

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Ústav klinické biochemie a patobiochemie FN v Motole

**Libuše Moravcová**

**Vývoj metody pro stanovení albuminu  
v moči pomocí HPLC**

*Bakalářská práce*

Praha 2011

Autor práce: **Libuše Moravcová**

Vedoucí práce: **Ing. Eva Klapková, Ph.D.**

Oponent práce: **Ing. Karel Kotaška, Ph.D.**

Datum obhajoby: **2011**

## **Bibliografický záznam**

MORAVCOVÁ, Libuše. *Vývoj metody na stanovení albuminu v moči pomocí HPLC*. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2011, s. 61. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Klapková, Ph.D.

## **Anotace**

Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout a validovat chromatografickou metodu umožňující stanovení albuminu v moči, dále pak provést porovnání imunochemického a chromatografického stanovení albuminu v moči na patientských vzorcích.

Albumin je protein, vyskytující se především v plazmě. Jeho vylučování močí je spojováno s onemocněním ledvin. Jako patologická hodnota celkové proteinurie je stanovena hodnota 150 mg/24 hod. Z toho méně než 30 mg/24 hod. tvoří albumin. Stanovení hladiny albuminu je důležité především u pacientů s diabetem, hypertenzí a s onemocněním ledvin. Albumin v moči se rutinně stanovuje pomocí imunochemických metod, které nejsou schopny detekovat veškerý albumin. Fragmenty albuminu, které nejsou reaktivní pak imunochemickým metodám unikají.

V této práci byla vyvinuta HPLC metoda pro stanovení albuminu v moči. Metoda byla plně validována (přesnost, správnost, mez detekce, robustnost) a porovnána s imunochemickým stanovením na přibližně 105 patientských vzorcích.

## **Klíčová slova**

močový albumin, HPLC, proteinurie, mikroalbuminurie, diabetes mellitus

## **Annotation**

The aim of this bachelor thesis was to develop and validate chromatographic method enabling determination of albumin, and proceed comparison of immunochemical and chromatographic measurement of albumin in urine patient samples. Albumin is protein found mainly in plasma. It is discharged with the urine and it is connected to kidney diseases. The pathological value for a general proteinuria is 150 mg/24hrs. From that amount less than 30 mg/24hrs is albumin. Determination of the level of albumin is important particularly for patients with diabetes, hypertension and kidney diseases. Urinary albumin is commonly measured by immunochemical methods, which are not able to detect the entire amount of albumin. Fragments of albumin, which are not reactive are not detected by these methods. In this work the HPLC method was developed for the determination of albumin in urine. This method was fully validated (precision, accuracy, limit of detection, robustness) and compared with immunochemical determination on approximately 105 urine patients samples.

## **Keywords**

urinary albumin, HPLC, proteinuria, microalbuminuria, diabetes mellitus

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením Ing. Evy Klapkové, Ph.D., uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 9.5.2011

Libuše Moravcová

## **Poděkování**

**Především chci poděkovat školitelce Ing. Evě Klapkové, Ph.D. za odborné vedení, poskytnuté cenné rady, všestrannou pomoc a trpělivost, kterou mi při zpracování této práce poskytla. Dále děkuji MUDr. Ing. Magdaléně Fořtové za spolupráci, vrchní laborantce Mgr. Martině Bunešové, úsekové laborantce Vendulce Havránkové a všem pracovníkům Ústavu klinické biochemie a patobiochemie FN v Motole za podporu.**

# Obsah

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>1. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
1.1 PROTEINURIE .....	11
1.1.1 Typy proteinurie .....	12
1.2 ALBUMIN .....	14
1.2.1 Syntéza albuminu.....	14
1.2.2 Funkce albuminu v organismu .....	15
1.3 MIKROALBUMINURIE .....	15
1.4 METODY STANOVENÍ CELKOVÉ BÍLKOVINY A ALBUMINU V MOČI ..	17
1.4.1 Základní vyšetření moče .....	17
1.4.2 Chemické vyšetření diagnostickými proužky .....	19
1.4.3 Srážecí reakce .....	20
1.4.4 Biuretová metoda .....	21
1.4.5 Imunochemické metody.....	21
1.4.6 Elektroforéza bílkovin .....	22
1.4.7 Chromatografické metody .....	23
1.5 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE .....	25
1.5.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	25
1.5.2 Způsoby stanovení albuminu pomocí HPLC.....	26
<b>2. CÍLE</b> .....	<b>29</b>
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>30</b>
3.1 MATERIÁL A METODY .....	30
3.1.1 Přístroje.....	30
3.1.2 Ostatní materiál.....	31
3.1.3 Reagencie.....	31
3.1.4 Příprava reagensů .....	32
3.1.5 Příprava vzorků pro analýzu .....	34
3.1.6 Chromatografická analýza vzorků .....	34
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>35</b>

4.1 VÝVOJ METODY .....	35
4.2 VALIDACE METODY .....	43
4.2.1 Kalibrace .....	43
4.2.2 Opakovatelnost .....	44
4.2.3 Reprodukovatelnost .....	45
4.2.4 Správnost .....	46
4.2.5 Mez detekce .....	47
4.2.6 Robustnost .....	48
4.3 STANOVENÍ HLADINY MOČOVÉHO ALBUMINU U JEDNOTLIVÝCH SKUPIN PACIENTŮ .....	49
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>56</b>
<b>SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>57</b>

## Seznam použitých zkratek

IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
NAG	N-acetylglukosaminidasa
PCR	protein creatinine ratio
ACR	albumin creatinine ratio
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
SDA-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s laurylsíranem sodným
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
HSA	human serum albumin
TRIS	tris-(hydroxymetyl)-aminometan
PEG	polyetylen glykol
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
TFA	kyselina trifluoroctová
Ag	antigen
Ab	protilátka

## ÚVOD

Selhání ledvin v důsledku jejich onemocnění je světovým problémem veřejného zdraví. Stále se zvyšující incidence a prevalence, nezanedbatelně vysoké náklady na léčbu a následky onemocnění, stejně tak i ne vždy úspěšné výsledky léčby nutí odborníky stále zkvalitňovat strategii pro prevenci, odhalování a vyhodnocování příčin ledvinového onemocnění. Přestože rizikové faktory se místně poněkud liší, je důležité zvýšit účinnost využití dostupných odborných zkušeností a zdrojů na zlepšení péče a výsledků léčby komplexně [24, s. 617].

V současné době se stává vážným zdravotním i ekonomickým celosvětovým problémem nárůst zastoupení diabetické nefropatie jako příčiny terminálního selhání ledvin. Diabetická nefropatie je onemocnění vznikající kvůli změnám v ledvinách u nemocných s diabetem I. nebo II. typu. Rozvíjí se téměř u třetiny nemocných s diabetem a výrazně snižuje kvalitu jejich života. K progresi onemocnění přispívá též vysoký krevní tlak, obezita, kouření a genetické predispozice. U velké části pacientů postižených diabetickou nefropatií v průběhu onemocnění dochází k výskytu mikroalbuminurie. Tito pacienti mají ve srovnání s pacienty bez mikroalbuminurie zvýšené riziko kardiovaskulárních chorob a také přežití pacientů s diabetickou nefropatií v dialyzačním programu je výrazně nižší, než pacientů s jinou příčinou selhání ledvin. Cílenou terapií je možné zmírnit dopady onemocnění a zkvalitnit život pacientů. Proto je důležitým cílem výzkumu co nejdříve zachytit příznaky diabetické nefropatie [31, s. 406].

# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 PROTEINURIE

Proteinurie patří mezi symptomy související s onemocněním močového systému. Mezi nejčastější příčiny těžké proteinurie s rozvojem nefrotického syndromu patří diabetes mellitus a akutní nebo chronická glomerulonefritida. Méně často je důsledkem infekčního onemocnění, systémového onemocnění pojiva, sekundární amyloidózy, toxického poškození ledvin nebo alergické reakce. Za normálních okolností se filtruje přes glomerulokapilární stěnu z krve do moči jen minimum makromolekul. Jedná se o nízkomolekulární proteiny a albumin. Toto minimální množství profiltrovaných proteinů je téměř kompletně reabsorbováno epitelem proximálního tubulu a degradováno na peptidy a aminokyseliny. Proteinurie je definována jako odpad bílkoviny do moči přesahující 150 mg/24 hod. Odpad proteinu v definitivní moči zdravého člověka v průměru kolísá mezi 40–80 mg za den, z toho je jen 10 mg albuminu. Fyziologicky se do moči ztrácí méně než 30 mg albuminu/24 hod [1, s. 62].

První pozorovatelnou patologickou změnou bývá zvýšení podílu albuminurie. Za normální je považována ještě ztráta proteinu do 150 mg/24 hod. Glomerulární kapilára má velmi svéráznou strukturu a její povrch nese negativní náboj, který udržuje intravaskulárně negativně nabitě molekuly, např. albumin. Endotel ani epitel glomerulárních kapilár netvoří souvislou vrstvu, ale mají otvory, které určují ultrafiltrační vlastnosti kapiláry v závislosti na velikosti molekul. Do primární moči neprojdou molekuly o hmotnosti nad 100000 Da. Porušení ultrafiltrační schopnosti glomerulární kapiláry se vyskytuje u glomerulopatií, což je onemocnění ledvin, spočívající v postižení glomerulů. Druhotně se porušení ultrafiltrační schopnosti vyskytuje také v pokročilém a progredujícím stadiu jiných nefropatií. Nefropatií rozumíme obecné označení pro nezánettivé onemocnění ledvin. Morfologie rozeznává 2 základní typy glomerulopatie, které se v různých obměnách vyskytují při primárních i systémových glomerulonefritidách: jsou to proliferativní a membranózní glomerulonefritida. Glomerulonefritida je zánětlivé onemocnění ledvin, postihující především glomerulus. Proliferativní glomerulonefritida je charakterizována zvýšenou buněčností glomerulu a různým stupněm jeho sklerotizace. Při extrakapilární glomerulonefritidě proliferuje navíc epitel Bowmanova pouzdra, což je spojeno

s rychlým úbytkem funkce. Při membranózní glomerulonefritidě jsou nápadně difúzně ztlustělé stěny glomerulárních kapilár při normální buněčnosti glomerulu. Dalším onemocněním je nefrotický syndrom s minimálními změnami. Při tomto onemocnění je téměř normální glomerulus ve světelné mikroskopii, ale nápadné změny viditelné v elektronovém mikroskopu a jeho nepříznivá forma tzv. fokálně segmentární glomeruloskleróza, což je sklerotizace úseků některých glomerulů, patrná ve světelné mikroskopii [3, s. 2].

### 1.1.1 Typy proteinurie

#### A. Podle lokalizace

- Prerenální – při nadměrné produkci nízkomolekulárních proteinů. Jedná se o snadno filtrovatelné proteiny, jejichž filtrace překročí reabsorpční kapacitu proximálního tubulu. Např. vylučováním volných lehkých řetězců imunoglobulinů u některých monoklonálních gamapatií, myoglobinu při velkém svalovém zhmoždění, hemoglobinu u akutní hemolýzy, lysozymu u některých typů leukémie či beta-2-mikroglobulinu u některých malignit (zejména hematologických), také tkáňových katabolitů, event. proteinů akutní fáze. V tomto případě má pacient ledviny zdravé. Jedná se v podstatě o typ over-flow proteinurie, čili z nadbytku bílkovin, kterých se tvoří víc, než je možno absorbovat zpět [8, s. 60; 9, s. 28].

- Renální - podmíněna zvýšenou syntézou nebo zvýšeným uvolňováním strukturálních bílkovin pocházejících z ledvinného parenchymu. Příčinou je onemocnění ledvin.

- Postrenální – vzniká přímou exsudací bílkovin z plazmy do moči ve vývodných cestách močových. Typická je přítomnost alfa-2-makroglobulinu a IgM. Nejčastěji tato proteinurie vzniká z důvodu zánětu nebo krvácení. Nález bílkoviny je ovšem v tomto případě vedlejší, převládá leukocyturie [8, s. 60].

#### B. Podle místa původu

- Glomerulární – jedná se o zvýšenou propustnost bílkovin přes porušenou glomerulární membránu.

Selektivní - ztráta negativního náboje glomerulární bazální membrány, důsledkem je zejména albuminurie. Dále se v moči nalézá transferin, chybějí větší proteiny (imunoglobuliny a makroglobuliny) a mikroproteiny.

Neselektivní - ztráta selektivity podle velikosti při těžším poškození glomerulární membrány, kterou pak procházejí i proteiny s velkou molekulovou hmotností, např. IgG, IgA.

- Tubulární – postižením proximálního tubulu dochází ke zvýšenému vylučování nízkomolekulárních bílkovin, které se za normálních okolností dostávají glomerulární filtrací do primárního filtrátu a následně se tubulární resorbují zpětně reabsorbují. Např. alfa-1-mikroglobulin, beta-2-mikroglobulin, NAG.

- Glomerulotubulární – smíšená. Dochází ke kombinaci glomerulární a tubulární proteinurie.

Tento typ proteinurie se vyskytuje například při chronické renální insuficienci, což je termín označující pacienty se sníženou funkcí ledvin u kterých ale ještě nedošlo k jejich nezvratnému selhání

### C. Podle intenzity

Mírná proteinurie s hodnotou 0,15 – 1,5 g bílkovin/24 hod. Tato proteinurie svědčí pro chronická poškození ledvin, zejména intersticiální nefritidou, nebo pro toxické poškození např. léky.

Střední proteinurie s hodnotou 1,5 – 3,5 g bílkovin/24 hod. Příčinou je nejčastěji akutní glomerulonefritida nebo akutní toxické poškození ledvin.

Těžká proteinurie s hodnotou > 3,5 g bílkovin/24 hod svědčí o nefróze a nefrotickém syndromu [2, s. 1; 4, s. 28].

### D. Klinicko – diagnostické třídění

- Intermittentní proteinurie

Funkční - vzniká např. po námaze, prochlazení nebo emočním stresu.

Febrilní – vyskytuje se při horečnatých stavech.

Posturální – ortostatická proteinurie. U některých mladistvých se vyskytuje pouze ve vztyčené poloze. Bývá vysvětlována vazokonstrikcí při bederní hyperlordóze. Ztráty

bílkoviny v tomto případě nebývají větší, než 1 g/24 hod. Ve vzorcích moče, získaných vleže se bílkovina nenachází. Posturální proteinurie je prognosticky benigním symptomem a mizí v dospělosti.

Většina těchto proteinurií se spontánně upraví po odeznění vyvolávající příčiny.

- Perzistující proteinurie

Jako perzistující proteinurii označujeme proteinurii nalézanou v opakovaně vyšetřovaných vzorcích moče. Tento nálezní svědčí o renálním onemocnění, i když jsou renální funkce intaktní [2, s. 1].

## **1.2 ALBUMIN**

Proteiny jsou nejsložitější a funkčně nejdůležitější molekuly v organismu. Tvoří podstatnou část každé buňky. Jsou to makromolekulární sloučeniny tvořené různě dlouhými polypeptidovými řetězci, které jsou složeny z proteinogenních aminokyselin. Ty jsou vzájemně pospojovány peptidovou vazbou [12, s. 72].

