

# Proteinurie

Fyziologicky obsahuje moč velmi malé množství bílkovin, které není detekovatelné základními srážecími nebo kolorimetrickými technikami – mluvíme o tzv. **fyziologické proteinurii**. Vyskytne-li se v moči bílkovin větší množství, jde o **proteinurii** v užším slova smyslu.

## Fyziologická proteinurie

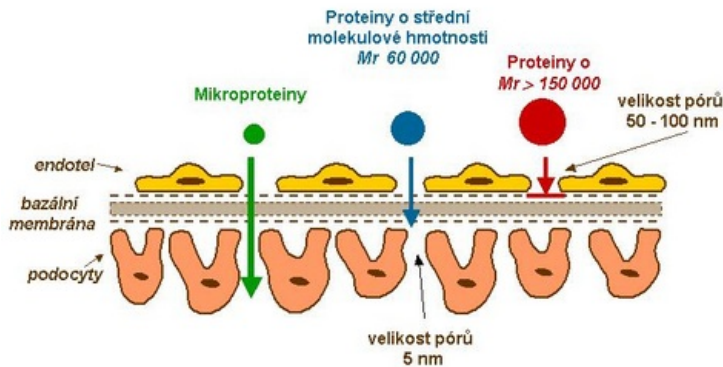
Zdravý dospělý člověk vyloučí močí při běžné fyzické aktivitě obvykle asi **50-80 mg bílkovin, maximálně 96 mg/m<sup>2</sup> (tj. asi 150 mg) za 24 hodin** („fyziologická proteinurie“). Asi 40 % těchto bílkovin představují **plazmatické bílkoviny** a zbývajících 60 % připadá na **bílkoviny z ledvin** (Tamm-Horsfallův uromukoid) a z **vývodných cest močových** (sekreční IgA a blíže nedefinované glykoproteiny a glykopeptidy).

Množství a složení bílkovin v moči závisí na jejich filtraci stěnou glomerulární membrány, na resorpci v tubulárních buňkách a na renální hemodynamice.

Za normálních okolností zabraňuje glomerulární membrána exkreci látek s molekulovou hmotností  $Mr > 60\,000$ .

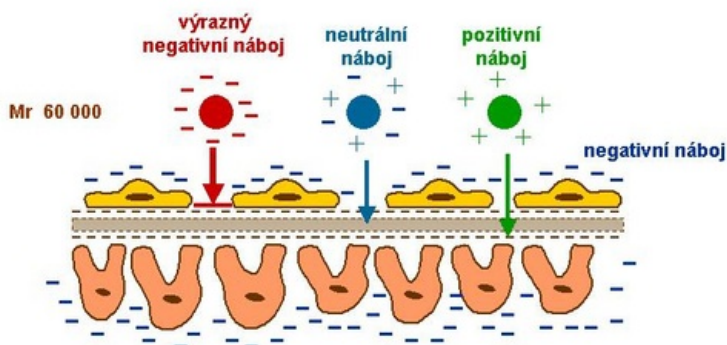
Při glomerulární ultrafiltraci se uplatňují **dva podstatné faktory**:

1. **Mikroporézní struktura glomerulární bazální membrány** brání průniku plazmatických bílkovin o  $Mr$  větší než 100 000–150 000 (např. IgG a IgA). Mluvíme o **selektivě podle velikosti**.



Glomerulární membrána propouští plazmatické bílkoviny s malou molekulovou hmotností, které jsou pak v proximálních tubulech reabsorbovány a katabolizovány.

2. **Elektrostatická bariéra** je dána povrchem všech strukturálních složek glomerulární stěny. Hydratované polyanionické makromolekuly struktur glomerulární stěny vykazují převažující negativní náboj. Většina plazmatických bílkovin má rovněž negativní náboj, který způsobuje, že jsou odtlačovány. Tímto mechanismem je zabraňováno prostupu bílkovin i s molekulovou hmotností kolem 60 000–70 000 (např. albumin a transferin). Neutrální nebo dokonce pozitivně nabitě molekuly procházejí glomerulárním filtrem mnohem snadněji. Jedná se o **selektivitu podle náboje**.



