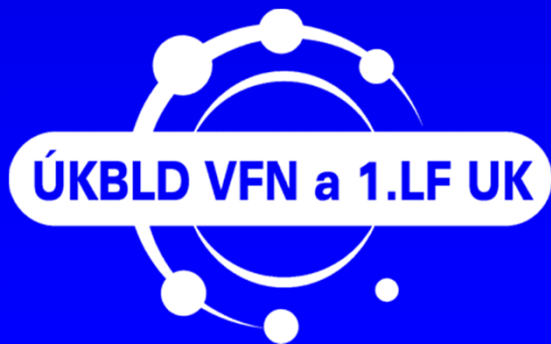


Proteiny, ledviny, volné radikály etc.....

Tomáš Zima

ÚKBLD VFN a 1.LF UK Praha



Dif.dg.

Příčinou akutního poškození ledvin může být:

1. snížený průtok krve ledvinou – prerenální urémie
2. poškození parenchymu – renální urémie
3. obstrukce v močovém traktu – postrenální urémie

Akutní poškození ledvin - náhlé, často přechodné snížení glomerulární filtrace. Je charakterizováno rychlým vzestupem urey a kreatininu v plazmě a je obvykle (ne vždy) spojeno s oligurií (pod 400 ml/den). Klasifikace RIFLE a AKIN.

Nový marker AKI – NGAL (neutrophil gelatinase associated lipocalin).

nutné správné rozlišení formy → adekvátní terapie

Laboratorní vyšetření :

stanovení S-urey a S-kreatininu

stanovení S- K^+ , S- Na^+ , S- Cl^- , S-osmolalita

vyšetření moče a močového sedimentu

vyšetření acidobazické rovnováhy

vyšetření elektrolytů v moči, osmolality moči

Krevní obraz – anémie

Vápník a anorg. fosfáty

Dif.dg.

Test	Jednotka	Hodnoty	
		Prerenální uremie	Renální uremie
U-Na ⁺	mmol/l	5-35	20 - 130
FE _{Na+}	%	0,2-1,0	1,0 - 8,0
U-Cl ⁻	mmol/l	5-25	25 - 140
FE _{Cl-}	%	0,10-1,0	1,0 - 9,0
U/S osmolalita		1,0-3,0	0,9 - 2,6
U/S urea		0,5-90 (zavisí na příjmu bílkovin,event rozpadu tkáňových proteinů)	0,5-30
U/S kreatinin		20-130	1-55
S-urea/kreatinin		30-140	15-140

Transferin

- 676 AA, Fe³⁺, Mr 81 000, glykoprotein
- syntéza v játrech, kostní dřeň, uzliny,
- 2-3,7 g/l
- transport Fe - anémie, malnutrice, hemochromatóza
- negativní reaktant akutní fáze
- *CDT transferin*

Feritin

- zásoby Fe, Mr 450 000,
- s věkem stoupá

 20-300 µg/l  4-200 µg/l

↓ nemoci jater, ca. jater, obstrukční ikterus,

↓ anémie Fe

↑ leukémie, zánět, hemochromatóza

Fanconiho syndrom

globální funkční porucha proximálního tubulu →

ztráty aminokyselin, glukózy, fosfátů, bikarbonátů a jiných solutů, jejichž přenos probíhá v proximálním tubulu →

acidóza, dehydratace, elektrolytová dysbalance, rachitida, osteomalacie a porucha růstu

příčiny - dědičné a získané

Vyšetření – mnohočetný myelom

- a) průkaz a typizace paraproteinu
 - M-komponenta v ELFO bílkovin (paraprotein)
 - imunofixace
 - průkaz Bence Jonesovy bílkoviny v moči
 - volné lehké řetězce kappa a lambda v séru
- b) v kostní dřeni je více než 10% plazmatických buněk
- c) na rtg velkých kostí jsou osteolytická ložiska
- d) progres jedného klonu imunokompetentních buněk potlačuje jiné systémy krvetvorby (tendence k anémii)

**Normální
vzorek**

Elektroforéza s vysokou rozlišitelností



Zones

Serum Proteins Found
in Zones

1. PREALBUMIN ZONE	-Prealbumin
2. ALBUMIN ZONE	-Albumin
3. ALBUMIN-ALPHA-1 INTERZONE	-Alpha-lipoprotein (Alpha-fetoprotein)
4. ALPHA-1 ZONE	-Alpha 1-antitrypsin, Alpha-1-acid glycoprotein
5. ALPHA-1-ALPHA-2 INTERZONE	-C α -globulin, Inter-alpha- trypsin inhibitor, Alpha- 1-antichymotrypsin
6. ALPHA-2 ZONE	-Alpha-2-macroglobulin, Haptoglobin
7. ALPHA-2-BETA-1 INTERZONE	-Cold insoluble globulin, (Hemoglobin)
8. BETA-1 ZONE	-Transferrin
9. BETA-1-BETA-2 INTERZONE	-Beta-lipoprotein
10. BETA-2 ZONE	-C β
11. GAMMA-1 ZONE	-IgA, (Fibrinogen), IgM (Monoclonal Ig's, light chains)
12. GAMMA-2 ZONE	-IgG, (C-reactive protein) (Monoclonal Ig's, light chains)