Albuminy patří do skupiny tzv. sféroproteinů neboli globulárních proteinů, což jsou proteiny nepravidelně kulovitého či protáhle elipsovitého tvaru, rozpustné ve vodě nebo ve zředěných roztocích neutrálních solí. Jejich prostorové uspořádání je takové, aby hydrofilní skupiny byly převážně lokalizovány na povrchu, kde mohou dobře interagovat s vodou. Nejznámější je sérový albumin – hlavní protein krevní plazmy, tvořící přibližně 60 % celkové hmotnostní koncentrace plazmatických proteinů. Molekulová hmotnost albuminu je relativně malá - 67 kDa [6, s. 620].

### **1.2.1 Syntéza albuminu**

Jako většina proteinů krevní plazmy je i albumin syntetizován v játrech, která denně produkují přibližně 12 g tohoto proteinu. Množství ihned dostupného albuminu v organismu je přibližně 3,5 – 5,0 g/kg tělesné hmotnosti. Do krevní cirkulace se albumin dostává jaterní žilou. Jakákoliv porucha schopnosti jater syntetizovat proteiny se tedy projeví i snížením hladiny sérového albuminu. Jeho syntéza je ovlivňována dostupností aminokyselin, především tryptofanu. Snížení koncentrace albuminu však může být způsobeno i proteinovou podvýživou, velkými ztrátami močí při ledvinovém onemocnění. Jeho snížená hladina ale může být také ukazatelem zánětů, akutních stavů

nebo nádorů, protože albumin je negativním reaktantem akutní fáze. Zvýšení koncentrace albuminu může být způsobeno dehydratací, kdy dojde ke snížení objemu vody v plazmě a tím se hladina albuminu relativně zvýší. Albumin se kromě plazmy nachází též ve tkáních, hlavně v podkoží a ve svalech. Nepatrné množství proniká hematoencefalickou bariérou do mozkomíšního moku [33, s.1].

### **1.2.2 Funkce albuminu v organismu**

Albumin se významně podílí na regulaci onkotického tlaku krve a ovlivňuje tak distribuci vody mezi intravazální a intersticiální tekutinou. V případě snížené hladiny albuminu proto dochází k tvorbě otoků. Dále albumin slouží k transportu například volných mastných kyselin, bilirubinu, hormonů, vápníku, hořčíku, ale i léků. Je zdrojem aminokyselin pro proteosyntézu v periferních tkáních, má pufrací schopnost a je největším antioxidantem krevní plazmy.

Biologický poločas albuminu je přibližně 19 hodin, pak je odbouráván, především endoteliemi krevních kapilár. Malé množství albuminu proniká do moči, ztrácí se také difúzí do trávicí trubice [7, s.72; 8, s. 69].

Bílkoviny, včetně albuminu jsou degradovány během průchodu ledvinnými glomeruly. Fragmenty bílkovin, které pravděpodobně vznikají v lysozomech proximálního tubulu se pak vylučují močí během několika minut. Návrat těchto degradačních produktů zpět do krevního oběhu nebyl zjištěn. Poměr neporušeného a degradovaného albuminu je důležitý marker renální patologie. Intaktní forma vylučovaného albuminu není detekovatelná běžně používanými imunochemickými metodami, protože tato forma nereaguje s příslušnou protilátkou [30, s. 1717].

### **1.3 MIKROALBUMINURIE**

Zavedený termín mikroalbuminurie není z biochemického hlediska příliš přesný neboť neoznačuje nález mikroalbuminu v moči, ale vylučování malého množství albuminu, neprokazatelného běžnými testovacími proužky nebo precipitačními testy. Vylučování albuminu močí je velmi variabilní, závisí na prokrvení ledvin, na svalové námaze, na změně polohy těla, na tělesné teplotě a na dalších faktorech. U většiny zdravých lidí se proto uvádí fyziologické rozmezí vylučování albuminu 2,5 – 26 mg/24 hod. Jako mikroalbuminurie se označuje hodnota mezi 30 – 300 mg albuminu za den.

Hodnoty pod dolní mezí mikroalbuminurie jsou fyziologické, označované jako normoalbuminurie, hodnoty nad horní mezí pak označujeme jako makroalbuminurii neboli proteinurii. Albumin představuje velmi vhodný marker ukazující na generalizovanou cévní hyperpermeabilitu. O skutečné mikroalbuminurii však mluvíme, jedná-li se o dlouhotrvající nález albuminu v moči. Průkaz mikroalbuminurie je považován za nejvhodnější ukazatel rizika vývoje diabetické nefropatie. Ledvinové onemocnění u diabetiků je velmi časté a výrazně zasahuje do života nemocných. Vyskytuje se u 20 až 40 % případů nemocných diabetem 2. typu. Výskyt je častější u pacientů s hypertenzí, s diabetickou retinopatií a neuropatií. Četnost výskytu mikroalbuminurie a větší riziko vzniku diabetické nefropatie stoupá s dřívějším nástupem onemocnění. Nález mikroalbuminurie souvisí s metabolickými markery u diabetiků, jako je například glykovaný hemoglobin a také s indexy průměrných denních glykemií [5, s. 236].

V prvním stadiu diabetické nefropatie se objevuje přechodná mikroalbuminurie (30-100 mg/den), zvýšená glomerulární filtrace a sonograficky prokazatelné zvětšení ledvin. Toto stádium je potenciálně reverzibilní. Ve druhém stádiu se vyskytuje trvalá mikroalbuminurie (30-300 mg/den), glomerulární filtrace klesá. Často se objevuje hypertenze. Třetí stádium je charakterizováno proteinurií větší než 0,5 g/den, která vede až k rozvoji nefrotického syndromu. I v tomto stádiu lze důslednou léčbou významně zmírnit progresi renální insuficience. Ve čtvrtém stádiu dochází k chronické renální insuficienci a selhání. U inzulin-dependentního diabetes mellitus je nutné vyšetření opakovat alespoň 3krát v odstupe několika dnů. Hlavní význam stanovení mikroalbuminurie u diabetiků spočívá ve vymezení skupiny pacientů s rizikem manifestní diabetické nefropatie [18, s. 99].

Dále zaznamenáváme zvýšenou exkreci albuminu u esenciální hypertenze, asi u 1/3 pacientů. Nález mikroalbuminurie u non-diabetických pacientů je považován za rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění. Přímý vliv proteinurie zřejmě hraje roli při vzniku a progresi fibrózy renálního intersticia. Rychlost progresu bývá zpravidla přímo úměrná velikosti proteinurie. Hypertenze u renálních onemocnění je často těžká, obtížně kontrolovatelná terapií [19, s. 87].

Mikroalbuminurie je také velmi důležitým a citlivým indikátorem preeklampsie u těhotných žen s hypertenzí. Preeklampsie je těhotenstvím podmíněná hypertenze spojená s proteinurií a případně s generalizovanými otoky. Její přesná etiologie není

známá. Uvádí se genetické a imunologické faktory vzniku této komplikace. Vyskytuje se přibližně u 2 – 5 % těhotných, častěji u mladých žen v prvním těhotenství. Zvýšené riziko bývá u vícečetných těhotenství, preexistující hypertenze, diabetes mellitus a výskyt preeklampsie v předchozím těhotenství [20, s. 173]. Preexistující hypertenze je diagnostikována již před těhotenstvím nebo do jeho 20. týdne. Gestační hypertenze je stav specifický pro těhotenství a je charakterizována špatným prokrvením řady orgánů. Pacientky s rizikem preeklampsie by měly být vyšetřeny v časně fázi těhotenství, což pomáhá zabránit progresi preeklampsie do život ohrožujících stavů [21, s. 65].

Mikroalbuminurie se může vyskytnout i jako nespecifická odpověď u akutních zánětlivých stavů např. u akutní ischémie, traumatu a poškození mozku, popálenin a dalších. V těchto případech obvykle mikroalbuminurie nastupuje do několika minut a trvá jen 24 až 72 hodin. Tento stav je pravděpodobně způsoben uvolněním mediátorů akutní fáze [5, s. 236].

Léčba mikroalbuminurie spočívá především v normalizaci vyvolávajícího onemocnění. Při obezitě usilujeme o redukci váhy, u diabetu o co nejlepší kompenzaci stavu. Nemocným s hypertenzí se podávají antihypertenziva, při nedostatečném efektu se přidá malá dávka diuretika. Léčba angiotensin-konvertujícím enzymem může snížit kardiovaskulární a renální příhody až o 44 %. Dochází k poklesu vylučování albuminu močí [26, s. 5; 32, s. 260].

## ***1.4 METODY STANOVENÍ CELKOVÉ BÍLKOVINY A ALBUMINU V MOČI***

### **1.4.1 Základní vyšetření moče**

Vyšetření moče patří k základním screeningovým vyšetřením u každého pacienta. Moč je koncentrovaný roztok, tvořený především vodou a dále velkým počtem rozpuštěných sloučenin. Jejich koncentrace je rozdílná u každého jednotlivce a tyto rozdíly znesnadňují močovou analýzu. Normální moč je čirá, lehce nažloutlá kapalina, jejíž barva je dána přítomností urochromů, což jsou hlavní žluté pigmenty moči. Barvu moči ovlivňuje i její koncentrace a přítomnost řady látek, například hnisu, erytrocytů, bilirubinu, ale i některých chemických látek, léků a podobně. Hustota moči kolísá mezi 1001 a 1035 kg/m<sup>3</sup>. Hustotu moči zvyšuje přítomnost bílkoviny, glukózy nebo radiokontrastních látek. Za normálních okolností se pH moči pohybuje v rozmezí

5,5 - 7. Pro stanovení diagnózy onemocnění ledvin používáme především tyto vyšetřovací metody:

- chemické vyšetření moči a mikroskopické vyšetření močového sedimentu
- vyšetření proteinurie
- vyšetření funkce ledvin
- imunologická vyšetření
- zobrazovací metody
- renální biopsie

Jedním ze základních vyšetření v nefrologii je stanovení močových bílkovin. Na tomto vyšetření závisí jednak včasná diagnostika onemocnění, sledování vývoje choroby, ale také odhad rizika vývoje selhání ledvin a kardiovaskulárního rizika. Dále pomocí vyšetření proteinurie lze sledovat odpověď organismu na léčbu. V současnosti je diagnostika založena na sledování celkové bílkoviny a albuminu v moči, méně pak na sledování dalších močových proteinů [4, s. 28]. Stanovení celkové bílkoviny vyloučené močí za 24 hodin provází z analytického hlediska mnoho problémů, souvisejících jednak s metodami stanovení, ale i s preanalytickými faktory. Například správný sběr moče nebo její uchování [5, s. 205]. Při detekci i monitorování proteinurie je doporučeno vyšetření ze vzorku nesbírané moči, pokud možno z prvního ranního. Pokud není k dispozici první ranní vzorek, lze použít i jakýkoliv jiný vzorek nesbírané moči.

Kvantitativní proteinurie je v tomto případě vyjadřována jako poměr protein/kreatinin v moči (PCR – protein creatinine ratio). K automatizaci se používají metody stanovující nefelometricky nebo turbidimetricky protein precipitovaný kyselinou trichloroctovou nebo benzethoniumchloridem nebo alternativně spektrofotometrické metody založené na barevných reakcích, zejména pak stanovení s pyrogallolovou červení. Protože nejčastějšími příčinami chronického onemocnění ledvin u dospělých je diabetes mellitus, hypertenze a chronické glomerulonefritidy, které jsou spojeny někdy jen s mírně zvýšenou exkrecí albuminu, je vhodnější stanovit místo celkové bílkoviny koncentraci albuminu a výsledek vyjadřovat jako poměr albumin/kreatinin v moči (ACR – albumin creatinine ratio) [9, s. 28].

Mikroalbuminurie se stále málo vyšetřuje, byť její pozitivita je důležitým ukazatelem nefropatie. Vyšetření je nutno opakovat v intervalu 3 – 6 měsíců a jako pozitivní nález se hodnotí pozitivita dvou ze tří vzorků vyšetřených v uvedeném

intervalu. Kvalitu vyšetření ovlivňuje i odběr vzorku. Zahraniční autoři doporučují sběr moče za 24 hodin, u nás však doporučen není. Sběr moče je sice vhodnější z hlediska vyšší stability vzorku, ale je zatížen chybou sběru a jeho nesprávným provedením. Ovšem i ranní vzorek je zatížen značnou variabilitou, proto je nutné důsledně dodržovat pravidlo opakovaného vyšetření [25, s. 335].

Běžně se albumin v moči stanovuje především imunochemickými metodami (imunoturbidimetrie/immunonefelometrie), elektroforetickými metodami, zřídka metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie – HPLC (high-performance liquid chromatography). Určitý podíl albuminu při průchodu renálními proximálními tubuly je proteolyticky štěpen na několik fragmentů, které nevykazují vždy stejnou reaktivitu. Částečná ztráta imunoreaktivity albuminu by mohla být příčinou falešně podhodnocené koncentrace albuminu v moči stanovené imunochemickými metodami. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie pravděpodobně detekuje i albumin, který imunochemickým metodám unikl [10, s. 24].

#### **1.4.2 Chemické vyšetření diagnostickými proužky**

Pro orientační vyšetření moče se většinou používají diagnostické proužky. Tato metoda je metodou kvalitativní. Test je jednoduchý, levný, s poměrně vysokou citlivostí a dostatečnou diagnostickou specifitou [23, s. 105]. Výsledky vyšetření jsou v tomto případě závislé jednak na výrobci testovacích proužků, na koncentraci proteinu, ale i na stupni zahuštění moči. Vyšetření moči testovacím proužkem se proto nehodí k monitorování vývoje proteinurie [9, s. 28]. Princip metody spočívá na takzvané bílkovinné chybě acidobazického indikátoru, např. tetrabromfenolové modří nebo etylesteru tetrabromfenolftaleinu. Tyto látky při určitém pH mění svou barvu, při pH nižším než 3,5 jsou žluté, při vyšším pH jsou zelené až modré [7, s. 228]. Metoda je založena na nespecifické reakci bílkovin s barevným indikátorem. Nejlépe reaguje albumin, ostatní bílkoviny již méně [15, s. 37]. Políčko je impregnováno tetrabromfenolovou modří pufrovanou na pH 3,0. Reakce probíhá při pH < 3,5 a okyselení moče je zajištěno pufrem z impregnace políčka. S narůstající koncentrací bílkoviny, zejména albuminu, se mění barva ze žluté až na modrou. Rozmezí 0 až 4+ zhruba odpovídá rozmezí 0-5 g/l bílkoviny. Je-li moč alkalická (pH 8,0), musí se okyselit zředěnou kyselinou octovou na pH 5 – 6 a analýzu je třeba zopakovat s novým proužkem. Při použití této metody může vzniknout falešně pozitivní nález v důsledku velmi

alkalické moči nebo vlivem interference s metabolity penicilinu, kyseliny acetylsalicylové a perorálních antidiabetik. Falešně pozitivní výsledky se mohou též objevit v důsledku kontaminace moče vaginálním nebo uretrálním sekretem, dále v případě kontaminace odběrové nádoby saponáty nebo dezinfekčními činidly. Vyšetřením proteinurie papírkovou metodou nezachytíme malé množství albuminu ani vyšší koncentrace jiných bílkovin. Při podezření na mikroalbuminurii se provede imunochemické vyšetření [11, s. 56]. Testovací proužky jsou tvořeny papírovým nosičem nebo nosičem z umělé hmoty, na kterém jsou upevněny indikační zóny. Indikační zóny jsou vyráběny ze vhodného materiálu, např. ze speciálního filtračního papíru a jsou napuštěny kapalným analytickým činidlem. Testovací proužky se dodávají buď monofunkční, polyfunkční nebo jako proužky pro speciální vyšetření. Monofunkční proužky obsahují indikační zónu pro základní vyšetření určité látky. Polyfunkční umožňují vyšetření několika parametrů najednou, díky většímu množství indikačních zón. Proužky pro speciální vyšetření jsou vyrobeny s indikačními zónami zvolenými pro vyšetření konkrétního onemocnění, např. proužky pro screening diabetes mellitus obsahují zónu pro stanovení glukózy, ketolátek, bílkoviny a pH. Vyšetření moče testovacími proužky se provádí ze vzorku moče, do kterého ponoříme testovací proužek na 1 – 2 s. Poté proužek vyjmeme, přebytek moči odstraníme otřením hrany proužku o okraj nádoby s močí a uložíme do vodorovné polohy. Tím zabráníme kontaminaci jednotlivých indikačních zón.