## Klasifikace proteinurií

Klasifikace proteinurií má značnou diagnostickou hodnotu. Proteinurie můžeme rozdělit do tří základních skupin, které se dále třídí:

- **Prerenální.**

- **Renální:**
  - **glomerulární proteinurie,**
    - *selektivní,*
    - *neselektivní,*
  - **tubulární proteinurie,**
  - **smíšená proteinurie.**
- **Postrenální.**

## Prerenální proteinurie

Prerenální proteinurie (proteinurie z „přetékání“, overflow proteinurie) vzniká při vysokých plazmatických koncentracích nízkomolekulárních bílkovin, které i za fyziologických okolností mohou procházet do ultrafiltrátu. Glomerulární permeabilita bílkovin nemusí být porušena. Tubulární resorpce může být rovněž normální, ale vzhledem ke zvýšené náloži část bílkovin uniká do moči, protože je překročena resorpční kapacita proximálního tubulu.

Prerenální proteinurie vzniká např. při nadměrné **intravaskulární hemolýze**, kdy se v moči objevuje *hemoglobin* (hemoglobinurie), nebo při **crush syndromu** a **rabdomyolýze** v moči prokazujeme *myoglobin* (myoglobinurie). Přítomnost lehkých řetězců imunoglobulinů v moči (tzv. *Bence-Jonesova bílkovina*) svědčí o **myelomu**. Prerenální proteinurie často doprovází začátek některých **akutních zánětlivých a nekrotizujících onemocnění**. Jsou podmíněny vylučováním tkáňových degradačních produktů a v určité míře i některých *nízkomolekulárních bílkovin akutní fáze* (např. orosomukoid).

## Renální proteinurie

Renální proteinurii rozdělujeme podle postižené části nefronu na **glomerulární, tubulární a smíšenou**.

### Glomerulární proteinurie

je projevem zvýšené propustnosti glomerulární stěny pro bílkoviny. Při **selektivní** glomerulární proteinurii, kdy zaniká negativní náboj glomerulární membrány, jsou ve zvýšené míře do moče vylučovány bílkoviny o středně velkých molekulách s Mr mezi 70 000–100 000 (zejména *albumin a transferin*), zatímco bílkoviny s vysokou molekulovou hmotností jsou zadržovány. V moči převažuje albumin, který má nejvyšší negativní náboj. Při těžším poškození glomerulární membrána ztrácí schopnost rozlišovat při filtraci bílkoviny podle velikosti, do moči pronikají kromě bílkovin o střední velikosti i proteiny o Mr nad 100 000 jako je např. *IgG*. Hovoříme o **neselektivní** glomerulární proteinurii. Při glomerulární proteinurii většinou denní ztráty bílkovin přesahují 2 g.

### Tubulární proteinurie

je podmíněná sníženou tubulární resorpcí normálně profiltrovaných bílkovin. Je charakterizována zvýšeným vylučováním nízkomolekulárních bílkovin (*mikroproteinů*), které jsou za fyziologických podmínek v tubulech resorbovány ( $\beta_2$ -mikroglobulin,  $\alpha_1$ -mikroglobulin, volné lehké řetězce imunoglobulinů). Velmi častou příčinou je **poškození tubulů některými nefrotoxicky působícími léky** (cytostatika, některá antibiotika, řada analgetik a protizánětlivých látek) **nebo těžkými kovy** (Hg, Pb, Cd). Tubulární proteinurie může doprovázet některé prerenální proteinurie (paraproteinurii, myoglobinurii), neboť dochází ke kompetitivní relativní nedostatečné tubulární resorpci ostatních volně filtrovatelných proteinů. Ztráty proteinů při tubulární proteinurii nebývají velké, obvykle 0,3–1,5 g/24 hodin.