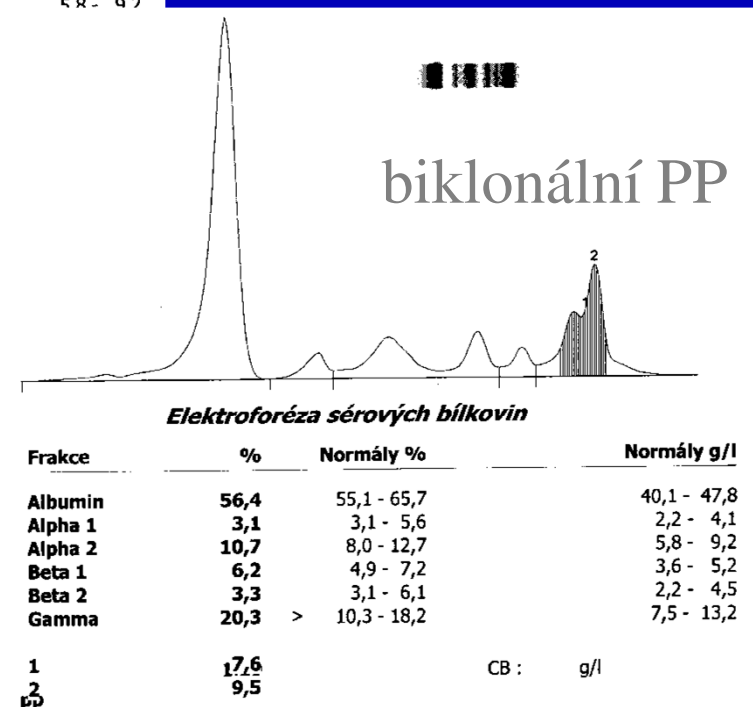
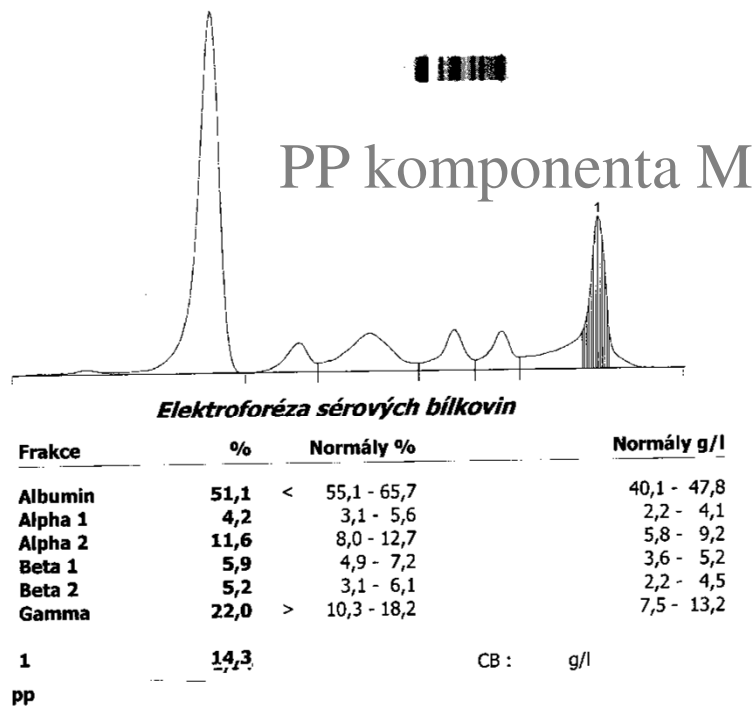
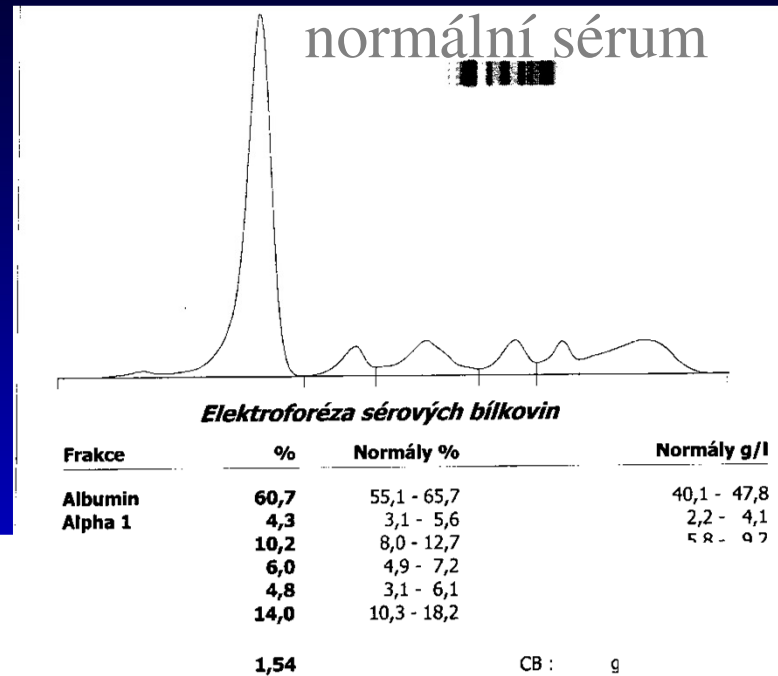
CUST.					P-COM.				
	Normal Range				L/16	11	17	Result	
DATE		TP						g/l	
S-No.		A/G			18.01.2001				
		ALB			0109	%		g/l	
		α 1-G			1.55	%		g/l	
		α 2-G			60.8	%		g/l	
		β -G			2.9	%		g/l	
		γ -G			8.5	%		g/l	
					10.1	%		g/l	
					17.7	%		g/l	
						%		g/l	
					P-Name				
					P-ID				
					AGE		SEX		
					COMM.				

Elektroforéza sérových bílkovin

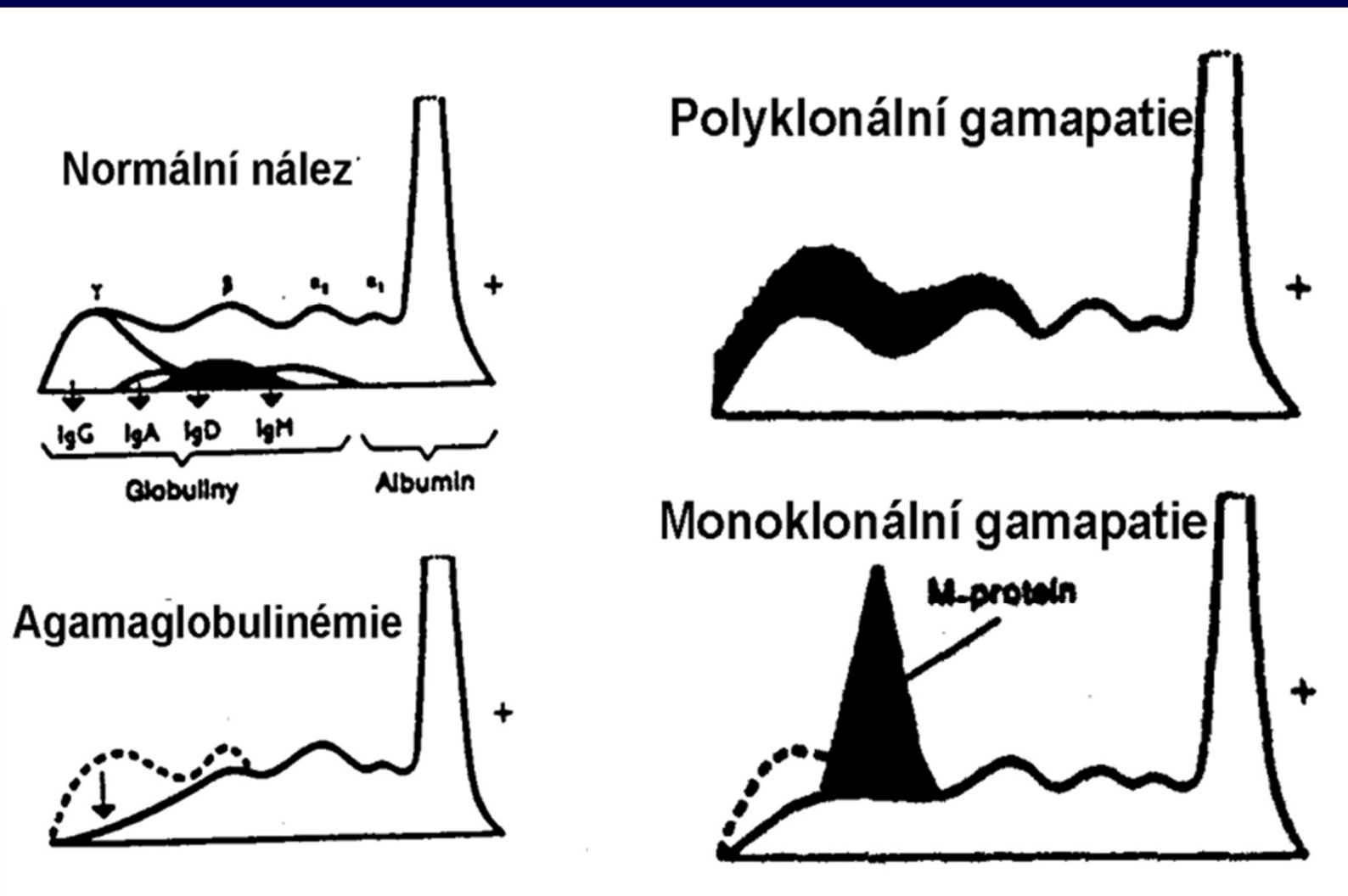
Frakce:	albumin	55 - 68
	α -1 glob.	1,6 - 5,6
	α -2 glob.	5.9 - 11.1
	β glob.	7.9 - 13.9
	γ glob.	11.4 - 18.4