Po uplynutí reakční doby, která činí cca 60 s vyhodnotíme podle barevné stupnice na obalu nádoby s testovacími proužky. Výsledek testu lze hodnotit i přístrojem – reflexním fotometrem. Tubu s testovacími proužky uchováваме uzavřenou, abychom chránili proužky před vlhkostí. Indikačních zón se nedotýkáme rukou [12, s. 162; 207].

### **1.4.3 Srážecí reakce**

Semikvantitativní průkaz albuminu v moči založený na bílkovinné chybě acidobazického indikátoru není dostatečně spolehlivý, proto se pozitivní reakce ještě potvrzuje důkazem močové bílkoviny ve zkumavce. Nejoblíbenější konfirmační důkaz je srážecí reakce bílkovin pomocí několika kapek 20 % kyseliny sulfosalicylové. Princip spočívá v denuraci bílkoviny kyselinou, která se projeví vznikem opalescence až zákalu. Citlivost reakce je vysoká, prokáže 0,1 – 0,2 g/l celkové proteinurie. Výsledný zákal

hodnotíme podle semikvantitativní stupnice. Na podobném principu je založena i zkouška s kyselinou dusičnou, případně zkouška varem. Vlivem vysoké teploty se přítomné bílkoviny v moči sráží. Uvedené metody se v současnosti však prakticky neprovádí [7, s. 45].

#### 1.4.4 Biuretová metoda

Za nejspecifičtější metodu ke stanovení celkové bílkoviny v moči se pokládá biuretová metoda, která měří všechny proteiny a glykoproteiny se srovnatelnou senzitivitou. Nevýhodou této metody je nízká citlivost pro koncentrace bílkovin v moči běžně nacházené [9, s. 22]. Principem této reakce je vytváření komplexních sloučenin  $\text{Cu}^{2+}$  s ionty peptidových vazeb. Součástí biuretového činidla je síran měďnatý, který poskytuje  $\text{Cu}^{2+}$  k tvorbě komplexů s peptidovými vazbami, hydroxid (alkalizující složka), dále vinan sodno – draselný, zabraňující srážení  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  a jodid draselný, který zabraňuje autoredukci  $\text{Cu}^{2+}$ . Reakcí vzniká modrofialový komplex, přičemž intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci bílkoviny ve vzorku. Měří se fotometricky, absorpční maximum je při vlnové délce 545 – 552 nm. Metoda je doporučena jako metoda referenční pro stanovení celkové bílkoviny v séru. [12, s.179; 13, s. 159].

#### 1.4.5 Imunochemické metody

Turbidimetrie a nefelometrie jsou optické metody, které se v klinické biochemii používají zejména ke stanovení specifických proteinů. Metoda je založena na měření stupně zákalu – turbidity [12, s. 167]. Při dopadu záření určité vlnové délky na heterogenní částice v koloidních roztocích, suspenzích a na jemných vrstvách pevných částic dochází k odrazu, lomu a částečné absorpci tohoto záření. Vzniká sekundární záření vycházející z roztoku všemi směry. Světelný tok rozptýleného záření závisí na úhlu, který svírá dopadající (primární) paprsek se směrem k detektoru rozptýleného světla, což je takzvaný Tyndallův jev [22, s. 76]. Tyto metody stanovují jednotlivé bílkoviny kvantitativně. Jsou založeny na reakci mezi antigenem (Ag) a protilátkou (Ab), kdy bílkoviny vystupují jako antigeny. Touto reakcí vzniká imunokomplex = precipitát. Množství precipitátu je závislé na kvantitativním poměru antigenu a protilátky. Vzniklý komplex je nutno udržet dostatečně stálý, proto se přidává ochranný

koloid, nejčastěji polyethylenglykol (PEG). Intenzita zákalu je přímo úměrná koncentraci antigenu ve vzorku. Absorpční maximum se měří při vlnové délce 340 nm. Kvantitativní metodou pro stanovení jednotlivých specifických proteinů je imunoturbidimetrie, případně imunonefelometrie. Imunoturbidimetrie se využívá především pro stanovení albuminu v moči – mikroalbuminurie. Za použití specifického antiséra vzniká precipitát. Intenzita zákalu je přímo úměrná koncentraci albuminu ve vzorku [14, s. 62]. Principem turbidimetrie je měření procházejícího světla zeslabeného rozptylem na částicích precipitátu. Zdrojem světla turbidimetrické metody je dioda. Reakce probíhá v měřicí kyvetě. Absorpce záření po průchodu nehomogenním prostředím se měří absorpčními fotometry nebo spektrofotometry. Fotometrická citlivost je nepřímo úměrná vlnové délce, proto se měřené látky stanovují při nejkratší vlnové délce. Střední UV oblast nelze použít neboť se začne projevovat absorpce nezreagovaných bílkovin, čímž dochází ke zkreslení měření zákalu imunokomplexu. Je-li zdrojem světla halogenová žárovka, je nutno použít fotonásobič. Ten ovšem způsobuje zvýšení šumu. Největší citlivosti se dosahuje při použití modrého světla v oblasti 435 – 480 nm. V tomto rozsahu má modré světlo dostatečnou svítivost a kompenzuje tím sníženou fotometrickou citlivost vzhledem k 340 nm. Výsledky měření absorbance může měnit jakýkoliv vliv způsobující vznik částic odlišné velikosti, stejně jako změna vlnové délky záření. Je třeba také snížit na minimum vliv interferujících látek [17, s. 146].

#### **1.4.6 Elektroforéza bílkovin**

Elektroforéza patří mezi separační metody využívající k separaci látek pohyb nabitých částic v elektrickém poli. Tato pohyblivost závisí především na velikosti elektrického náboje, na velikosti molekuly, na pH prostředí, na vlastnostech nosiče, iontové síle pufru a tvaru dělených částic. Látky nesoucí náboj jsou rozpuštěny v elektrolytu a umístěny mezi dvě elektrody. Důsledkem toho se začnou pohybovat konstantní rychlostí, anionty k anodě, kationty ke katodě. Bílkoviny nesou různý elektrický náboj podle pH prostředí, ve kterém se nacházejí. V kyselém prostředí se chovají jako zásady. Jejich náboj je kladný, proto v elektrickém poli putují ke katodě. V alkalickém prostředí naopak. Použitím gelu se při separaci látek uplatňuje i princip molekulárního síta, kdy podle velikosti molekul dochází k jejich různě rychlé prostupnosti gelovým materiálem. Nejpoužívanějším nosičem v současné době je

agarový a agarózový gel, membránové fólie a polyakrylamidový gel. Vodivost prostředí zajišťují pufrы, což jsou roztoky elektrolytů o předepsané koncentraci solí, pH, iontové síle a vodivosti. Zprostředkují přenos elektrického proudu a udržují konstantní pH [14, s. 210; 22, s. 155]. Nejčastěji používanou metodou je elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí laurylsíranu sodného (SDS-PAGE). Provádí se v trubičkách nebo na gelových plotnách v pufru obsahujícím přídavek SDS (sodium dodecyl sulphate). Po přidání této látky, která se váže na peptidové vazby a zásadité skupiny bílkovin, mají pak všechny molekuly téměř shodný náboj a dělí se jen podle velikosti molekul. Metoda se používá pro dělení směsí bílkovin, k podrobnějšímu dělení jejich frakcí, především v biologických tekutinách s nízkým obsahem bílkovin – například moč, likvor apod. Její předností je vysoká dělicí schopnost a ostrost dělených zón [22, s. 155]. Trvání analýzy se pohybuje okolo 15 – 30 minut. Po ukončení dělení se jednotlivé složky fixují a barví. Pro vizualizaci bílkovin se nejčastěji využívá adsorpce amidočerni, methylenové modři, Coomassie blue na povrch bílkoviny. Citlivější metoda vizualizace bílkovin je založená na vyredukování stříbra z amoniakálního roztoku. Probíhá v těch místech, kde jsou fixovány bílkoviny. Vyhodnocení elektroforeogramů se provádí denzitometricky. Světlo zvolené vlnové délky prochází štěrbinou na elektroforeogram. V místě frakcí dochází k částečné absorpci záření. Následuje dopad záření na čidlo a jeho převod na analogový záznam [12, s. 168; 14, s. 210]. Vizuální hodnocení je kvalitativní a dovoluje odhad typu a stupně selektivity proteinurií, denzitometrické vyhodnocení přináší i možnost kvantifikace přítomných bílkovinných frakcí [15, s. 38]. Elektroforéza umožňuje rozdělení bílkovin na albumin a globuliny – alfa-1, alfa-2, beta-1, beta-2 a gama frakce. Dlouholetými výzkumy byly charakteristické změny podílu elektroforetických frakcí přiřazeny určitým chorobným stavům [8, s. 66].

#### **1.4.7 Chromatografické metody**

Chromatografické metody umožňují dělení velmi složitých směsí a identifikaci a kvantifikaci jednotlivých látek v nich obsažených. Tyto metody mají široké uplatnění v biomedicině, například při izolaci bílkovin, enzymů, nukleových kyselin apod. Dále ve farmacii a toxikologii, především k terapeutickému monitorování hladiny léčiv, průkazu a stanovení léčiv a toxikologických látek v biologickém materiálu. V klinické biochemii se jimi dělí lipidy, aminokyseliny, sacharidy, katecholaminy, porfyriny,

prostaglandiny, vitamíny a další látky. V současnosti se používá chromatografie na tenkých vrstvách, vysokoúčinná kapalinová chromatografie a chromatografie plynová [22, s. 120]. V rámci lékařských věd je celá řada problémů, které jsou řešeny za pomoci některé z mnoha typů chromatografických technik. Z toho důvodu je třeba mít alespoň základní povědomí o chromatografii. Již v roce 1906 provedl ruský botanik, fyziolog a biochemik M. S. Cvet experiment, při kterém rozdělil chlorofyl na jeho složky - chlorofyl a, chlorofyl b a karotenoidy [27, s. 1].

Chromatografie je tedy separační a současně analytická fyzikálně chemická metoda pro separaci a analýzu směsí látek pracujících na principu rozdělení jednotlivých složek směsi mezi vzájemně nemísitelné fáze, fází mobilní a fází stacionární. Pohyblivou fází je buď kapalina nebo plyn. Stacionární, tj. nepohyblivou fází, tvoří materiál, kterým je plněna kolona nebo ze kterého je zhotovena tenká vrstva, na které dělení probíhá. Dělené látky jsou vymývány mobilní fází a různou rychlostí unášeny ve směru jejího toku. Zároveň jsou různou silou zadržovány ve stacionární fází a tím dochází k jejich dělení. Identifikace a dělení jednotlivých látek závisí na jejich rozdílné pohyblivosti a také na jejich různém chování při detekci. Chromatografické metody dělíme podle fyzikálního principu, podle způsobu provedení či podle druhu mobilní fáze.

Podle fyzikálního principu:

- rozdělovací chromatografie
- adsorpční chromatografie
- iontoměničová chromatografie
- gelová chromatografie
- afinitní chromatografie

Podle uspořádání stacionární fáze:

- chromatografie na papíře
- chromatografie sloupcová
- chromatografie na tenkých vrstvách

Podle druhu mobilní fáze:

- plynová chromatografie
- kapalinová chromatografie

Jednotlivé techniky chromatografie se mohou různě kombinovat [22, s. 89].

## ***1.5 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE***

### **1.5.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography) představuje významnou metodu kapalinové chromatografie. Mobilní fází je kapalina. Stacionární fáze je tvořena silikagelem s navázaným filmem příslušné látky. Přístroj pro HPLC analýzu se nazývá kapalinový chromatograf a skládá se ze zásobníku mobilní fáze, odplynovače, vysokotlakého čerpadla, dávkovače, kolony a detektoru [27, s. 1].

Dělení látek u HPLC probíhá v chromatografických kolonách s úzkým průměrem (průměr 2 – 8 mm). Kolona se vyrábí zpravidla nerezová, naplněná stacionární fází. Účinnost kolony vyjadřuje, jak se rozšiřují zóny separovaných látek na koloně. Mírou účinnosti kolony je počet teoretických pater, což je ustanovení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází a výškovým ekvivalentem teoretického patra, tj. délkou příslušné kolony. Výběr kolon má u HPLC rozhodující význam [22, s. 115; 16, s. 81].

Průtok mobilní fáze kolonou probíhá pod tlakem čerpadla. Moderní přístroje obvykle využívají dvě pulzní pístová čerpadla, která se pohybují tak, aby došlo k maximálnímu potlačení pulzace toku mobilní fáze. Mobilní fází je například voda, metanol, acetonitril a jejich směsi v různých vzájemných poměrech, pufrů a další. Mobilní fáze může být vedena do vysokotlakého čerpadla buď z jednoho zásobníku, kdy se tento režim nazývá izokratický nebo se mění eluční síla mobilní fáze postupným zastoupením dvou nebo více rozpouštědel. Stacionární fáze je v tomto případě nepolární. Toto uspořádání se nazývá reverzní [12, s. 170].

Vhodné detektory u HPLC závisí na povaze separovaných látek. Detektor automaticky a kontinuálně měří některou z fyzikálních vlastností eluátu. U moderních zařízení pro HPLC je software, automaticky hodnotící kvalitativně i kvantitativně signál z detektoru.

Nejběžněji používané detektory:

Absorpční fotometrický detektor, fluorimetrický, elektrochemický, refraktometrický, vodivostní, detektor diodového pole a hmotnostní detektor [16, s. 83; 22, s. 115].