**Smíšená proteinurie** je kombinací neselektivní glomerulární proteinurie a tubulární proteinurie. Bývá projevem zániku většiny nefronů.

### Postrenální proteinurie

Postrenální proteinurie vzniká **při krvácení, nádorech a zánětech vývodných cest močových**, kdy dochází k přímému průniku plazmy nebo exsudaci bílkovin do moči. Spolehlivě se identifikuje průkazem plazmatických makromolekulárních bílkovin o vysoké molekulové hmotnosti ( $\alpha_2$ -makroglobulin, IgM), které ani při neselektivní proteinurii nepronikají stěnou glomerulární kapiláry.

### Charakteristika jednotlivých typů proteinurií

Typ proteinurie	Charakteristické bílkoviny v moči	Poznámky
<b>RENÁLNÍ</b>		
<b>Glomerulární selektivní</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ albumin</li> <li>▪ transferin</li> </ul> (Mr 70 000–100 000)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ malé zvýšení albuminu v moči, tj. 30–300 mg/den je časnou laboratorní známkou poškození ledvin u diabetes mellitus nebo u hypertenze</li> </ul>
<b>Glomerulární neselektivní</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ albumin</li> <li>▪ transferin</li> <li>▪ IgA, IgG</li> </ul> (Mr > 70 000)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ plazmatické mikroproteiny nejsou zvýšené</li> </ul>
<b>Tubulární</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <math>\alpha_1</math>-mikroglobulin</li> <li>▪ <math>\beta_2</math>-mikroglobulin</li> <li>▪ lehké řetězce Ig</li> </ul> (Mr 10 000–70 000)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ celé spektrum mikroproteinů s Mr 10 000–70 000</li> </ul>
<b>Smíšená (tj. glomerulotubulární)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ albumin</li> <li>▪ transferin</li> <li>▪ IgG, IgA</li> <li>▪ <math>\alpha_1</math>-mikroglobulin</li> <li>▪ <math>\beta_2</math>-mikroglobulin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ všechny typy plazmatických proteinů, kromě největších bílkovin (<math>\alpha_2</math>-makroglobulin, IgM, LDL)</li> </ul>
<b>PRERENÁLNÍ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ lehké řetězce Ig v monomerní nebo dimerní formě → monoklonální gamapatie</li> <li>▪ hemoglobin → intravaskulární hemolýza</li> <li>▪ myoglobin → crush syndrom, rhabdomyolýza</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ přítomnost bílkovin, které se v plazmě normálně nevyskytují</li> </ul>
<b>POSTRENÁLNÍ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ hemoglobin</li> <li>▪ všechny typy plazmatických bílkovin, včetně plazmatických makroproteinů (<math>\alpha_2</math>-makroglobulin, IgM)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ průnik plazmy nebo exsudace bílkovin do vývodných cest močových</li> </ul>

## Funkční proteinurie

Funkční (též *benigní*) proteinurie je zvláštní formou glomerulární proteinurie. Vysvětluje se změnami průtoku krve glomerulem. Setkáváme se s ní po velké fyzické námaze, prochlazení, při horečkách nebo městnavém srdečním selhání<sup>[1]</sup>. Ztráty bílkovin nepřesahují 1 g/den. U některých mladistvých se objevuje proteinurie pouze ve vztyčené poloze, tzv. posturální (ortostatická) proteinurie, která bývá vysvětlována vazokonstrikcí při bederní hyperlordóze a je nejčastější příčinou proteinurie u dětí<sup>[2]</sup>. V tomto případě mohou denní ztráty bílkovin přesáhnout i 1 g. Většina těchto proteinurií se spontánně upraví po odeznění vyvolávající příčiny. Také v těhotenství se odpad bílkovin do moči zvyšuje na 200–300 mg/den.