- ✓ zánět : $\uparrow$ α -frakce
- ✓ chron. zánět, DM : $\uparrow$ β -frakce
- ✓ stáří: $\downarrow$ albumin, $\uparrow$ α -2 frakce, $\uparrow$ β -frakce

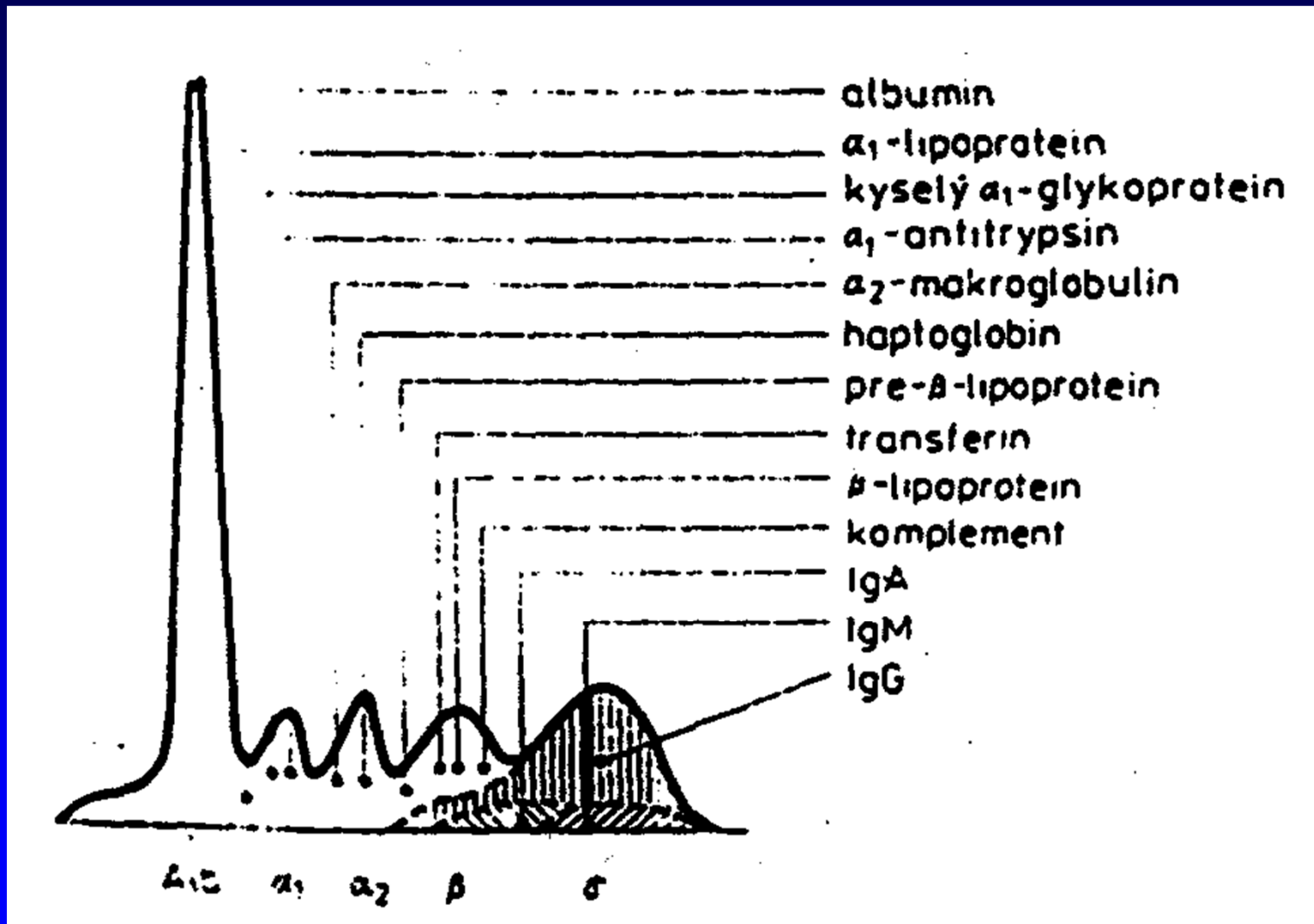
Nálezky kapilární elektroforézy



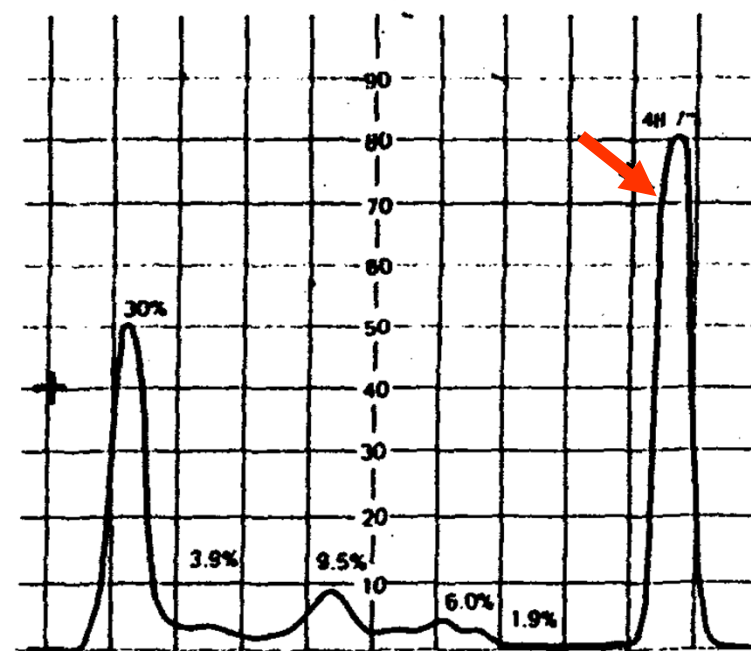
Nejdůležitější gamapatie



Proteinové komponenty na acetátcelulóze