### 1.5.2 Způsoby stanovení albuminu pomocí HPLC

Shaikh et al. ve své práci srovnávali stanovení koncentrace albuminu v moči pomocí imunoturbidimetrie, LC-MS chromatografie (liquid chromatography–mass spectrometry) a vysokoúčinné kapalinové chromatografie. K výzkumu bylo použito 150 vzorků moče od pacientů s různými koncentracemi albuminu. Vzorky byly následně změřeny rutinním imunoturbidimetrickým testem (Roche Hitachi 912), LC-MS a pomocí size-exclusion HPLC, kdy byl použit k přípravě vzorku a kalibraci kit Accumin<sup>TM</sup>, Aus Am biotechnologies. Takto připravené vzorky poté analyzovali pomocí HPLC, kde stanovili veškerý albumin, tedy i albumin intaktní. Při stanovení metodou HPLC byly vzorky centrifugovány při 2 500 g po dobu 5 minut. Z každého vzorku se 50  $\mu$ l supernatantu převedlo do vialky přístroje a z té bylo nastříknuto 25  $\mu$ l do kolony. Kalibrace byla provedena na kalibrátory HSA. Absorbance byla měřena při 214 nm a výsledky analyzovány pomocí Beckman System Gold software. Podle výsledků analýzy bylo zjištěno, že HPLC poskytla vyšší hodnoty než imunochemická analýza, ale i než LC-MS [28, s. 1504].

Sviridov et al. použili ke stanovení albuminu v moči vzorky od zdravých jedinců a 24-hodinové vzorky z laboratoře. Kalibrátory byly získány ze Sigma Chemical. Nejprve použili size-exclusion chromatografii s kolonou Zorbax Bio Series GF-250 a fosfátovým pufrům při průtoku 1 ml/min, nástřik vzorku 25  $\mu$ l. Analýza byla provedena s přístrojem vybaveným autosamplrem – model 717, čerpadlem – model 626 a detektorem s diodovým polem – model 996. Poté byla použita HPLC, kde byly nastříkovány frakce bílkovin, získané ze size-exclusion chromatografie. HPLC používá kolonu 150 mm Delta Pak C18, mobilní fázi A - trifluoroctovou kyselinu ve vodě a mobilní fázi B - trifluoroctovou kyselinu v acetonitrilu. Průtok kolonou byl 0,8 ml/min, nástřik vzorku 100  $\mu$ l.

Po vyhodnocení výsledků autoři dospěli k závěru, že výsledná hodnota albuminu v moči stanovená pomocí HPLC ve skutečnosti představuje kromě albuminu i globuliny velikostí albuminu podobné, které se jim nepodařilo pomocí size-exclusion chromatografie oddělit [29, s. 389].

Comper Wayne et al. srovnávali rozdíly ve stanovení vylučování albuminu v moči pomocí konvenční radioimunoanalýzy, imunonefelometrie, imunoturbidimetrie a HPLC. Stanovení pomocí HPLC bylo provedeno na analyzátoru Hewlett Packard 1100 HPLC system. Nástřik vzorků moče byl 25  $\mu$ l na preparativní kolonu Zorbax Bio series preparative GF-250 (9,4  $\times$  25 mm). Mobilní fází byl fosfátový pufr o průtoku 1 ml/min.

Ze srovnání použitých metod vyplynulo, že imunochemické metody jsou schopny odhalit jen intaktní imunoreaktivní albumin a fragmenty albuminu >12 kDa a polymerních agregátů albuminu, kdežto pomocí HPLC lze detekovat i nereaktivní fragmenty albuminu. Ani jednou z uvedených metod ale nelze detekovat fragmenty albuminu o velikosti <10 kDa [34, s. 105].

Turpeinen et al. ve své práci hodnotili stanovení beta-2-mikroglobulinu, alfa-1-kyselého glykoproteinu a albuminu v moči pomocí HPLC a výsledky porovnávali s výsledky získanými kvantitativními imunochemickými testy. Pro stanovení proteinů byla použita sestava HPLC skládající se ze dvou vysokotlakých čerpadel 2152, autosampleru Wisp 710B a UV detektoru Shimadzu SPD-6A. Byly testovány dvě kolony o velikosti 15 $\times$ 3,2 mm s náplní C<sub>4</sub> a C<sub>18</sub>. Vzorky moče byly filtrovány přes 0,45  $\mu$ m filtr a bylo nastřikováno 10-50  $\mu$ l vzorku. Mobilní fáze A se skládala z 0,1% kyseliny trifluoroctové rozpuštěné ve vodě a mobilní fáze B z 0,1% kyseliny trifluoroctové rozpuštěné v acetonitrilu. Byl použit gradient mobilních fází, kdy byl obsah acetonitrilu zvyšován kontinuálně z 23 % na 60 %. Měření probíhalo při průtoku 2 ml/min a při pokojové teplotě. Detekční vlnová délka byla 218 nm. Cílem této studie bylo vytvořit rychlou, praktickou metodu pro stanovení beta-2 mikroglobulinu, alfa-1-kyselého glykoproteinu a albuminu v moči. Pro odstranění možných rušivých faktorů byly použity krátké kolony a vysoké koncentrace acetonitrilu. Porovnáním výsledků s imunochemickými testy došli autoři k závěru, že je metoda stanovení sledovaných proteinů vhodná pro jejich kvantifikaci v moči [35, s. 1756].

Kushnir et al. použili pro stanovení proteinů v moči kolonu MARS (Agilent Technologies), která je založena na imunochemickém principu a zachytává albumin, transferin, haptoglobin, IgG, IgA a alfa-1-antitrypsin. Účinnost zachycení těchto proteinů byla potvrzena pomocí SDS-PAGE. Poté byly vzorky analyzovány na Agilent

6510 Q-TOF (Agilent Technologies) a na Agilent 1200 nano-HPLC. Eluční gradient acetonitrilu byl 5-40 % po dobu 30 minut. Výsledky porovnali s výsledky LC-MS. Tito autoři podle výsledků analýzy konstatovali, že lze detekovat i nižší koncentrace bílkovin, než je možné klasickou imunochemií [36, s. 1504].

## 2. CÍLE

1. Vyvinout vhodnou HPLC metodu pro stanovení albuminu v moči, separovat od albuminu ostatní proteiny obsažené v moči, kvantitativně detekovat celkový albumin v moči včetně jeho nereaktivních fragmentů.

2. Úspěšně validovat danou metodu, což znamená zajistit splnění požadavků na opakovatelnost, reprodukovatelnost, správnost, robustnost a zjištění meze detekce albuminu v moči.

3. Porovnat výsledky získané pomocí HPLC s výsledky získanými imunochemickým stanovením albuminu v moči a zjistit, zda se u dané metody významně liší.

## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 MATERIÁL A METODY

#### 3.1.1 Přístroje

COBAS INTEGRA<sup>®</sup> 400 (Roche Diagnostics GmbH, Germany)

HPLC sestava Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA)

- degasser
- kvarterní čerpadlo
- autosampler
- termostat kolony
- detektor DAD
- kolona Zorbax, 300SB-C3, 4,6 cm × 50 mm × 3,5 μm
- software Chem32 (Agilent Technologies)

analytické váhy AB 135-5 (Metler - Toledo)

centrifuga (Abbott)



*Obr. 1: Sestava Agilent 1200 (Agilent Technologies)*

### 3.1.2 Ostatní materiál

- automatické pipety (Biohit)
- Hamiltonova pipeta
- mikrozkuhavky
- vialky
- inserty

### 3.1.3 Reagencie

souprava reagentů pro Cobas Integra ALB-T (Roche)

reagencie R1

- TRIS pufr (50 mmol/l, pH 8,0)
- PEG (4,2%)
- EDTA (2 mmol/l)

reagencie R2

- ovčí polyklonální protilátka proti lidskému albuminu
- TRIS pufr (100 mmol/l, pH 7,2)

reagencie R3

- albumin v ředěném lidském séru
- fosfátový pufr (50 mmol/l, pH 7,0)

reagencie pro HPLC

- destilovaná voda – water for chromatography (Merck)
- acetonitril (Sigma-Aldrich)
- dihydrogenfosforečnan sodný (Lachema Brno)
- kyselina trifluoroctová (Penta)
- microalbumin-control 2 (Biorad)
- albumin from human serum approx. 99 %, lyophilized (Sigma – Aldrich)
- alfa-1-acid glycoprotein from human plasma (Sigma-Aldrich)
- transferrin human, min. 98 % (Sigma-Aldrich)
- prealbumin from human plasma, 1 mg (Sigma- Aldrich)
- alfa-1-antichymotrypsin from human plasma, 1 mg (Sigma-Aldrich)
- hemopexin from human plasma, 500 µg (Sigma-Aldrich)

### **3.1.4 Příprava reagensů**

#### **3.1.4.1 Příprava mobilní fáze**

Mobilní fáze se skládala ze čtyř různých roztoků, jelikož se jednalo o gradientovou eluci. Mobilní fáze A je chromatografická voda, mobilní fáze B acetonitril. Mobilní fáze C je 0,1 M dihydrogenfosforečnan sodný, který byl připraven rozpuštěním 15,6 g dihydrogenfosforečnanu sodného v 1 l HPLC vody. Mobilní fáze D je 1% kyselina trifluoroctová (TFA) a byla připravena z 10 ml TFA smíchané s 990 ml HPLC vody. Každý roztok byl po přípravě převeden do litrových skleněných lahví.

#### **3.1.4.2 Příprava zásobních roztoků**

Zásobní roztoky byly připraveny z lyofilizovaných vzorků proteinů – albuminu, alfa-1-kyselého glykoproteinu, transferinu, prealbuminu, alfa-1-antichymotrypsinu, hemopexinu a albuminu. Na analytických váhách se navážilo 0,01015 g lyofilizovaného transferinu a analyticky se převedlo do 5 ml baňky s HPLC vodou. Výsledná koncentrace transferinu byla 2015 mg/l. Tento zásobní roztok byl alikvotován do mikrozkuvek a uložen v lednici. Obsah 1 mg lahvičky prealbuminu byl rozmíchán v 0,5 ml HPLC vody, výsledná koncentrace roztoku byla 2000 mg/l. Stejným způsobem byl připraven i zásobní roztok alfa-1-antichymotrypsinu, jeho výsledná koncentrace byla také 2000 mg/l. Zásobní roztok hemopexinu byl připraven rozpuštěním obsahu 0,5 mg lahvičky v 0,5 ml HPLC vody, čímž vznikl roztok o koncentraci 1000 mg/l. Zásobní roztok alfa-1-kyselého glykoproteinu byl připraven o koncentraci 2000 mg/l rozpuštěním 2 mg v 1 ml HPLC vody. Všechny zásobní roztoky byly uloženy v mikrozkuvkách v lednici. Na analytických vahách se navážilo 0,02063 g lyofilizovaného albuminu a analyticky se převedlo do 10 ml odměrné baňky s HPLC vodou. Výsledná koncentrace albuminu byla 2063 mg/l. Tento roztok byl rozpipetován do mikrozkuvek a část uložena do lednice a část do mrazáku a uchovávána při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dále se využíval při kalibraci a při přípravě kontrolního materiálu.

### 3.1.4.3 Příprava kalibračních roztoků

Ze zásobního roztoku albuminu bylo připraveno 8 standardních roztoků v tripletu o koncentracích: 10; 30; 50; 100; 300; 600; 800 a 1000 mg/l. Každý standardní roztok byl připraven do celkového objemu 500 µl podle tabulky 1.

<b>výsledná koncentrace (mg/l)</b>	<b>zásobní roztok albuminu (µl)</b>	<b>chromatografická voda (µl)</b>	<b>10 × naředěný zás. roztok albuminu (µl)</b>
10	-	475	25
30	-	425	75
50	-	375	125
100	25	475	-
300	75	425	-
600	150	350	-
800	200	300	-
1000	250	250	-

Tab. 1: Příprava kalibračních roztoků

### 3.1.4.4 Příprava kontrolního materiálu

Jako kontrola byla použita firemní kontrola microalbumin-control 2 od firmy Biorad s rozsahem koncentrace 58,2-81,5 mg/l. Protože firma Biorad nevyrábí kontrolu močového albuminu s vyšší koncentrací, byla připravena druhá kontrola ze zásobního roztoku albuminu. Kontrola o koncentraci 350 mg/l byla připravena do celkového objemu 10 ml dle tabulky 2. Celý objem připravené kontroly byl rozpipetován do mikrozkušavek a část uložena do lednice, kde byla uchovávána při teplotě 2-8 °C a část uložena do mrazáku na cca -20 °C.

<b>výsledná koncentrace (mg/l)</b>	<b>zásobní roztok albuminu (ml)</b>	<b>chromatografická voda (ml)</b>
350	1,75	8,25

Tab. 2: Příprava kontroly

### 3.1.5 Příprava vzorků pro analýzu

Jako standardy byly použity roztoky albuminu, alfa-1-kyselého glykoproteinu, alfa-1-antitrypsinu, transferinu, prealbuminu, hemopexinu a vzorky moče pacientů. Vzorky proteinů byly odpipetovány z předem připravených zásobních roztoků uložených v lednici. Vzorky pacientů byly do laboratoře doručeny v plastových zkumavkách a změřeny na chemickém analyzátoru COBAS INTEGRA® 400 plus (Roche). Z plastových zkumavek pak byl každý vzorek odpipetován do mikrozkušavky a zcentrifugován při 4000 otáčkách po dobu 10 min. Poté byl supernatant přepipetován do vialek odkud byl nastříkovan na kolonu.

### 3.1.6 Chromatografická analýza vzorků

Chromatografická analýza vzorků probíhala při průtoku mobilní fáze 2 ml/min, tlaku cca 130 barů a teplotě 22 °C. Nástřik vzorků na kolonu byl 10 µl, detekce vzorků byla prováděna při vlnové délce 280 nm. Gradientová eluce při analýze byla nastavena podle tabulky č. 3. Doba trvání analýzy jednoho vzorku trvá 8 minut. Po vyhodnocení výsledků jsme se rozhodli, že pro zvýšení odezvy bude upraven nástřik vzorků na kolonu na 15 µl. Dále analýza probíhala za stávajících podmínek.