## Albuminurie

Močová exkrece albuminu fyziologicky nepřesahuje 30 mg/24 hodin (tj. 20  $\mu$ g/min nebo asi 15–20 mg/l)<sup>[3]</sup>. Běžnými testy na proteinurii (pomocí diagnostických proužků, zkouškou s kyselinou sulfosalicylovou) však lze prokázat bílkovinu, až když koncentrace albuminu přesáhne asi 150 mg/l, tj. když je prakticky 10× zvýšená<sup>[4]</sup>. Ztráty menších množství albuminu (30–300 mg/24 hod) jsou prokazatelné imunochemickými metodami.

Ve starší literatuře se pro malé ztráty albuminu, které jsou prokazatelné imunochemicky, ale nikoli běžnými testy na proteinurii, používal termín **mikroalbuminurie**.

Screeningové vyšetření albuminurie je cenné zejména u pacientů trpících diabetem mellitus 2. typu, ale i u ostatních poruch metabolismu glukózy a u hypertoniků. Nález malých množství albuminu v moči je časnou známkou komplikací těchto onemocnění, zejména diabetické či hypertenzní nefropatie a vaskulopatie, a bývá důvodem k zintenzívnění léčby.

Zvýšení albuminurie je velmi citlivým ukazatelem poškození glomerulárního aparátu. Je to dáno tím, že albumin v malém množství prochází glomerulární membránou i fyziologicky. Za normálních okolností je ovšem téměř zcela resorbován v proximálních tubulech. Kapacita tubulární resorpce albuminu je však prakticky vyčerpána už při fyziologické filtraci albuminu; jakékoliv zvýšení koncentrace této bílkoviny v glomerulárním filtrátu proto vede k rychlému nárůstu koncentrace albuminu v definitivní moči<sup>[4]</sup>.

Albuminurie			
	mg/24 hod	µg/min	mg/mmol kreatininu
<b>norma</b>	< 30	< 20	< 3,5
<b>zvýšená albuminurie</b>	30-300	20-200	3,5-35
<b>detekovatelná proteinurie</b>	> 300	> 200	> 35

Pro monitorování progresu onemocnění a řízení léčby je třeba albuminurii kvantifikovat přesněji. Stanovuje se albumin v **moči sbírané přes noc** a ztráty se přepočítávají na µg albuminu za minutu. Hodnoty menší než 100 µg/min obvykle odpovídají reverzibilnímu poškození, které může být ovlivněno pečlivou kompenzací diabetu a arteriální hypertenze<sup>[3]</sup>.

Jinou možností je stanovení albuminu v prvním vzorku ranní moči a vypočítání **poměru albumin/kreatinin**. Fyziologicky se tento index pohybuje kolem 2,8–22,8 g albuminu na mol kreatininu<sup>[4]</sup>.

Aby mělo vyšetření albuminurie výpovědní hodnotu, je třeba vyloučit uroinfekci.

## Kvalitativní stanovení bílkoviny v moči

K průkazu patologické proteinurie se používají diagnostické proužky. V některých laboratořích se vyšetření proužkem kombinuje se zkouškou s kyselinou sulfosalicylovou.

### Diagnostické proužky

Princip stanovení bílkovin v moči pomocí diagnostických proužků je založen na tzv. **bílkovinné chybě acidobazického indikátoru**, např. tetrabromfenolové modři, etylesteru tetrabromfenolftaleinu či 3',3'',5',5''-tetrachlorfenol-3,4,5,6-tetrabromsulfoftaleinu. Jako každý acidobazický indikátor tyto látky při určitém pH mění svou barvu (chovají se jako slabé kyseliny, přičemž protonovaná forma má jiné zbarvení než disociovaná forma): při pH nižším než 3,5 jsou žluté, při vyšším pH jsou zelené až modré. V reakční zóně testovacího proužku je kromě indikátoru i pufr, který udržuje pH v rozmezí 3,0 až 3,5, indikátor tedy má žlutou barvu. Jsou-li ve vzorku bílkoviny, naváží se svými aminoskupinami na indikátor. Tím ovšem změní jeho vlastnosti – přechodová oblast se posune směrem ke kyslejšímu pH. Znamená to, že při uvedeném konstantním pH mezi 3,0 až 3,5 bude mít indikátor s navázanou bílkovinou zelenou barvu, jako kdyby byl v alkaličtějším prostředí (proto *bílkovinná chyba indikátoru*). Intenzita zbarvení závisí na koncentraci bílkoviny, kolísá od zelené až po modrou a hodnotí se vizuálně nebo instrumentálně.