Referenční vzorek Monoklonální vzestup

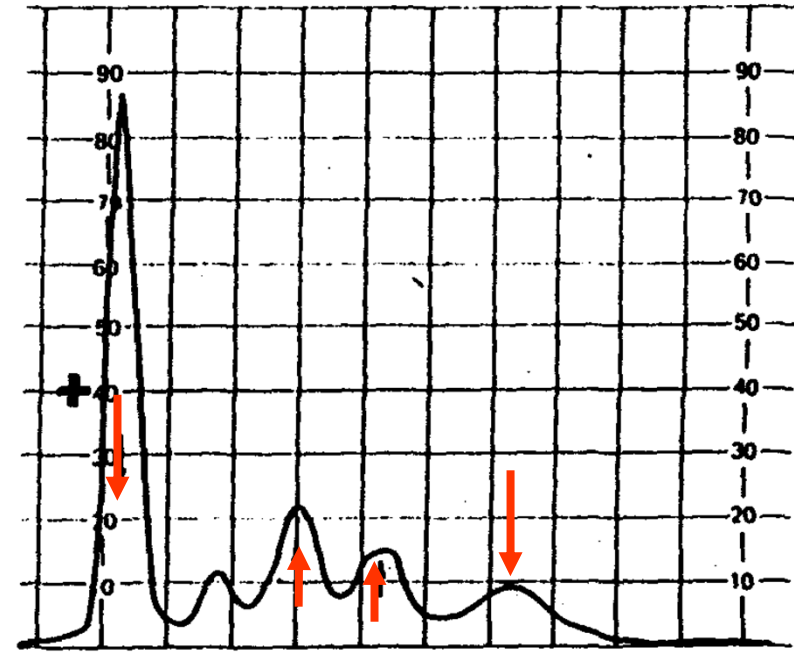
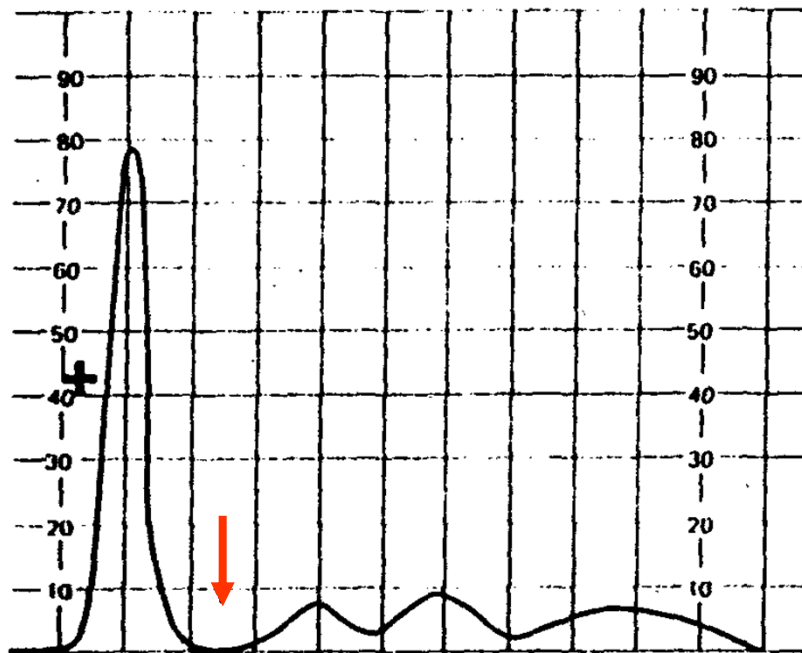


β -2-mikroglobulin

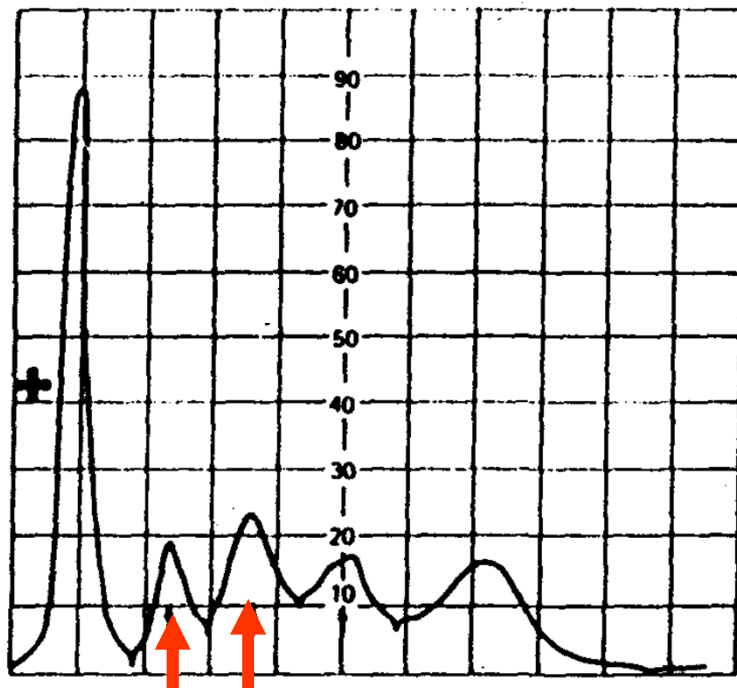
- neglykovaný polypeptid 100 AA, Mr 11 000
 - 0,8 – 2,4 mg/l
 - součást HLA systému
 - TU marker – NHL, CLL, myelom
 - tubulární poškození