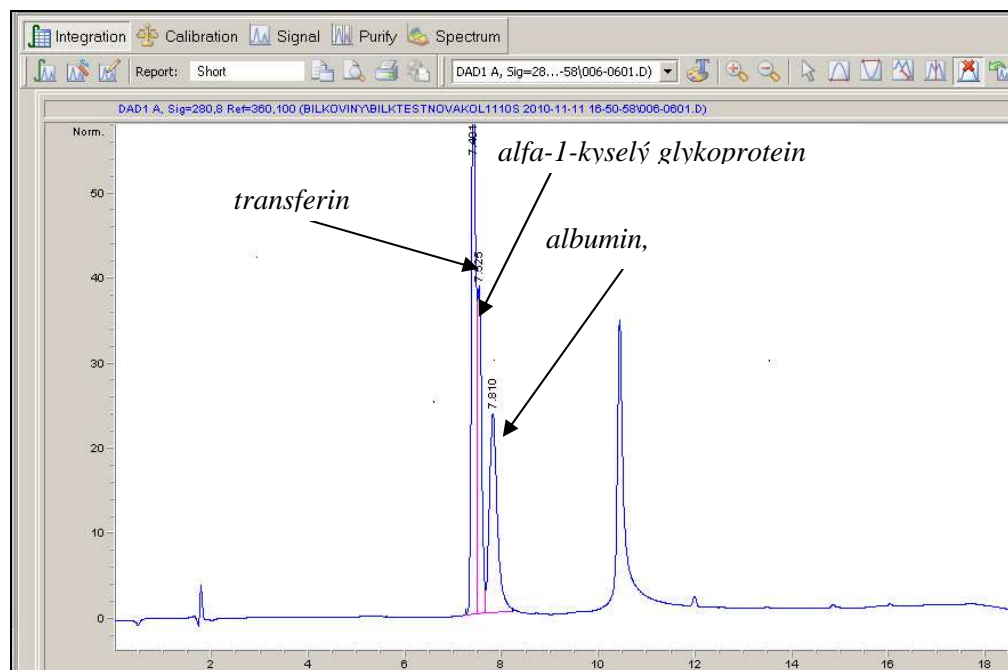
čas (min)	průtok (ml/min)	%A	%B	%C	%D
0	2	44,0	36,0	0	20
2	2	41,6	38,4	0	20
4	2	51,0	39,0	10	0
6	2	35,0	60,0	0	5
8	2	44,0	36,0	0	20

Tab. 3: Gradientová eluce

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 VÝVOJ METODY

Zpočátku byla použita vyvinutá metoda autorů Fořtová et al. [10, s. 25]. Mobilní fáze se skládala pouze ze dvou roztoků. Mobilní fáze A-0,1% kyselina trifluoroctová ve vodě a mobilní fáze B-0,1% kyselina trifluoroctová v 90% acetonitrilu. Při analýze byl použit gradient mobilní fáze, kdy v čase 0 minut byl obsah složky B 15 % a do 15. minuty plynule vzrůstal na 100 %. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min, teplota 35 °C, detekce probíhala při 280 nm a byla použita kolona ZORBAX 300 SB C18. S postupem času bylo zjištěno, že nedochází k dostatečné separaci albuminu, alfa-1-kyselého glykoproteinu a transferinu (obr. 2).

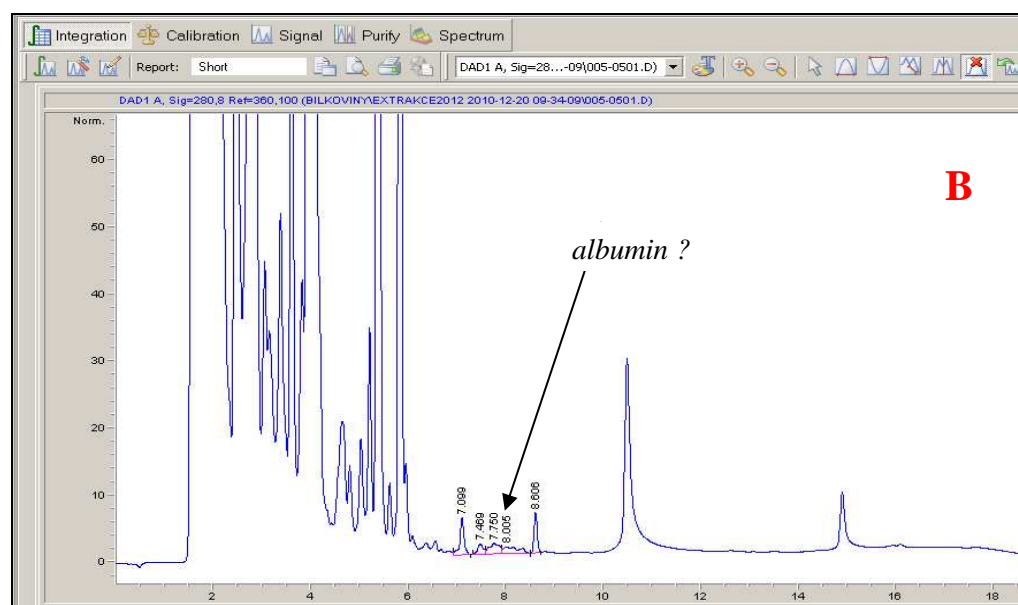
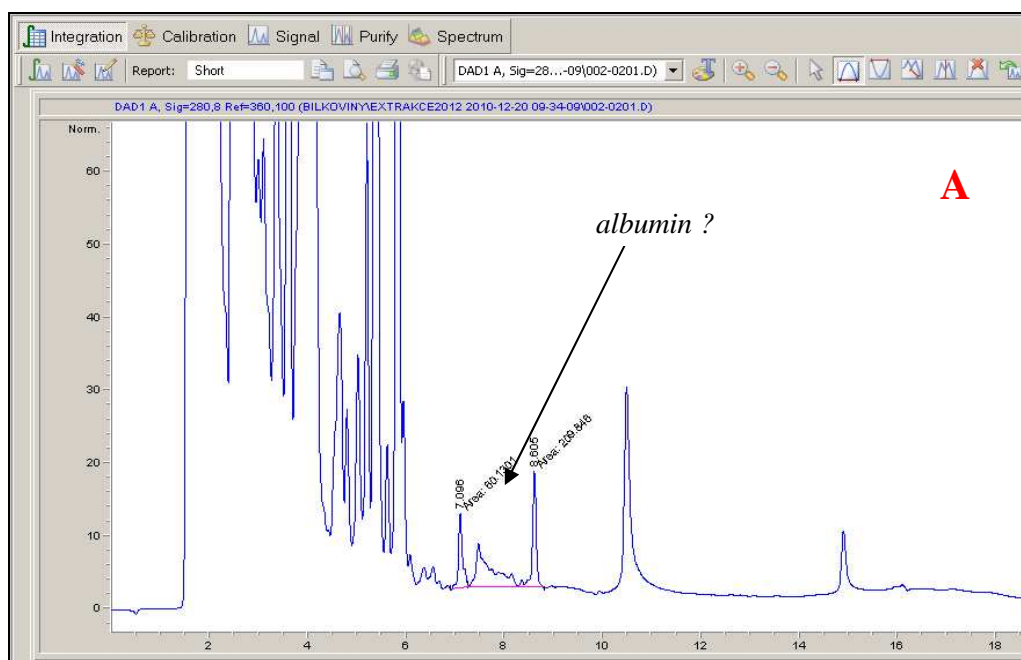


Obr. 2: Směs bílkovin

Při analýzách některých patientských vzorků nebylo možné tyto bílkoviny od sebe separovat vůbec, což potvrzuje zjištění autorů Shaikh et al. [28, s. 1504] a Sviridov et al. [29, s. 38]. A to, že společně s albuminem dochází ke koeluci bílkovin podobné molekulové hmotnosti, především transferinu, alfa-1-kyselého glykoproteinu, hemopexinu a alfa-1-antichymotrypsinu.

Poté jsme se pokoušeli o předúpravu vzorků pomocí extrakce na pevné fázi s použitím kolonek GRACE PURE™ C18-AQ (Grace). Předpokládali jsme, že se podaří odstranit alespoň některé píky, které rušily analýzu.

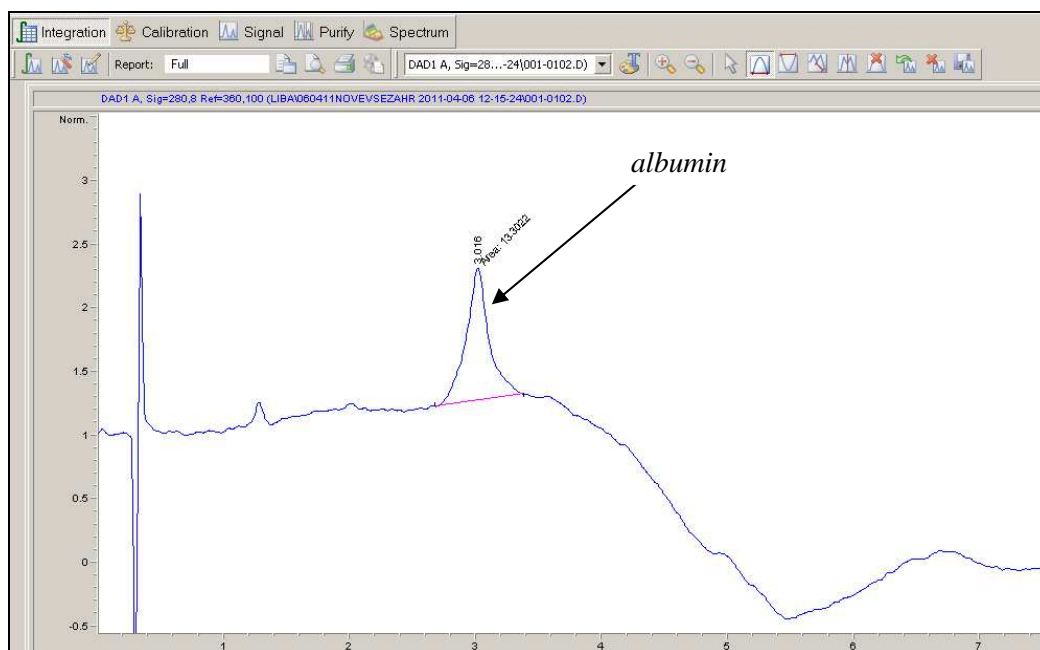
Ani tato předúprava nepřinesla žádné zlepšení v analýze patientských vzorků, což je patrné na obrázku 3. Nelze rozlišit, který pík je albumin, případně transferin, alfa-1-kyselý glykoprotein nebo zda mohlo dojít k eluci bílkovin, které nebyly testovány.



Obr. 3: Vzorek moče pacienta A – před extrakcí; B – po extrakci

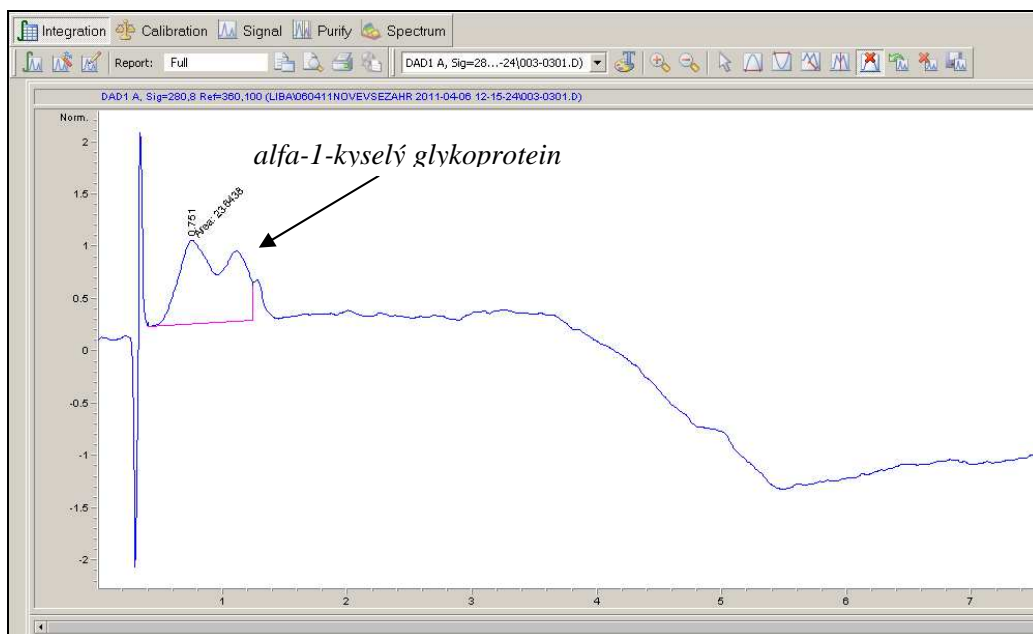
Z těchto důvodů jsme postupně zkoušeli další chromatografické podmínky analýzy, až jsme po dlouhém testování dospěli k podmínkám uvedeným v kapitole 3.1.6.

Za těchto podmínek se nám podařilo dostatečně separovat alfa-1-kyselý glykoprotein, transferin a hemopexin od albuminu (obr. 4-7).



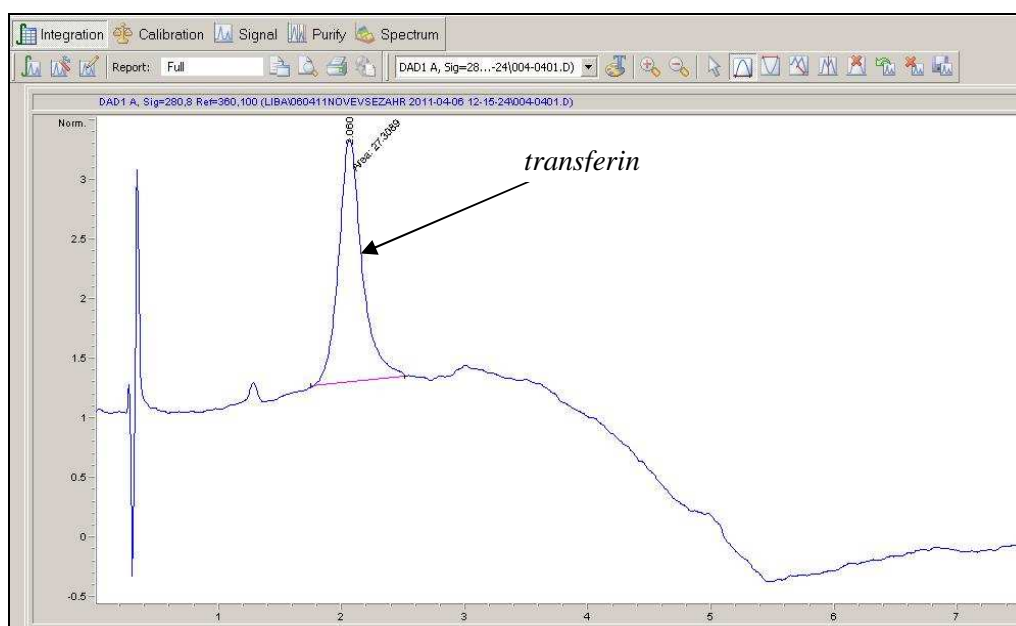
Obr. 4: Albumin

K eluci albuminu dochází ve 3. minutě analýzy a během testování nedochází k posunu jeho retenčního času. Proto je pík albuminu v tomto čase zcela odlišitelný od píků ostatních bílkovin.