U výrazně alkalických močí (pH nad 8) nebo je-li moč velmi koncentrovaná, může test dávat *falešně pozitivní* výsledky (dojde k vyčerpání pufru v reakční zóně). V těchto případech moč okyselíme několika kapkami zředěné kyseliny octové na pH 5–6 a test opakujeme. Falešnou pozitivitu mohou také způsobit vysoké koncentrace některých látek s aminoskupinami (kontaminace odběrové nádoby některými dezinfekčními prostředky), jež se na indikátory váží podobně jako bílkoviny.

Nevýhodou testovacích proužků je jejich rozdílná citlivost vůči jednotlivým bílkovinám. Proužky reagují velmi dobře s albuminem a jeho přítomnost indikují v moči od 0,1 až 0,5 g/l. Podstatně nižší citlivost vykazují vůči globulinům, glykoproteinům a Bence-Jonesově bílkovině. Těmito diagnostickými proužky nelze prokázat zvýšení albuminurie na hodnoty do asi 200 mg/l, resp. denní ztráty albuminu v rozmezí 30 až 300 mg/24 hodin, které provází zejména časnější fáze některých nefropatií. Pro skřínink zvýšení albuminurie je možno použít imunochemických metod, např. speciálních diagnostických proužků založených na imunochemickém principu nebo imunoturbidimetrie.

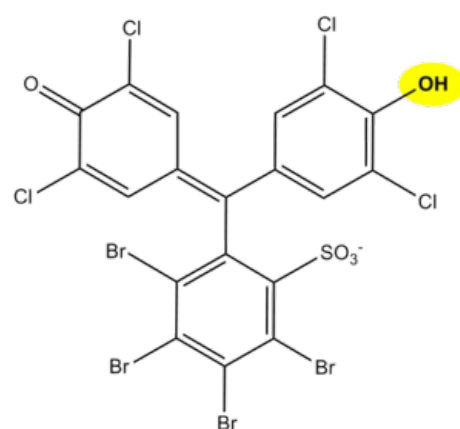
### Zkouška s kyselinou sulfosalicylovou

Princip zkoušky spočívá v **denaturaci bílkoviny** kyselinou sulfosalicylovou, která se projeví vznikem opalescence až zákalu.

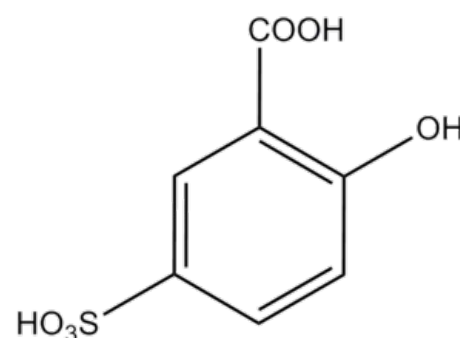
Reakce je citlivá, prokáže 0,1–0,2 g/l celkové proteinurie. Rozdíly v detekci jednotlivých bílkovin nejsou tak výrazné jako u diagnostických proužků. Kyselina sulfosalicylová sráží i globuliny.

*Falešně pozitivní* výsledky dává tato zkouška při vylučování některých rentgen-kontrastních látek, penicilinu, sulfonamidů, kyseliny salicylové a antidiabetik.