Deficit antitrypsinu

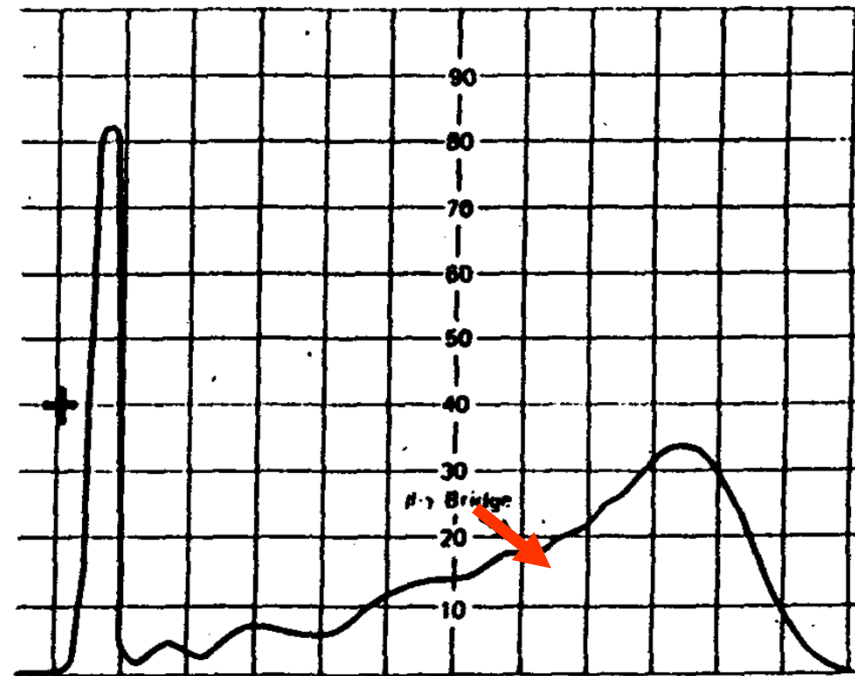
Nefrotický syndrom



Záněť



Cirhóza



Hyperkalaemia

Exclude factitious causes e.g. old or shaken sample, sample stored in fridge, difficulty in taking blood, prolonged venous stasis

Plasma bicarbonate

↑

Chronic respiratory acidosis

↓

Anion gap

↑

Metabolic acidosis
(diabetic, lactic atc.)
Chronic renal failure

↓

Mineralocorticoid deficiency
Renal tubular acidosis

Hypokalaemia

Intracellular redistribution of potassium occurs with stress, vitamin B12, insulin, β -adrenergic agonists

NB. Urinary potassium measurement is ONLY useful in normally hydrated patients

> 25 mmol/L

Plasma bicarbonate

N/↑

Current diuretic treatment
Magnesium deficiency
Nephrotoxic drugs
Mineralocorticoid excess

↓

Renal tubular acidosis
salt wasting
nephropathy

< 25 mmol/L

Plasma bicarbonate

N/↑

Chronic diarrhoea
e.g. laxative abuse
colonic villus adenoma
vomiting
diuretics

↓

Acute diarrhoea

Indikace k vyšetření bílkovin

- edém
- polyurie
- krvácení
- chronické onemocnění ledvin
- chronické průjmy
- chronické nemoci jater
- chronické choroby pojiva
- bolesti kostí
- lymfoproliferativní nemoci
- častý výskyt infekcí
- patologický nález - vysoké FW, proteinurie

Vztah diagnózy a biochemických testů

- | | |
|--------------------------------|----------------------------|
| ■ ztráty bílkovin | ■ CB, albumin |
| ■ nedostatečná syntéza | ■ ELFO |
| ■ retence vody a solí | |
| ■ dehydratace | |
| ■ akutní a chronické záněty | |
| ■ monoklonální gamapatie | ■ Immunofix |
| ■ anémie z nedostatku | ■ transferin, feritin, |
| ■ železa | ■ solubilní Trf receptor |
| ■ anémie chron. chorob | |
| ■ Wilsonova nemoc | ■ ceruloplasmin, Cu |
| ■ hemochromatoza | ■ transferin, CVK, feritin |
| ■ malnutrice | ■ Trf, alb, prealb |

Celková bílkovina

- **Skládá se:** cca 100 - 120 proteinů
- **Poločas:**

prealbumin	12-24 hodin
transferin	8 dní
albumin,	20 dní
IgE	2 dny
- **Rozmezí:** 65 – 85 g/l
- **Syntéza :** játra, lymfocyty, plasmocyty (Ig, složky komplementu)
- **Degradace:** exkrece, endogenní katabolismus
- **Fyz. význam:** koloidně osmotický tlak, transportní funkce, enzymy, protilátky, hormony a receptory, hemostáza a koagulace, nutrice, pufr

Celková bílkovina

■ **Snížení**

- malabsorbce
- jaterní nemoci
- zvýšené ztráty
 - střevo, moč, popáleniny
- zvýšený katabolismus
 - zánět, malignita
 - chron. nemoci
- diluce
- katabolismus
 - hladovění

Zvýšení

- + hypergamaglobulinémie
- + hypovolémie

Typy a markery proteinurie

<i>Form</i>	<i>Causes</i>	<i>Marker</i>
Selective glomerular	Diabetes Hypertension Early stage	Albumin, transferin
Non-selective glomerular	postural proteinuria, glomerulopathies fever, exercise	Albumin, IgG
Tubular	Bact. Pyelonephritis Interstitial nephritis Toxic nephropaties	α_1 microglobulin, β_2 microglobulin
Mixed	DM, hypertensive nephropathy Burns, chronic pyelonephritis	Albumin, total protein
Prerenal	Intravascular hemolysis, rhabdomyolysis, myeloma	Hemoglobin, myoglobin, Ig- light chains
Postrenal	Postrenal hematuria (stones, tumors)	IgG/albumin, α_2 macroglobulin/ albumin

Proteinurie

orientačně, kvantita

GBM do 150 000 Mr,

norma 120 mg/d

tubulointersticiální poruchy většinou < 1.0 g/d

tubulární proteinurie - β -2-mikroglobulin, α -1-mikroglobulin

selektivní - albumin a transferin bez Ig; Mr < 100 000

neselektivní – i imunoglobuliny Mr > 100 000

glomerulární proteinurie - selektivní a neselektivní

Typ proteinurie - index selektivity:

