiny se stanovují pomocí imunoprecipitace v roztoku s následným nefelometrickým měřením intenzity vzniklého zákalu nefelometrem Turbox®

Provedení (viz skripta)

Výsledek a hodnocení (viz pravidla níže):

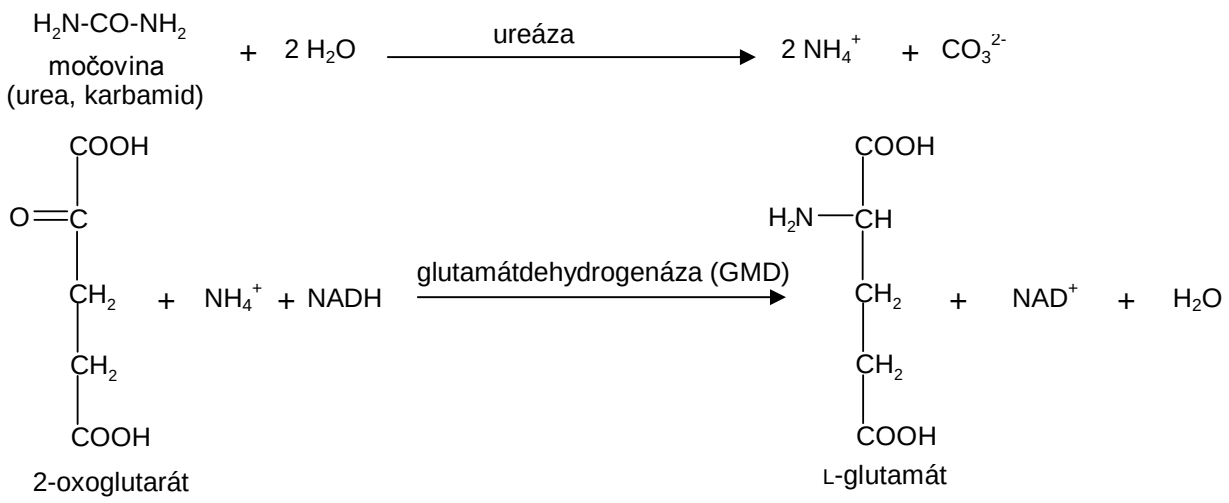
Hodnocení

Porovnání výsledku s hraniční hodnotou koncentrace albuminu v ranní moči 20 mg l^{-1}.
↑ albumin - počátek poruchy glomerulární filtrace (např. u diabetiků v důsledku neenzymové glykace kolagenu typu IV v bazální membráně glomerulů, u hypertoniků v důsledku zvýšeného filtračního tlaku)

9.5 Stanovení močoviny v séru a moči

Močovina: tvoří téměř ½ neproteinových dusíkatých látek v krvi;
syntéza v játrech z CO_2 a NH_3 (z deaminace aminokyselin);
krví se dostane do ledvin, je filtrována v glomerulech, převážná část močoviny z glomerulárního filtrátu je vylučována v definitivní moči i když <u>v ledvinách dochází k recirkulaci močoviny mezi sběracím kanálkem a descendentním raménkem Henleovy kličky</u> (spolu s aktivním transportem Na^+ a dalších iontů z tlusté části vzestupného raménka Henleovy kličky do intersticia dřeně se tato recirkulace podílí na <u>vzniku osmotické stratifikace dřeně ledvin</u>); močovina je také zpětně resorbována v proximálním tubulu
< 10 % močoviny je vylučováno gastrointestinálním traktem a kůží

Kinetická metoda (měření během prvních minut reakce).
Optický test (měří se rychlost úbytku NADH ~ rychlost poklesu absorbance při 340 nm).