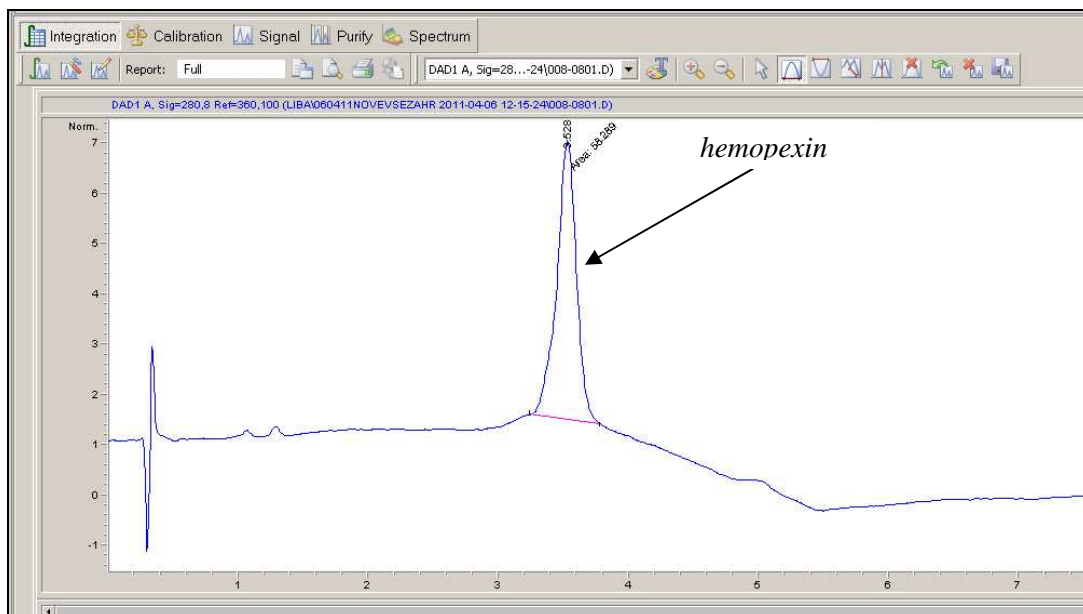
Obr. 5: Alfa-1-kyselý glykoprotein

Alfa-1-kyselý glykoprotein se během analýzy štěpí na dva píky. Eluce alfa-1-kyselého glykoproteinu probíhá v 1. minutě analýzy, čili dostatečně dlouho před elucí albuminu. Díky tomuto rozdílnému retenčnímu času obou proteinů lze jednoznačně rozlišit píky alfa-1-kyselého glykoproteinu i albuminu.



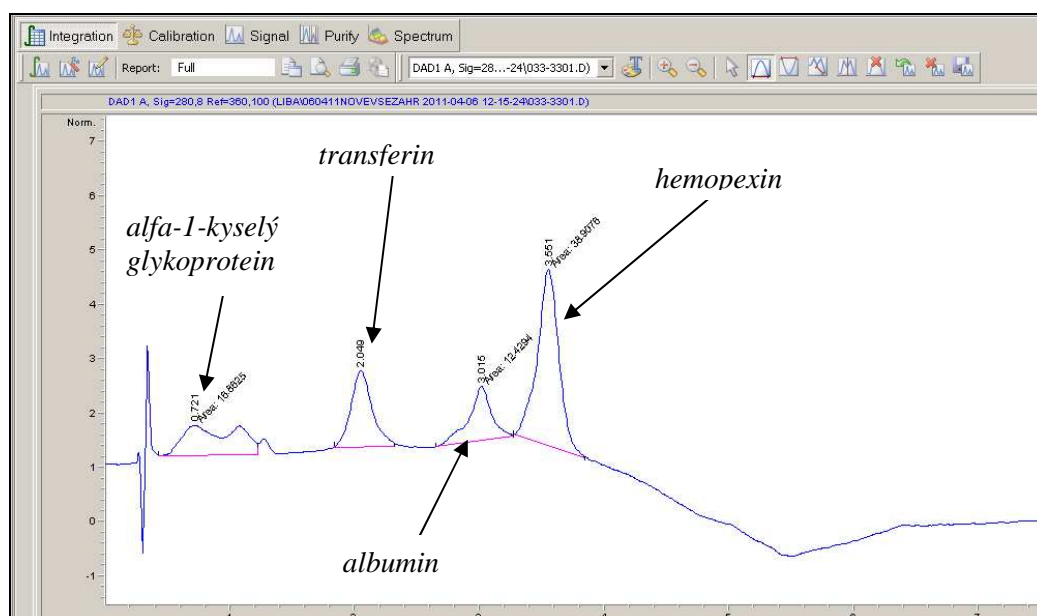
Obr. 6: Transferin

Eluce transferinu je detekována ve 2. minutě analýzy, pík transferinu je dobře odlišitelný od píku albuminu.



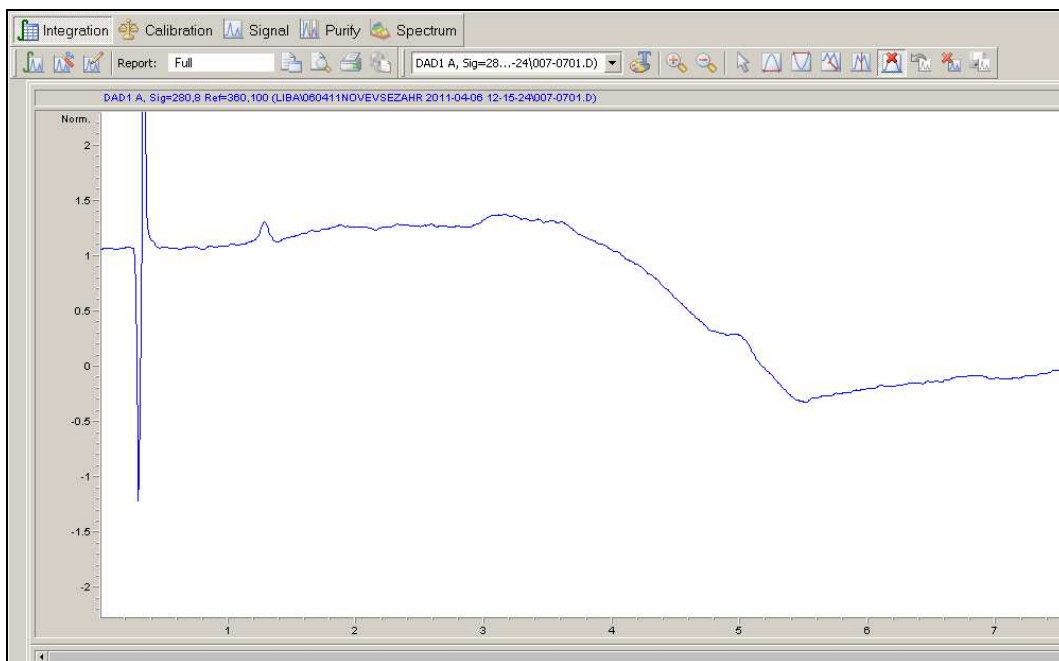
Obr. 7: Hemopexin

Hemopexin se eluuje během 4. minuty analýzy, jeho pík je jasně detekovatelný a nedochází ke koeluci s albuminem. Na obrázku 8 jsou dobře viditelné píky testovaných bílkovin, zřetelně separované od píku albuminu.

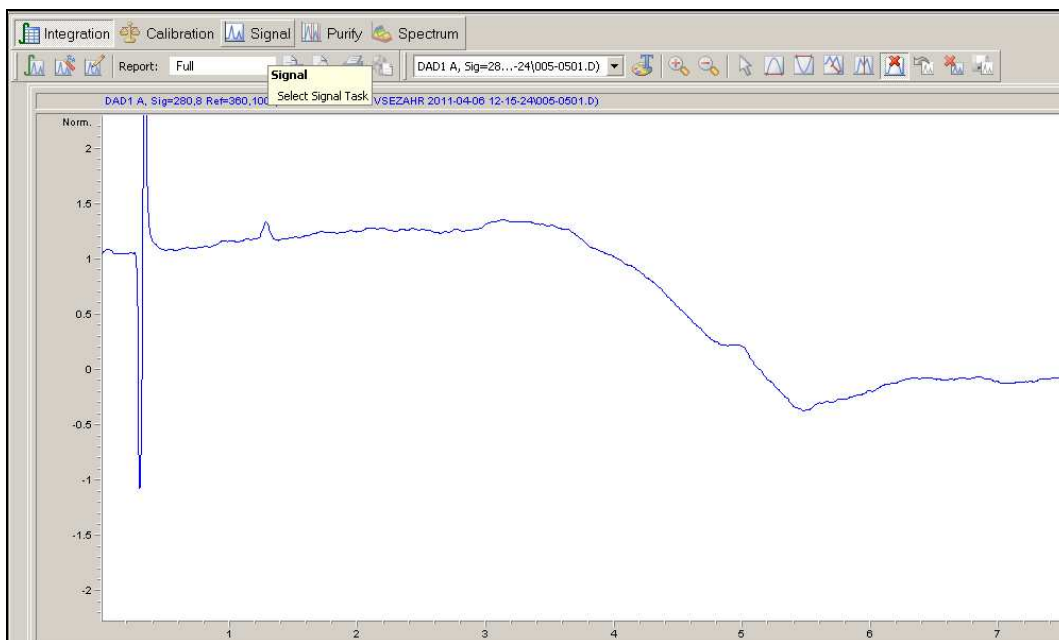


Obr. 8: Směs bílkovin

Za testovaných podmínek vůbec nedošlo k eluci alfa-1- antichymotrypsinu a antitrypsinu, čímž je zřejmé, že tyto dvě bílkoviny také neovlivňují analýzu (obr. 9-10).

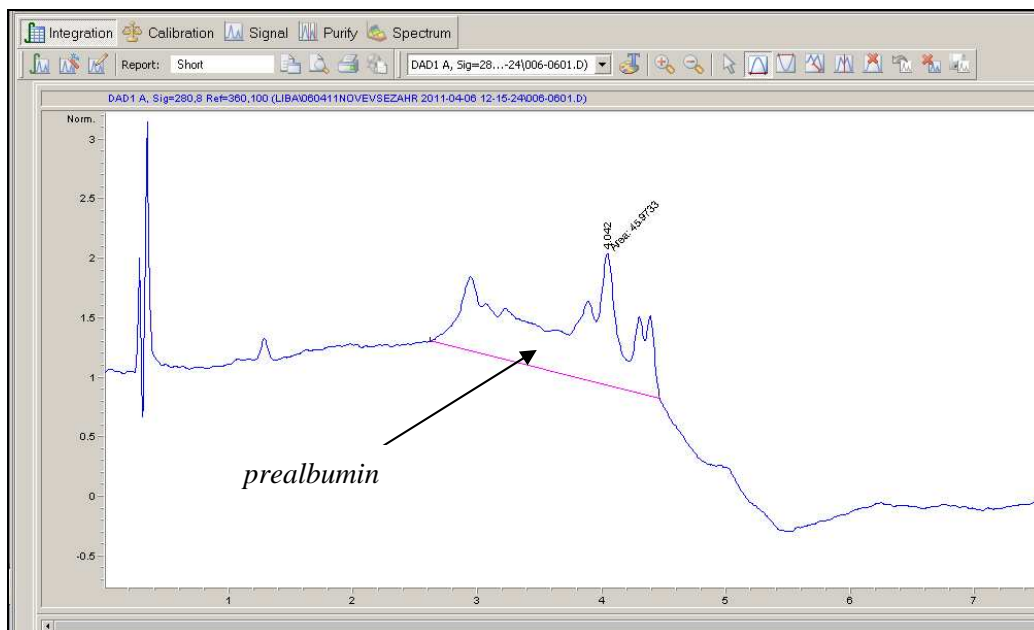


*Obr.9: Alfa-1-antichymotrypsin*

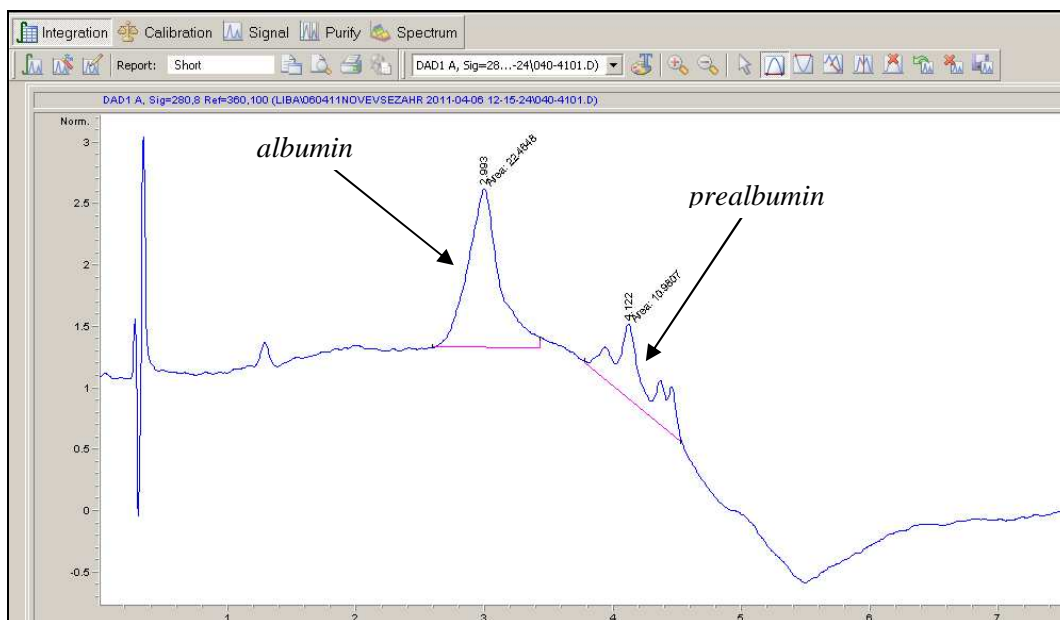


*Obr. 10: Antitrypsin*

Bílkovina, která by mohla ovlivnit analýzu albuminu je prealbumin, který se štěpí na několik píků a jeho eluce se pohybuje v čase cca 2,5-4,5 minuty, což ovlivňuje eluci albuminu. To je patrné na obrázku 11 a 12.