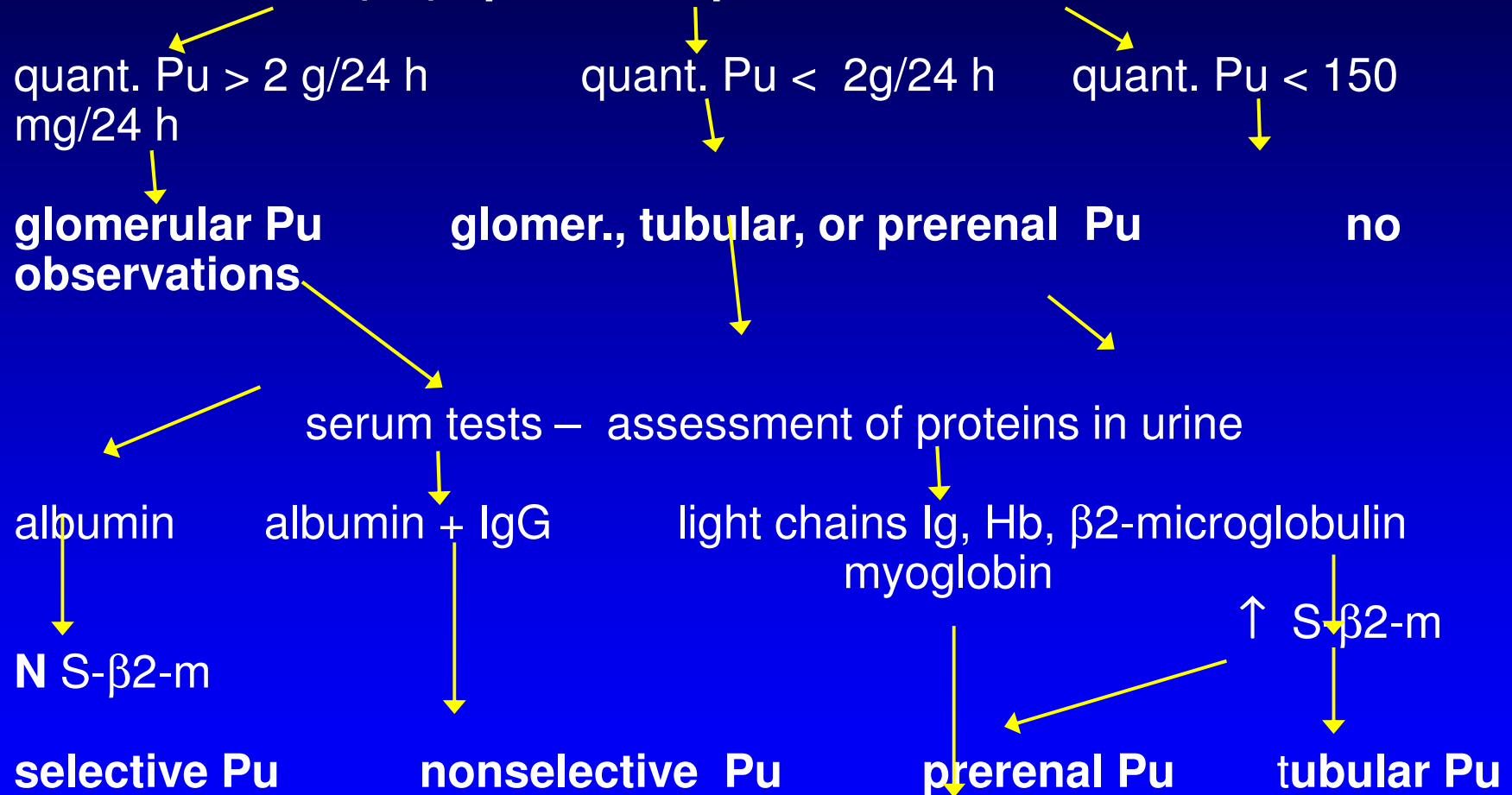
$$\frac{\frac{\text{IgG}_m}{\text{IgG}_s}}{\frac{\text{Trf}_m}{\text{Trf}_s}}$$

< 0,1 selektivní, > 0.2 neselektivní

0,1 – 0,2 středně selektivní

Diagnostický algoritmus – vyšetření proteinurie

Proteinuria (Pu) - positive dipstick examination



Klasifikace albuminurie a proteinurie

Kategorie albumin- urie	Albumin- urie mg/24 hod	ACR (poměr albumin/ kreatinin) mg/mmol	Kategorie protein- urie	Protein- urie mg/24 hod	PCR (poměr protein/ kreatinin) mg/mmol
A1	< 30	< 3	Fyziol. až mírně zvýš	<150	<15
A2	30-300	3-30	Zvýšená	150-500	15-50
A3	>300	> 30	Závažná	>500	>50

Albumin

Snížení

- malnutrice
- malabsopce
- zvýšená spotřeba při graviditě
- porušená syntéza - cirhoza
- zvýšený rozpad
- ztráty
- diluce
- zánět

Zvýšení

- + dehydratace
- + i. v. podání albuminu

Diagnostika nefrologických onemocnění

- Chemické vyšetření moči
 - hematurie, glukóza, ketolátky, bilirubin, nitrity, leukocyty
- Mikroskopické vyšetření moči
 - Erytrocyty, leukocyty, tubulární buňky, válce
 - Hamburgerův sediment
- Vyšetření funkce ledvin
 - - kreatinin, urea, další rutinní parametry
 - – GFR – sběr, výpočty, cystatin C
 - - Tubulární funkce –odpady, beta-2-mikroglobulin
- Vyšetření albuminurie nebo proteinurie
- Imunologická vyšetření

Glomerulární filtrace (GFR)

- Ukazatel funkce ledvin – filtrace ve všech nefronech:

$$\text{GFR} = N \times \text{SNGF}$$

SNGF = $K_i \times (P - \pi)$ - hodnota filtrace v jednom nefronu

K_i – filtrační koeficient

$K_i = k \times S$ k – efektivní hydraulická permeabilita,

S – velikost filtrační plochy

P – střední transkapilární hydraulický gradient

π – střední difference onkotického tlaku

N – počet funkčních nefronů

Pokles GFR u chronických renálních onemocnění nemusí být úměrný počtu zaniklých glomerulů – hypertrofické změny reziduálních nefronů

Faktory ovlivňující GF

Změny průtoku krve ledvinou

Změny hydrostatického tlaku v glomerulárních kapilárách

Změny v systémovém krevním tlaku

Změny hydrostatického tlaku v Bowmanove pouzdře

Obstrukce ureteru

Edém ledviny v pevném pouzdru

Změny koncentrace plazmatických proteinu:
dehydratace, hypoproteinemie atd. (méně významné faktory)

Změny Kf

Změny permeability glomerulárních kapilár

V současné době užíváme nejčastěji ke stanovení GF metodik přímých založených na principech stanovených Rehbergem či metodik výpočtových vycházejících z proměnné hodnoty sérového kreatininu nebo cystatinu C.

- ***Metody měření GF se sběrem moči***
- ***Metody měření GF bez sběru moči***

Metody výpočtové

- Rovnice CKD-EPI pro kreatinin a cystatin
- MDRD rovnice
- predikce Ckr dle Cockcrofta a Gaulta – **obsolentní**
- Výpočet dle Schwarze pro děti
- ...