Pro hodnocení se používá semikvantitativní stupnice:



3',3'',5',5''-tetrachlorfenol-3,4,5,6-tetrabromsulfoftalein; v alkalickém prostředí nebo po navázání bílkoviny označená hydroxylová skupina disociuje a barva sloučeniny se změní ze světle žluté na tmavě zelenomodrou



Kyselina sulfosalicylová

Nález	Hodnocení	Přibližná koncentrace bílkoviny v g/l
Opalescence	stopy	0,05-0,1
Lehký zákal (průhledný, lze číst podložený text)	+	0,1-0,2
Mléčný zákal (nepřůhledný, bez vloček)	++	0,5-1,0
Mléčný zákal s tvorbou vloček	+++	2,0-5,0
Vločkovitá sraženina	++++	≥ 5,0

## Kvantitativní stanovení bílkovin v moči

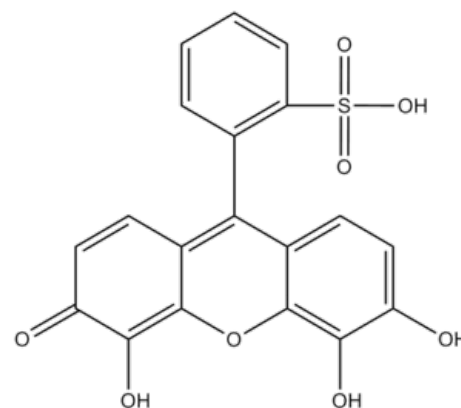
Kvantitativní stanovení bílkoviny v moči je metodicky poměrně obtížné. V klinicko-biochemické praxi se pro stanovení proteinurie používají metody, které můžeme podle principu rozdělit do tří skupin:

1. metody založené na denaturaci s následným **turbidimetrickým stanovením** intenzity zákalu (např. metody s kyselinou trichloroctovou nebo kyselinou sulfosalicylovou);
2. **kolorimetrické metody** s nebo bez předchozí denaturace bílkovin (např. biuretová reakce);
3. metody založené na **vazbě barviv na bílkoviny** (např. metoda s Coomasie brilliant blue G 250 dle Bradfordové, s pyrogalolovou červení a další).

Dnes se dává přednost technikám, které lze automatizovat - turbidimetrii a barevné reakci s pyrogalolovou červení.

## Stanovení proteinurie pomocí pyrogalolové červeně

Pyrogalolová červeně vytváří s molybdenanem růžový komplex s absorpčním maximem při 470 nm. Po navázání bílkoviny na tento komplex v kyselém prostředí dojde k posunu absorpčního maxima do oblasti 600 nm. Absorbance vzniklého komplexu činidla s bílkovinou je v koncentračním rozmezí 0,06–2,0 g/l lineárně závislá na koncentraci bílkoviny ve vyšetřovaném vzorku.



Pyrogalolová červeně

## Hodnocení velikosti proteinurie

Hodnocení velikosti proteinurie

< 0,150 g/24 hod	fyziologická proteinurie
< 1 g/24 hod	malá proteinurie (většinou tubulární)
1,0-3,5 g/24 hod	střední proteinurie
> 3,5 g/24 hod	velká proteinurie
> 10 g/24 hod	proteinurie zpravidla spojená s těžkým nefrotickým syndromem

## Typizace proteinurie

Pro stanovení typu proteinurie je nutné znát spektrum proteinů vylučovaných močí. K tomu se používají **elektroforetické metody**. Elektroforetické rozdělení močových bílkovin podle jejich molekulové hmotnosti umožňuje semikvantitativní hodnocení jednotlivých diagnosticky významných proteinů a **klasifikaci proteinurií**. Metodou volby pro analýzu bílkovin v moči se postupně stala elektroforéza v agaróze nebo v polyakrylamidovém gelu.

Aby se bílkoviny rozdělily podle velikosti (a nikoliv podle náboje), lze použít polyakrylamidového gelu, jehož hustota se směrem od katody k anodě zvyšuje (tj. postupně se zmenšují „oka“ či „póry“ v gelu). Malé molekuly v takovém gelu doputují dál než velké molekuly.