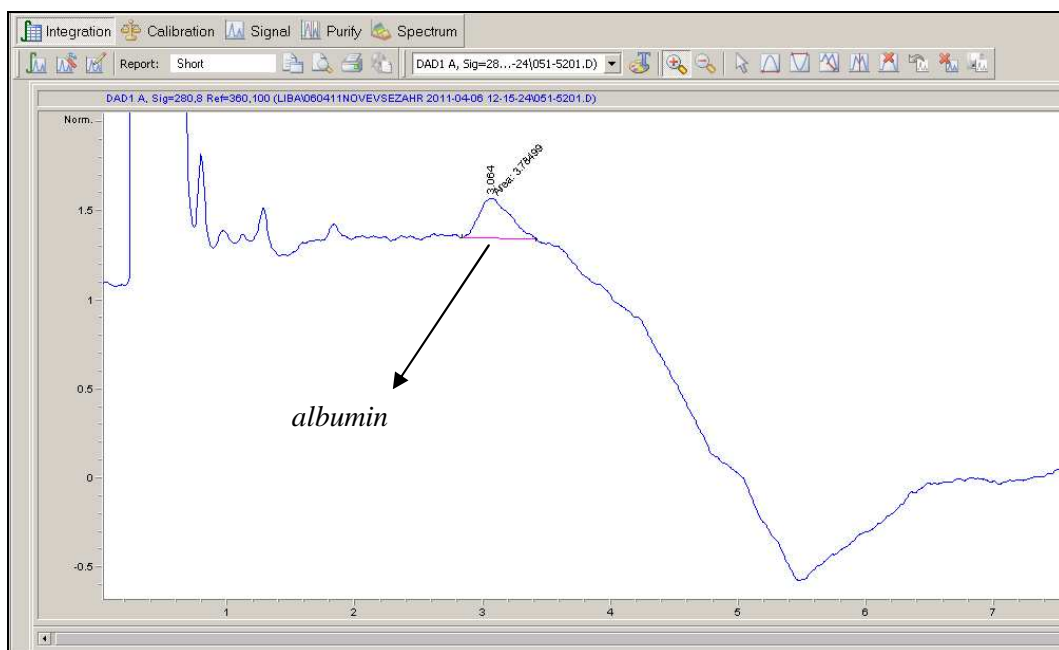
Obr. 11: Prealbumin



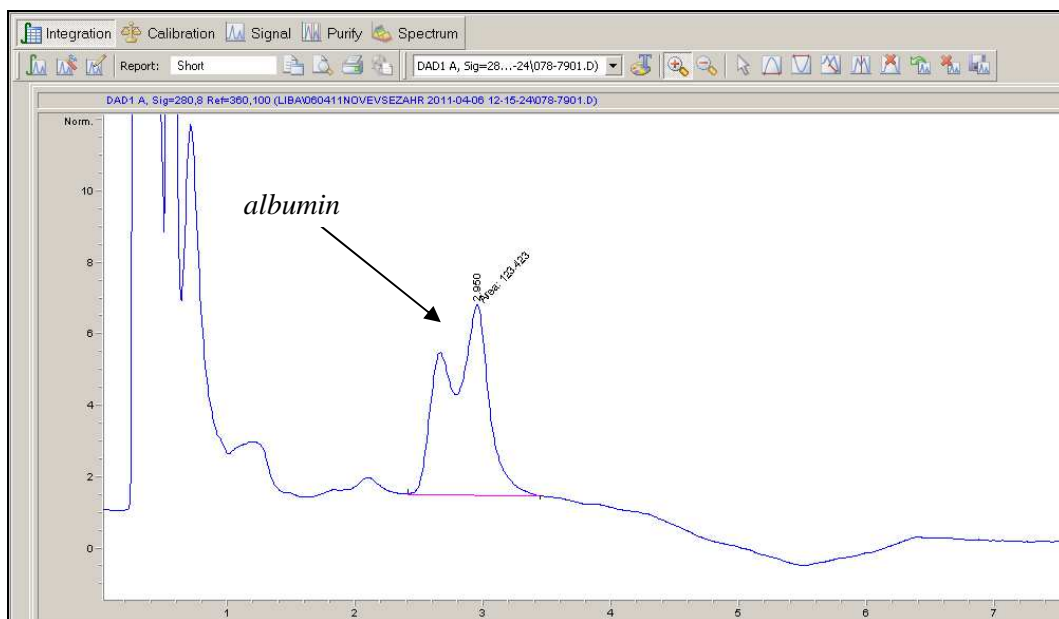
Obr. 12: Směs bílkovin-prealbumin a albumin

Vzhledem k velmi nízké fyziologické hladině prealbuminu v séru (1-15 let 0,09-0,30 g/l; 15-90 let 0,18-0,40 g/l) je ovšem jeho vylučování do moče zcela minimální a nelze ho žádnou běžnou metodou detekovat, tudíž ani metodou HPLC. Na obrázku 11 a 12 je detekován prealbumin připravený ve vysokých koncentracích, které se v moči nevyskytují ani při patologických stavech. Na obrázku 12 byla testována hypotetická koncentrace albuminu 100 mg/l a 50 mg/l prealbuminu. Po vyhodnocení se koncentrace albuminu pohybovala okolo 125 mg/l, z čehož je zřejmé, že dochází k ovlivnění analýzy albuminu prealbuminem, ale tak vysoké koncentrace prealbuminu, které byly připraveny v laboratoři, se v moči nevyskytují.

Analýzou patientských vzorků bylo zjištěno, že při vysokých koncentracích albuminu v moči dochází ke štěpení píku albuminu, což se stávalo i při kalibraci čistého standardu při vysokých koncentracích. Tento jev je popisován i dalšími autory [29, s. 389]. Na analýzu toto rozštěpení však nemělo vliv. Patientské vzorky jsou znázorněny na obrázcích 13 a 14.



Obr. 13: Pacient s nízkou koncentrací albuminu v moči



Obr. 14: Pacient s vysokou koncentrací albuminu v moči

Největší výhodou této metody je, že se na chromatogramu v retenčním čase albuminu nevyskytují žádné interferující píky ostatních testovaných analytů, což je u tak komplexní matrice jakou je moč nesmírně důležité zejména při samotném vyhodnocování. V odborné literatuře jsme nenašli žádnou publikaci, kde by se autorům podařilo odseparovat testované bílkoviny od albuminu. V článku autorů Sviridov et al. se uvádí, že metodou HPLC byla detekována dvojnásobně vyšší hladina močového albuminu a autoři se domnívají, že možnou příčinou je jednak detekce jak nereaktivního albuminu a tak právě koeluce ostatních proteinů podobné velikosti z nichž pouze 70 % tvoří samotný albumin [29, s. 389]. Podobná data uvádí i ostatní autoři, kterým se ale nepodařilo tyto bílkoviny od albuminu separovat [28, s. 1504; 29, s. 389].

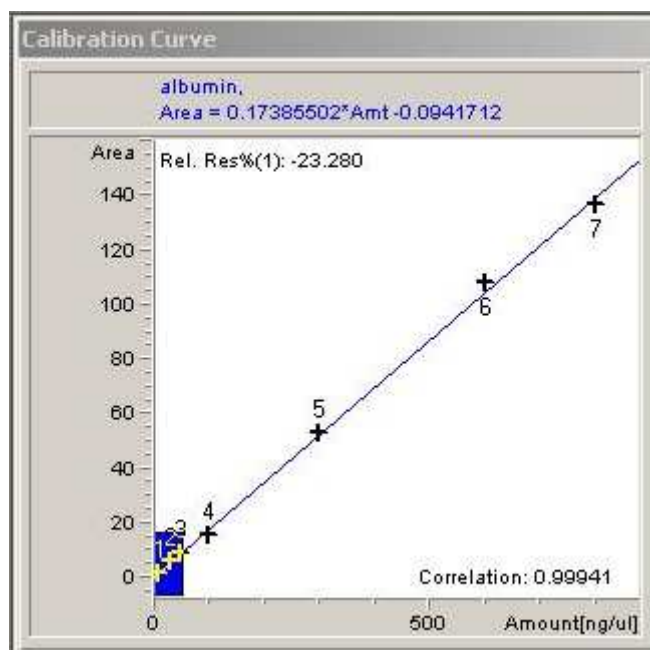
Pouze autoři Turpeinen et al. [35, s. 1756] uvádí, že se podařilo oddělit transferin a alfa-1-kyselý glykoprotein, ale poté co jsme zopakovali podmínky jejich analýzy, nedetekovali jsme vůbec žádné bílkoviny.

## 4.2 VALIDACE METODY

### 4.2.1 Kalibrace

Kalibrační křivka udává závislost koncentrace albuminu ku ploše píku albuminu. Byla provedena 8 bodová kalibrace albuminu, kdy jednotlivé standardy byly připraveny v tripletu o koncentracích 10, 30, 50, 100, 300 600 a 800 mg/l. Poslední

kalibrační bod 1000 mg/l byl z kalibrační křivky vypuštěn. Kalibrace byla v celém svém rozsahu lineární. Pro výpočet koncentrací albuminu byla použita rovnice regrese  $y = 0,173855x + 0,094171$ . Hodnota regresního koeficientu je 0,99941. Regresní koeficient vyjadřuje míru rozptylu bodů kolem regresní přímky. Kalibrační křivka je znázorněna na obrázku 15.



Obr. 15: Kalibrační křivka

#### 4.2.2 Opakovatelnost

Opakovatelnost neboli přesnost měření v sérii byla zjištěna analýzou 20 microalbumin-control 2 (Biorad ) označených jako K1 a 20 standardů albuminu o koncentraci 350 mg/l označených jako K2. Obě kontroly byly změřeny v jeden den, na téže přístroji, s toutéž obsluhou za stejných podmínek. Z výsledků analýzy uvedených v tabulce 4 byl vypočítán průměr, směrodatná odchylka (SD), variační koeficient (CV) a bias (správnost). Směrodatná odchylka vyjadřuje rozptyl hodnot kolem střední hodnoty, čili udává míru rozptylu výsledků. Čím je hodnota směrodatné odchylky nižší, tím je metoda přesnější. Variační koeficient je definován jako podíl směrodatné odchylky a aritmetického průměru a obvykle se vyjadřuje v procentech. Jeho hodnota by neměla přesáhnout 10 %. Jak vyplývá z tabulky 4, bylo dosaženo variačních koeficientů u K1 5 % a u K2 3 %, což zcela splňuje požadavek úspěšné validace.

<b>kontrola č.</b>	<b>K1 (mg/l)</b>	<b>K2 (mg/l)</b>
1	70,5	335,1
2	68,7	343,0
3	70,1	336,0
4	69,3	340,8
5	66,2	344,0
6	66,0	333,8
7	67,9	354,3
8	69,9	349,2
9	57,7	342,0
10	64,3	340,0
11	69,9	345,1
12	68,1	315,0
13	67,2	350,9
14	64,7	328,8
15	65,9	355,4
16	65,7	338,9
17	62,8	346,0
18	68,2	342,0
19	65,8	342,0
20	68,0	344,0
<b>průměr</b>	<b>66,85</b>	<b>341,32</b>
<b>SD-výběr</b>	<b>3,02</b>	<b>9,05</b>
<b>CV %</b>	<b>5,00</b>	<b>3,00</b>
<b>BIAS %</b>	<b>4,23</b>	<b>2,48</b>

*Tab. 4: Opakovatelnost*

#### 4.2.3 Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost byla zjištěna postupnou analýzou 20 microalbumin-control 2 (Biorad ) označených jako K1 a 20 standardů albuminu o koncentraci 350 mg/l označených jako K2. Každý den byla provedena analýza jedné kontroly K1 a jedné K2. Kontroly byly měřeny po dobu 20 dnů na témže přístroji, s toutéž obsluhou. V tabulce 5 jsou uvedeny výsledky analýzy s vypočítaným průměrem, směrodatnou odchylkou, variačním koeficientem a bias. U K1 byla hodnota směrodatné odchylky 2,60 mg/l a korelační koeficient byl 4,00 %. U K2 byla hodnota směrodatné odchylky 13,36 mg/l a korelační koeficient 3,90 %. Z výsledků vyplývá, že všechny parametry odpovídají požadavkům na úspěšnou validaci metody.

<b>kontrola č.</b>	<b>K1 (mg/l)</b>	<b>K2 (mg/l)</b>
1	67,5	311,1
2	69,0	352,4
3	61,3	336,7
4	67,0	346,9
5	65,0	325,6
6	66,1	326,4
7	65,6	350,1
8	65,8	346,5
9	62,4	342,0
10	64,0	328,8
11	69,3	364,9
12	66,0	353,7
13	68,1	350,3
14	65,9	333,8
15	64,2	349,5
16	68,3	343,8
17	71,0	351,0
18	70,2	341,1
19	68,0	365,0
20	70,0	335,3
<b>průměr</b>	<b>66,74</b>	<b>342,75</b>
<b>SD-výběr</b>	<b>2,60</b>	<b>13,36</b>
<b>CV %</b>	<b>4,00</b>	<b>3,90</b>
<b>BIAS %</b>	<b>4,39</b>	<b>2,07</b>

*Tab. 5: Reprodukovatelnost*

#### 4.2.4 Správnost

Správnost (pravdivost-bias) je definována jako těsnost shody mezi průměrnou hodnotou získanou z řady výsledků zkoušek a přijatou referenční hodnotou. Hodnota bias byla vypočítána pro opakovatelnost a reprodukovatelnost. Referenční hodnota u microalbumin-control 2 (Biorad ) byla 69,8 mg/l a hodnota u albuminu 350 mg/l. V tabulce 4 jsou uvedeny hodnoty bias pro opakovatelnost. U K1 je hodnota bias 5 % a u K2 hodnota 3 %. V tabulce 5 pro reprodukovatelnost je hodnota bias u K1 4 % a u K2 3,90 %. Hodnoty bias ani v jednom případě nepřesáhly 5 %.

#### 4.2.5 Mez detekce

Mez detekce (LOD-limit of detection) je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno a analytický signál je statisticky významně odlišný od šumu. Mez detekce byla zjištěna analýzou slepého vzorku, což je v tomto případě chromatografická voda. Odečetla se třikrát výška šumu, z ní se vypočítala průměrná hodnota šumu. Mez detekce byla vypočítána ze sedmibodové kalibrační křivky, sestavené z výšek píků podle následujícího vzorce:

$$X_d = Y_d/b_1$$

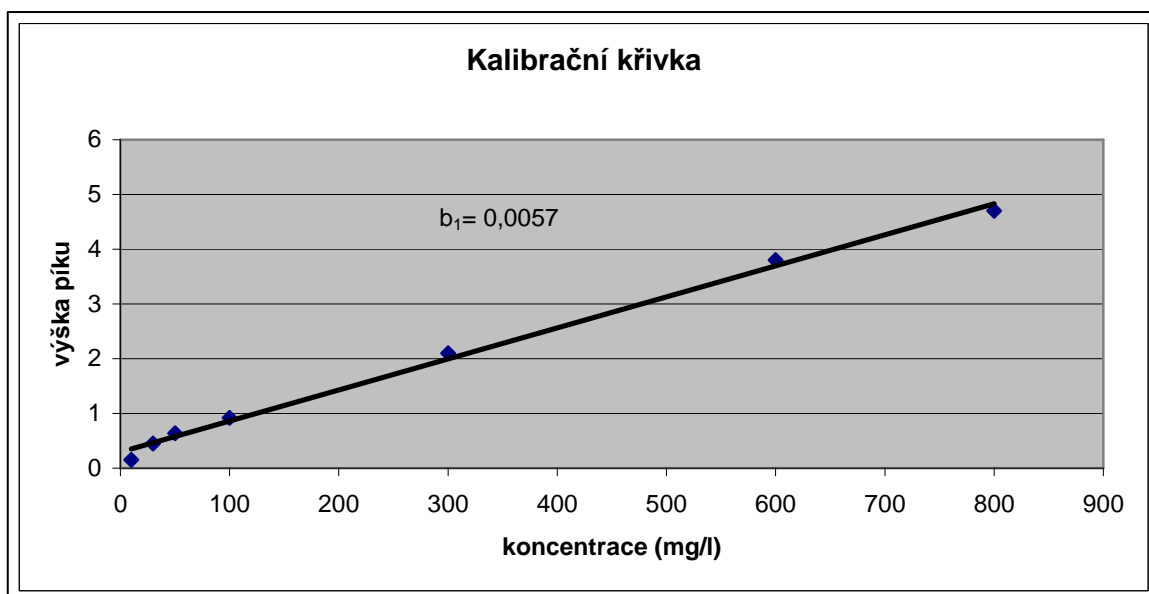
$Y_d - 3 \times h_{\max}$  – maximální kolísání základní linie

$b_1$  – směrnice kalibrační přímky,  $b_1$  musí být z koncentrační závislosti  $y = b_1 \times x$ , kde  $y$  je výška chromatografického píku.