CKD-EPI pro kreatinin – základní doporučená rovnice

CKD-EPI pro kreatinin (Levey et al. 2009)	eGFR (ml/s/1,73 m ²)
Ženy, S-kreatinin ≤ 62 μmol/l	$2,4 \cdot (\text{Skr}/61,9)^{-0,329} \cdot 0,993^{\text{věk}}$ (. 1,159 - černá populace)
Ženy, S-kreatinin > 62 μmol/l	$2,4 \cdot (\text{Skr}/61,9)^{-1,209} \cdot 0,993^{\text{věk}}$ (. 1,159 - černá populace)
Muži, S-kreatinin ≤ 80 μmol/l	$2,35 \cdot (\text{Skr}/79,6)^{-0,411} \cdot 0,993^{\text{věk}}$ (. 1,159 - černá populace)
Muži, S-kreatinin > 80 μmol/l	$2,35 \cdot (\text{Skr}/79,6)^{-1,209} \cdot 0,993^{\text{věk}}$ (. 1,159 - černá populace)

MDRD rovnice

- MDRD₇ (Levey) :
 $170 \cdot S_{kr}^{-0,999} \cdot \text{věk}^{-0,176} \cdot N_{urea}^{-0,170} \cdot \text{albumin}^{0,318} \cdot 0,762(\text{♀}) \cdot 1,18$ (černá populace)
- Aktualizovaná rovnice pro SI jednotky
- $eGF = 547,1535 \cdot (S_{kr})^{-1,154} \cdot \text{věk}^{-0,203} \cdot 0,742$ (ženy) $\cdot 1,21$ (černá populace) [ml.s⁻¹.1,73m⁻²]
- Při použití standardizované metody stanovení kreatininu, má rovnice modifikovaný tvar:
- $eGF = 515,3832 \cdot (\text{stand } S_{kr})^{-1,154} \cdot \text{věk}^{-0,203} \cdot 0,742$ (ženy) $\cdot 1,21$ (černá populace) [ml.s⁻¹.1,73m⁻²]
-

Hodnocení MDRD eGFR

- U vypočtených hodnot vyšších než $1,5 \text{ ml.s}^{-1}.1,73\text{m}^{-2}$ se doporučuje uvádět hodnotu $\geq 1,5 \text{ ml.s}^{-1}.1,73\text{m}^{-2}$ vzhledem k nepřesnosti rovnice v této oblasti.
- Hodnoty $1,0$ až $1,5 \text{ ml.s}^{-1}.1,73\text{m}^{-2}$ je nutno individuálně hodnotit ve vztahu ke klinickému obrazu.
- Hodnota eGF dle MDRD nižší než $1,0$ je považována za hodnotu patologickou.
- Odhad GF pomocí vzorců MDRD se nedoporučuje používat u dětí a těhotných.

Faktory ovlivňující vyšetření GF

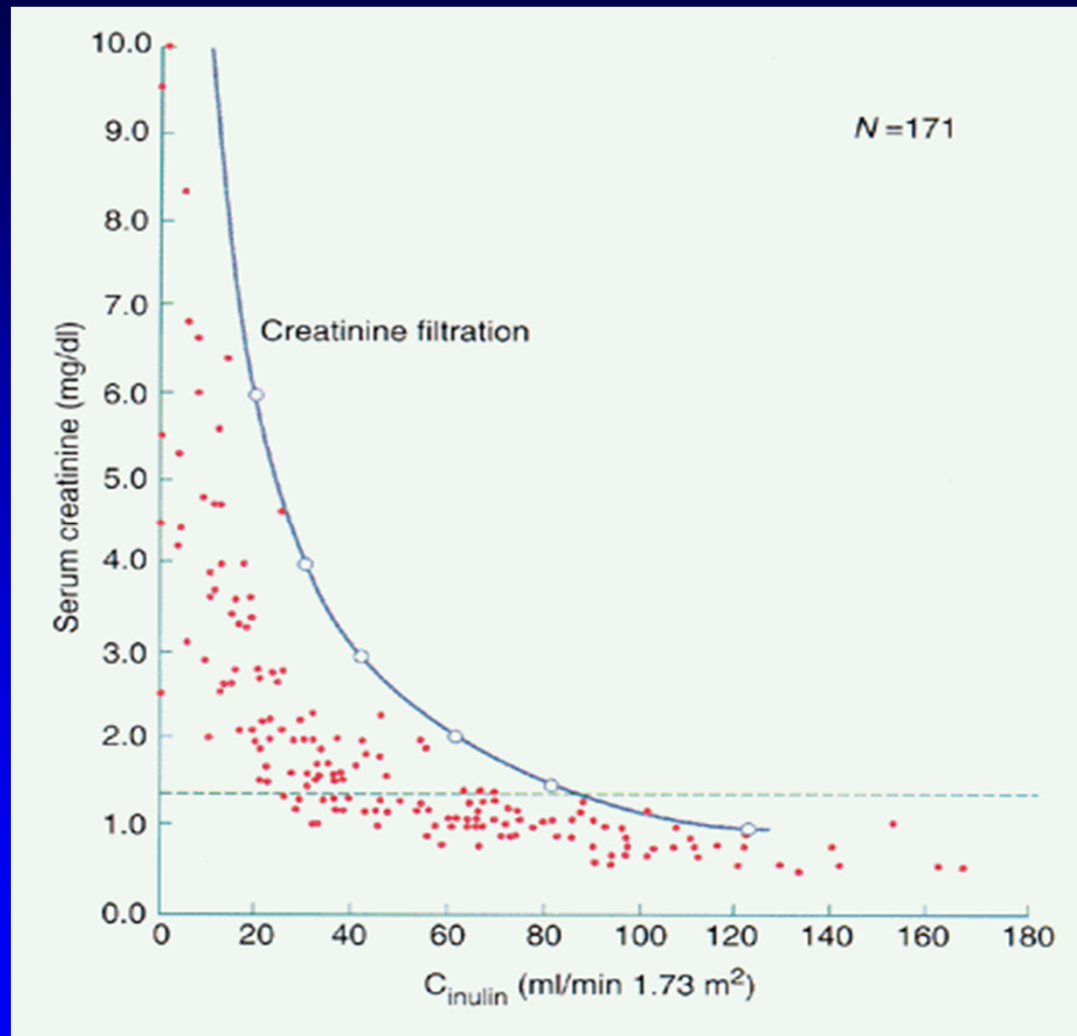
**Největším problémem je přesný
sběr moči
a stanovení kreatininu**