Jinou, častěji využívanou možností, je ošetření vzorku detergentem **laurylsíranem sodným** (dodecylsíranem sodným - SDS), který bílkovinu „obklopí“ a svým záporným nábojem nahradí její vlastní náboj. Vzniklé komplexy mají přibližně stejný náboj (přesněji: mají stejnou povrchovou hustotu náboje). Provádí-li se pak elektroforéza v poměrně hustém gelu, dělí se **v závislosti na relativní molekulové hmotnosti**: menší molekuly putují gelem rychleji než velké (technika molekulového síta). Nejrychleji se pohybuje β<sub>2</sub>-mikroglobulin, albumin leží asi uprostřed dělicí dráhy; mezi startem a albuminem jsou lokalizovány bílkoviny o Mr vyšší než 70 000.

## Hodnocení elektroforézy bílkovin v moči

U **glomerulárních proteinurií** nalzáme v elektroforeogramu proteiny mezi startem a albuminem včetně (tj. Mr > 70 000).



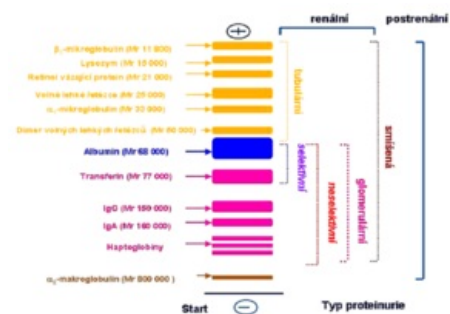
Bílkoviny pozorované u glomerulárních proteinurií

	Mr		
Albumin	68 000	selektivní	neselektivní
Transferin	77 000	selektivní	neselektivní
IgG	150 000		neselektivní
IgA	160 000		neselektivní
Haptoglobiny	85 000-1 000 000		neselektivní

**Tubulární proteinurie** jsou charakterizované přítomností bílkovin mezi albuminem a anodovým koncem elektroforeogramu (tj. Mr < 70 000).

Bílkoviny pozorované u tubulárních proteinurií

	Mr
β <sub>2</sub> -mikroglobulin	11 800
Lysozym	15 000
Retinol vázající protein (RBP)	21 000
Volné lehké řetězce Ig	25 000
α <sub>1</sub> -mikroglobulin	33 000
Dimer volných lehkých řetězců Ig	50 000
Albumin	68 000



Typizace proteinurie pomocí elektroforézy na agarózovém gelu v přítomnosti SDS

**Smíšené proteinurie** jsou charakterizovány přítomností bílkovin prokazovaných u glomerulárních i tubulárních proteinurií, lokalizovaných katodovým i anodovým směrem od proužku albuminu.

Přítomnost **α<sub>2</sub>-makroglobulinu** (Mr = 800 000) s ostatním nálezem podobným smíšené proteinurii svědčí pro **postrenální proteinurii**.

## Odkazy

### Související články

- Stanovení bílkoviny v moči
- Vyšetření moči
- Hematurie
- Glomerulární filtrace

### Externí odkazy

- Doporučené postupy ČLS JEP: Glomerulární proteinurie a hematurie (<http://www.cls.cz/dokumenty2/postupy/t265.rtf>)

## Reference

- BURTIS, Carl A, Edward R ASHWOOD a David E BRUNS. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 4. vydání. St. Louis, Mo : Elsevier Saunders, 2006. 2412 s. s. 576. ISBN 978-0-7216-0189-2.
- MUNTAU, Ania Carolina. *Pediatric*. 4. vydání. Praha : Grada, 2009. s. 420. ISBN 978-80-247-2525-3.
- ZIMA, Tomáš, et al. *Laboratorní diagnostika*. 2. vydání. Praha : Galén a Karolinum, 2007. 906 s. s. 106-7, 121-2. ISBN 978-80-246-1423-6.
- RACEK, Jaroslav, et al. *Klinická biochemie*. 2. vydání. Praha : Galén, 2006. 329 s. s. 170. ISBN 80-7262-324-9.
- KRAML, Jiří, et al. *Návody k praktickým cvičením z lékařské chemie a biochemie*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 1991. 312 s. s. 243. ISBN 80-7066-453-3.