Provedení (viz skripta)

Výpočet koncentrace močoviny v krevním séru: $c_x = \frac{\Delta A_x}{\Delta A_{STD}} * c_{STD}$

ΔA_x..... rozdíl absorbancí vzorku při 340 nm v časech 30 s a 180 s po přidání séra (bezrozměrné číslo)
ΔA_{STD}... rozdíl absorbancí standardu při 340 nm v časech 30 s a 180 s po přidání séra (bezrozměrné číslo)
c_x..... koncentrace močoviny ve vzorku (mmol dm^{-3} nebo-li mmol l^{-1})
c_{STD}.....koncentrace močoviny v kalibračním roztoku (mmol dm^{-3} nebo-li mmol l^{-1})

Výpočet koncentrace močoviny v moči: $c_x = \frac{\Delta A_x}{\Delta A_{STD}} * c_{STD} * D$

D.....číslo zředění (zřeďovací faktor), tj. kolikrát byl vzorek moči zředěn vodou (většinou 20× - 50×), význam ostatních symbolů viz výše

Výpočet celkového látkového množství močoviny vyloučené během 24 h:

$$\text{celk. lát. mn. vylouč. močoviny (mmol/den)} = \text{diuréza (l/den)} * c_{\text{močovina(moč)}} \text{ (mmol/l)}$$ [1]

Výsledky a hodnocení (viz pravidla níže):

Hodnocení

Porovnání výsledku s referenčním intervalem koncentrace močoviny v séru 3,2 - 8,3 mmol l^{-1} (muži), 2,6 - 6,7 mmol l^{-1} (ženy).
Koncentrace močoviny v séru závisí na příjmu bílkovin a při dobré funkci jater a ledvin je odrazem katabolismu bílkovin.

Obvyklé vylučování močoviny (denní odpad močoviny): 330 - 600 mmol den^{-1} (20 - 35 g den^{-1}).
Závisí také na přívodu bílkovin potravou. Močovina tvoří asi 84 % všeho dusíku moči.

Ke studiu:
Příčiny ↑ močoviny:

- prerenální
- renální

Prerenální: ↑ odbourávání bílkovin (↑ katabolismus), nadměrný přívod bílkovin, masivní krvácení do gastrointestinálního traktu, intenzivní trénink sportovců ⇒ mírné ↑ močoviny (ale výraznější než ↑ u kreatininu), současně je vysoká koncentrace močoviny v moči, která má vysokou osmolalitu

Renální: závažné poruchy funkce ledvin ⇒ značné ↑ močoviny (desítky mmol l^{-1}), retence močoviny a jiných nebílkovinných dusíkatých látek vede ke vzniku <u>syndromu uremie</u>; při špatném prokrvení ledvin v důsledku dehydratace dochází ke zvýšení zpětné resorpce močoviny v proximálních tubulech (↑ močoviny až při ↓ glomerulární filtrace o více než 70 %, u kreatininu je ↑ už při ↓ glomerulární filtrace o 50 %, proto je stanovení kreatininu v séru lepší pro včasné rozpoznání selhání filtrační funkce ledvin)

Příčiny ↓ močoviny:

- nedostatek proteinů v potravě
- gravidita
- těžké jaterní poruchy s rozvojem jaterního kómatu (neschopnost syntetizovat močovinu se současným ↑ koncentrace aminokyselin a amoniaku v krvi)

9.6 Orientační hodnocení dusíkové bilance

Dusíková bilance = rozdíl mezi hmotností dusíku přijatého potravou ve formě proteinů a aminokyselin do těla a hmotností vyloučeného dusíku z těla

Hmotnost dusíku přijatého potravou: $N_{IN}\,(g\,den^{-1}) = m_{prot}\,(g) * 0{,}16$

m_{prot}..... hmotnost přijatých proteinů 0,16.....průměrný obsah dusíku v proteinech

Hmotnost dusíku vyloučeného močí a ostatními ztrátami:

$$N_{OUT}\,(g\,den^{-1}) = (c_{UREA})_{moč} * V_u * \frac{100}{84} * 0{,}028 + 1$$