Kreatinin

- Vznik neenzymově ve svalu z kreatinfosfátu
- Tvorba odráží velikost svalové hmoty a za podmínek fyzického klidu a bezmasé diety je stabilní
- **Vylučování glomerulární filtrací**, sekrece tubuly při zvýšené koncentraci
- **Kreatinin v moči** – vylučování poměrně konstantní, odráží velikost a aktivitu svalové hmoty, indikátor správnosti 24 hod. sběru moči

Ovlivnění koncentrace kreatininu

- Vliv svalové hmoty (např. atrofie)
- Příjem proteinů a aminokyselin
- Věk – děti a stáří
- Obezita, malnutrice
- Léky - cefalosporiny, trimetoprim, cimetidin
- Extrarenální vylučování kreatininu (především střevem u jedinců v pokročilejším stadiu CKD)
- Změny distribučního prostoru kreatininu (zvláště u jedinců s velkými otoky)
- Funkce jater – v játrech je tvořen kreatin, substrát pro kreatinin



Vztah mezi koncentrací kreatininu v séru a GFR, měřeno jako clearance inulinu u nemocných s glomerulárním onemocněním.

Od 40 let věku nastává *pozvolný pokles GF*, která ve věku 80 – 90 let dosahuje *přibližně poloviční hodnoty* proti jedincům mezi 20 – 30 lety. Tento pokles GF je *zřejmě důsledkem poklesu průtoku plasmy a krve ledvinou.*

Pozvolný pokles GF Přibližně o $0,17 \text{ ml.s}^{-1}.1,73\text{m}^{-2}$ za dekádu života.

Cystatin C je polypeptid patřící do skupiny inhibitorů cysteinové proteázy. Je volně filtrován a následně resorbován a metabolizován v tubulech.

Rovnice CKD-EPI pro cystatin (2012) – užití ve speciálních případech - potvrzení CKD, těhotné, děti...

Kombinovaná rovnice CKD-EPI pro cystatin a kreatinin.

Akutní zánět má 2 fáze:

- **včasná :**
- **zvýšení** - haptoglobin, orosomukoid, ceruloplasmin, α -1-antitrypsin, fibrinogen, CRP, C3
- **snížení** - negativní reaktanty ak. fáze *albumin, prealbumin, transferin*
- **pozdní:**
- **zvýšení** - γ -globuliny

Prealbumin (Transthyretin)

- Mr 21 000 , kombinace s TBG, poločas 1-2 dny
- 0,1-0,4 g/l
- nutrice, proteosyntéza, RAF

↑ steroidy

↓ jaterní nemoci, nekróza, RAF

CRP

- β -frakce, Mr 110 000 - 140 000
- *Váže C polysacharid z pneumokoků*
- Citlivý, ale nespecifický
- fyziol. hodnoty do 10 mg/l (8,5)
stanovení - supersenzitivní CRP
- ↑ při zánětu, FW,
kontrola imunosupresivní terapie

Kyselý α -1-glykoprotein = orosomukoid

- 45 % sacharidů (kyselina sialová)
 - Funkce nejasná
 - 0,5 – 1,2 g/l, Mr 44 000
 - RAF, pozdější nástup než CRP (monitorace průběhu – vztah CRP a orosomukoid)
- ↑ zánět, perinatální infekce, chronické záněty, malignity, SLE

Haptoglobin

0,3 – 2,0 g/l

alotypy – dříve vyšetření paternity

- haptoglobin váže uvolněný hemoglobin 1:1
 - při silné hemolýze nulové hodnoty

↓ nemoci jater, intravazální hemolýza,
hemolytická anemie, cirhóza,

↑ zánět, operace i trauma

CAVE - zánět + hemolýza - normální hodnota !!

Fibrinogen

- Dimer 3 řetězců, Mr 340 000
- 2-4 g/l, poločas 2-4 dny
- reaktant akutní fáze koagulace,
 - ↑ zánět, stav po operaci, malignity, RA, AIM, nefrotický syndrom, obstrukce žlučových cest
 - ↓ DIC, hyperfibrinolýza, těžké postižení jater, fibrinolytická léčba

Amyloid

- fibrily amyloidu
 - 1) AL - L řetězce
 - 2) sekundární řetězce AA
 - 3) Transtyretin (prealbumin) se záměnou 1 AMK
- prekurzorový protein SAA zdroj depozit amyloidu v orgánech
- meze 50-300 mg/l

α -1-antitrypsin

- inhibitor serinových proteáz,
- 1,0 – 2,0 g/l, Mr 53 000
- Různé genetické variace např. ZZ (10% aktivita)
- záněty, nádory, hepatopatie
- ↓ Primární plicní emphysem, neonatální hepatitidy, cystická fibróza, exudativní enteropatie

Nové ukazatele zánětu

- **Elastáza z granulocytů (60-110 ug/l)**
 - reakce na bakteriální zánět
- **Prokalcitonin (do 0,5 ug/l)**
 - 116 AK, Mr 13 000
 - stimulace bakteriální a mykotickou infekcí
- **Neopterin (2-7 nmol/l)**
 - produkován makrofágy po stimulaci INF- γ
 - vylučován T lymfocyty
 - měřítko buněčné imunity

Ceruloplasmin

Mr 140 000, 6 atomů Cu, α -2 frakce

- 90% sérové mědi

- ženy vyšší,

- 0,2 - 0,6 g/l

↓ m. Wilson, nefrotický syndrom

↑ cholestáza intrahepatální, záněty, AIM

Reaktivní formy kyslíku a dusíku

Radikály

- superoxidový aniont (superoxid)
- Hydroxylový radikál
- Peroxylové radikály
- Alkoxylové radikály
- Hydroperoxylový radikál
- Oxid dusnatý

Reaktivní formy

- Peroxid vodíku
- Singletový kyslík
- Kyselina chlorná
- Ozon
- Kyselina dusitá
- Peroxynitrit
- Nitronium
- Nitrosyl
- Nitroxid
- Alkylperoxynitril

Metody detekce poškození organismu volnými radikály

Přímá měření

- **elektronová spinová rezonance (ESR)**
- **radikální trapping**
- **pulsní radiolýza**
- **chemiluminiscence**

Metody detekce poškození organismu volnými radikály

Nepřímá měření

➤ **antioxidační systémy**

- stanovení jednotlivých látek (enzymy, substráty, stopové prvky)
- celková antioxidační kapacita

➤ **stanovení autoprotílatek**

➤ **Stanovení látek vznikajících při radikálových reakcích**

- malondialdehyd
- konjugované dieny
- hydroperoxydy lipidů
- aldehydy (např. 4-HNE)
- pentan, etan
- poškozená DNA baze
- modifikované aminokyseliny
- oxLDL
- AGEs a AOPP