$(c_{UREA})_{moč}$..... koncentrace močoviny v moči (mmol l^{-1})
V_u..... diuréza (l den^{-1})
84.....procentuální zastoupení dusíku z močoviny na dusíku vyloučeném močí
0,028.....hmotnost dusíku (g) v 1 mmol močoviny

1.....ostatní ztráty dusíku stolicí a potem (g den^{-1})

Při masivní proteinurii přičíst k N_{OUT}: (ρ_{PROT} * 0,16 * V_u)

ρ_{PROT}.....hmotnostní koncentrace proteinů v moči (g l^{-1})

4 Vypočtěte odpad dusíku za 24 h na základě koncentrace močoviny v moči stanovené v úloze 9.5 (diuréza je uvedena na lahvičce s močí).

4 Zhodnoťte dusíkovou bilanci za předpokladu, že vyšetřovaná osoba přijala v potravě za den 80 g proteinů. (Viz pravidla níže.)

Hodnocení

Vyrovnaná dusíková bilance: $N_{IN} = N_{OUT}$, zdravý dospělý za normálních okolností

Pozitivní dusíková bilance: $N_{IN} > N_{OUT}$, rostoucí organismus, rekonvalescence; žádoucí navodit při chronické renální insuficienci a dalších chorobách

Negativní dusíková bilance: $N_{IN} < N_{OUT}$, závažné poškození zdraví (těžké infekce, úrazy, operace, popáleniny, nedostatek proteinů, hladovění); vlastní proteiny jsou zdrojem energie, odpad dusíku jsou desítky g den^{-1} $\Rightarrow$ výrazné $\downarrow$ tělesné hmotnosti (ztráta 1 g dusíku ~ 6,25 g proteinů, tj. 25 - 30 g svalové hmoty)

Problémy související s tímto tématem

4 1. Po sportovním utkání středoškolských týmů u všech studentů byla provedena orientační analýza moči pomocí diagnostických proužků. U většiny z nich byla zjištěna bílkovina v moči. Jaký byste navrhli další postup a pokuste se naznačit možné příčiny tohoto nálezu.

•

•

4 2. U paní C. (65 kg), která je dlouhodobě hospitalizovaná, je třeba navodit pozitivní dusíkovou bilanci. V moči jí byla stanovena koncentrace močoviny (220 mmol l^{-1}), diuréza činila 1450 ml, denní příjem proteinů byl 60 g. Vyhodnoťte, zdali u této pacientky bylo dosaženo pozitivní dusíkové bilance.

•

4 3. Pan Y. (diabetik 1. typu, 45 let) se dostavil na pravidelnou kontrolu do ordinace. Lékař odebral krev na stanovení glykemie, glykovaného hemoglobinu. Dále provedl vyšetření moči diagnostickým proužkem pentaPHAN (Pliva-Lachema) s negativním výsledkem ve všech zónách (pH, bílkoviny, glukóza, ketony, krev). Které další vyšetření moči byste u pacienta doporučili v souvislosti s možností poškození ledvin u diabetiků.

•

4 4. Paní K . (85 let, diabetička s kardiomyopatií) byla převezena do nemocnice s následujícími příznaky: nevolnost, spavost, zmatenost, oligurie. Při statimovém vyšetření plazmy byly zjištěny tyto hodnoty: glukóza 8,2 mmol l^{-1}, močovina 45 mmol l^{-1}, kreatinin 350 μmol l^{-1}, K^+ 7 mmol l^{-1}, CK 1,2 μkat l^{-1}, albumin 30 g l^{-1}. Který z nálezů je nejvíce alarmující?

•

- ref. interval plazmatického K^+: 3,8 - 5,2 mmol l^{-1}, hodnota nad 6,5 mmol l^{-1} je indikací k hemodialýze, koncentrace 9 - 10 mmol l^{-1} může vést k náhlé zástavě srdce na podkladě fibrilace komor