Hodnoty výšek píků slepých vzorků a jejich průměr jsou uvedeny v tabulce 6. Tento způsob výpočtu meze detekce je doporučován pro chromatografické metody.

vzorek	výška píku
nulový 1	0,022
nulový 2	0,011
nulový 3	0,015
průměr	0,016

Tab. 6: Hodnoty výšek píků u slepých vzorků



Obr. 16: Kalibrační křivka

Směrnice kalibrační přímky  $b_1$  je 0,0057.

Mez detekce stanovení pro albumin v moči je 8,42 mg/l.

V literatuře se uvádí [30, s. 389], že hodnota pod 20 mg/l by neměla být již pomocí HPLC vyhodnocovaná, jelikož u takto nízkých koncentrací může být výsledek ovlivněn subjektivním určením hranic píku obsluhou.

#### 4.2.6 Robustnost

Robustnost patří mezi základní validační parametry a určuje míru vlivu změn jednotlivých parametrů na výsledek analytického stanovení. Robustnost byla sledována v průběhu vývoje metody. Byl připraven kontrolní zásobní roztok albuminu o koncentraci 350 mg/l v celkovém objemu 10 ml. Tento objem byl přepipetován do mikrozkušavek a polovina byla uložena do lednice a polovina do mrazáku, kde byl roztok albuminu skladován při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Při každé analýze vzorků bylo použito vždy 300  $\mu\text{l}$  kontrolního zásobního roztoku albuminu z mrazáku a stejné množství kontrolního zásobního roztoku albuminu z lednice. Výsledné hodnoty analýzy obou kontrolních roztoků jsou zaznamenány v tabulce 7. Byl sledován vliv skladování vzorků při  $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$  a při zamrazení na cca  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Analýzou bylo zjištěno, že ani v jednom případě

nedochází k významné změně hodnot. V literatuře se však uvádí, že vzorky by neměly být dlouhodobě uchovávány při teplotě cca  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , jelikož patrně dochází k agregaci albuminu a snížení jeho koncentrace také vlivem změny pH zmrazené moče, což se nám nepotvrdilo [37, s. 308]. Při našem testování jsme ale nepoužili moč skladovanou při cca  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  déle než měsíc.

<b>kontrola č.</b>	<b>lednice (mg/l)</b>	<b>mrazák (mg/l)</b>
1	331,0	284,3
2	321,1	311,1
3	351,0	352,4
4	343,8	320,7
5	332	342,1
6	349,5	333,8
7	346,9	336,7
8	326,4	336,0
9	325,6	340,8
10	351,0	350,9
11	354,3	346,5
12	364,9	366,8
13	290,3	290,3
14	300,6	293,3
<b>průměr</b>	<b>334,89</b>	<b>328,98</b>
<b>SD-výběr</b>	<b>21,07</b>	<b>25,37</b>
<b>CV %</b>	<b>6,31</b>	<b>7,57</b>
<b>BIAS %</b>	<b>4,32</b>	<b>6,01</b>

*Tab. 7: Robustnost metody*

#### **4.3 STANOVENÍ HLADINY MOČOVÉHO ALBUMINU U JEDNOTLIVÝCH SKUPIN PACIENTŮ**

Pro stanovení hladiny močového albuminu byli vybráni převážně pacienti s diagnózou diabetes mellitus. Další vybranou skupinu tvořili pacienti s diagnostikovanou hypertenzí a s onemocněním ledvin. U těchto skupin je vylučování albuminu důležitým příznakem progresu onemocnění a jeho včasný záchyt zlepšuje možnosti léčby těchto pacientů. Další skupinou pro sledování vylučování močového albuminu jsou těhotné ženy s hypertenzí. V naší skupině vybraných pacientů však byly pouze tři ženy s touto diagnózou, proto se výsledky analýzy v tomto případě nehodnotily zvlášť, kvůli nedostatečnému počtu pacientů. Věkový průměr vybraných pacientů byl  $41,8 \pm 27,6$  let. Skupina pacientů s diabetem měla nejčastěji diagnózu

diabetes mellitus závislý na inzulínu, nejčastější diagnózou u pacientů s onemocněním ledvin bylo neurčené selhání ledvin a konečné stádium ledvinového onemocnění.

Analýza byla provedena nejprve na chemickém analyzátoru Cobas Integra-400 plus (Roche). Analýza je prováděna na principu imunoturbidimetrie. Lidský albumin vytváří precipitát se specifickou protilátkou, který je stanoven turbidimetricky při 340 nm. K analýze se používají soupravy reagensů dodávané výrobcem Cobas Integra ALB-T, Gen 2 (Roche). Pracovní rozsah analyzátoru je 3-210 mg/l, mez detekce 3 mg/l. Vzorky stejných pacientů byly poté analyzovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na sestavě Agilent 1200 (Agilent Technologies). V tabulce 8 jsou uvedeny výsledky analýzy u pacientů s hypertenzí, tabulka 9 obsahuje výsledky analýzy pacientů s onemocněním ledvin a v tabulce 10 jsou výsledky analýzy pacientů s diabetem. Tabulka 11 shrnuje výsledky analýzy všech testovaných pacientů.

Pacient č.	HPLC (mg/l)	Integra (mg/l)
1	10,2	5,0
2	9,7	3,0
3	14,8	6,8
4	1348,6	1286,5
5	23,8	11,7
6	28,2	21,1
7	2100	1984,7
8	251,8	238,9
9	1986	1860,4
10	22,3	14,3
11	409,1	383,2
12	16,5	3,3
13	710,5	674,2

Tab. 8: Pacienti s hypertenzí

Pacient č.	HPLC (mg/l)	Integra (mg/l)
1	85,7	79,3
2	101,5	88,6
3	46,6	48,8
4	405,6	367,9
5	42,5	34,8
6	47,0	38,5
7	71,4	70,8
8	35,6	33
9	174,1	162,3
10	55,4	47,0
11	16,3	12,2
12	154,2	150,3
13	22,8	11,1
14	376,5	346,3

Tab. 9: Pacienti s onemocněním ledvin

Pacient č.	HPLC (mg/l)	Integra (mg/l)
1	12,8	8,1
2	84,5	83,3
3	21,0	20,8
4	2800	2609,6
5	10,8	6,0
6	7,8	3,4
7	16,0	14,6
8	6,7	< 3
9	75,5	71,0
10	212,9	196,9
11	59,1	51,8
12	14,2	5,5
13	74,6	75,3
14	13,4	5,2
15	14,9	5,2
16	41,1	36,1
17	546,7	513,5
18	1394,6	1289,7
19	47,9	43,7
20	25,4	10,5
21	377,3	296,4
22	16,0	8,3

Pacient č.	HPLC (mg/l)	Integra (mg/l)
23	24,9	11,8
24	530	495,2
25	26,3	12,7
26	21,2	18,6
27	15,5	8,6
28	15,9	4,5
29	18,6	4,6
30	3454	3394,9
31	11,8	3,0
32	8,6	< 3
33	8,9	3,1
34	17,6	11,8
35	14,6	7,3
36	9,3	<3
37	18,0	5,2
38	11,9	<3
39	80,8	77,1
40	33,5	27,1
41	4,6	<3
42	1100,3	980,1
43	11,0	3,4
44	1411,1	1265,7

Tab. 10: Pacienti s diabetes mellitus

Pacient č.	HPLC (mg/l)	Integra (mg/l)	Pacient č.	HPLC (mg/l)	Integra (mg/l)	Pacient č.	HPLC (mg/l)	Integra (mg/l)
1	64,3	55,6	36	35,6	33,0	71	16,3	12,2
2	28,3	27,2	37	42,7	37,0	72	13,1	4,1
3	606,9	555,2	38	41,1	36,1	73	1986	1860,4
4	85,7	79,3	39	174,1	162,3	74	18,0	5,2
5	12,8	8,1	40	546,7	513,5	75	11,9	3,0
6	23,1	21,7	41	1348,6	1286,5	76	80,8	77,1
7	40,7	50,3	42	1394,6	1289,7	77	33,5	27,1
8	101,5	88,6	43	23,8	11,7	78	4,6	3,0
9	84,5	83,3	44	47,9	43,7	79	22,3	14,3
10	21,0	20,8	45	25,4	10,5	80	1100,3	980,1
11	2800	2609,6	46	377,3	296,4	81	11,0	3,4
12	10,8	6,0	47	20,6	8,3	82	1411,1	1265,7
13	7,8	3,4	48	16,0	8,3	83	409,1	383,2
14	16,0	14,6	49	22,6	15,2	84	16,5	3,3
15	6,7	3,0	50	55,4	47,0	85	154,2	150,3
16	46,6	48,8	51	28,2	21,1	86	46,8	40,4
17	22,0	8,5	52	24,9	11,8	87	19,8	10,4
18	75,5	71,0	53	530	495,2	88	6,6	3,0
19	212,9	196,9	54	26,3	12,7	89	37,8	21,6
20	405,6	367,9	55	21,2	18,6	90	99,8	95,2
21	1337,6	1288	56	15,5	8,6	91	21,7	14,4
22	42,5	34,8	57	14,7	4,2	92	38,8	30,4
23	10,2	5,0	58	15,9	4,5	93	18,8	8,6
24	67,7	64,3	59	18,6	4,6	94	12,3	4,0
25	47,0	38,5	60	3454	3394,9	95	14,3	4,7
26	59,1	51,8	61	2100	1984,7	96	16	7,4
27	14,2	5,5	62	12,0	3,9	97	22,8	11,1
28	9,7	3,0	63	11,8	3,0	98	32,0	25,4
29	74,6	75,3	64	251,8	238,9	99	9,8	6,4
30	71,4	70,8	65	8,6	3,0	100	522	514,0
31	14,8	6,8	66	8,9	3,1	101	24,4	13,8
32	13,4	5,2	67	17,6	11,8	102	34,1	22,3
33	11,5	5,1	68	14,6	7,3	103	14,5	5,7
34	14,5	6,6	69	9,3	3,0	104	376,5	346,3
35	14,9	5,2	70	10,6	4,8	105	710,5	674,2

Tab. 11: Všichni pacienti

Data analýzy patientských vzorků byla statisticky vyhodnocena pomocí software GraphPad Prism 5.0. Normalita rozložení dat byla vyhodnocena pomocí D'Agostino & Pearson testu.

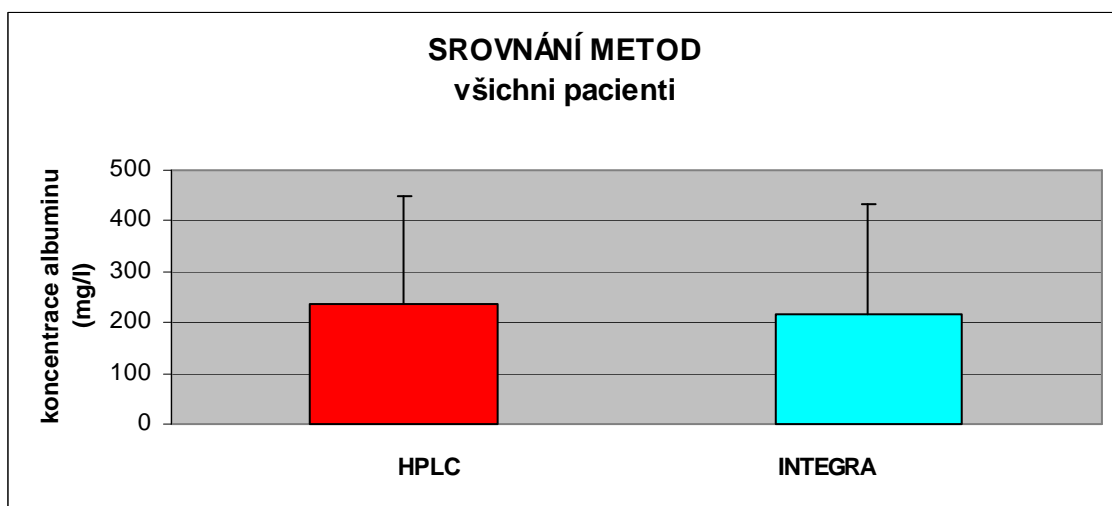
Tabulka s výsledky všech pacientů byla vyhodnocena Mann Whitney testem, jelikož se jednalo o nenormální rozložení dat. Podle výsledků tohoto testu se jedná o významný statistický rozdíl mezi hodnotami analýzy prováděné na analyzátoru Cobas Integra-400 plus a HPLC,  $p = 0,0053$ .

U vybraných pacientů s onemocněním diabetes mellitus se také jednalo o nenormální rozložení dat. Opět byl potvrzen statisticky významný rozdíl mezi oběma metodami,  $p = 0,0062$ .

U skupiny pacientů s hypertenzí se jednalo o normální rozložení dat. Byl proveden neparametrický T-test, který prokázal nesignifikantní rozdíl mezi metodami,  $p = 0,9103$ .

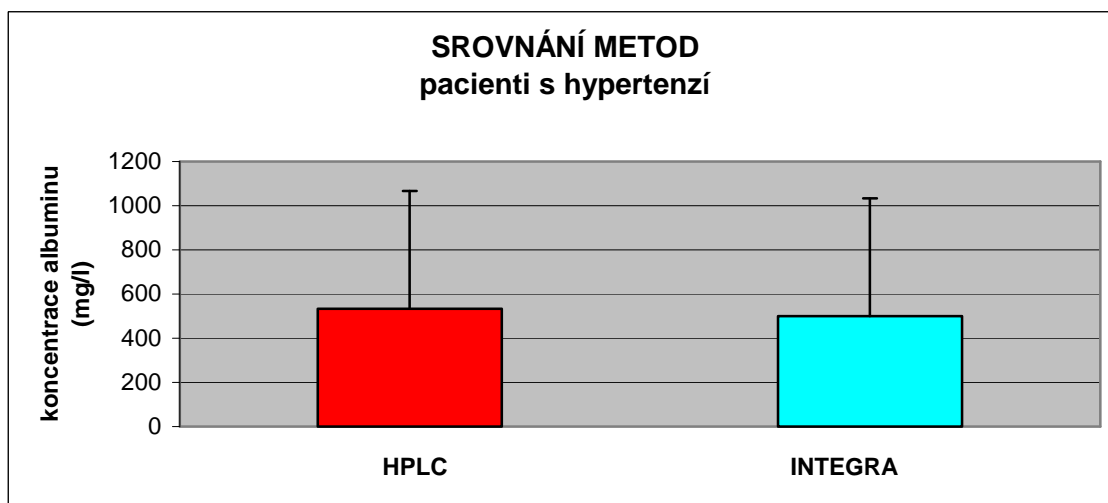
U skupiny pacientů s onemocněním ledvin se také jednalo o neparametrické rozložení dat a opět nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi metodami,  $p = 0,6458$ .

Na obrázku 17 je znázorněno srovnání výsledků analýzy provedené metodou HPLC a metodou imunoturbidimetrickou u skupiny všech pacientů. Průměrná koncentrace albuminu v moči stanovená metodou HPLC byla  $234,4 \pm 569,5$  mg/l. Při stanovení imunochemickou metodou byl průměr koncentrace albuminu  $216,1 \pm 542,8$  mg/l.



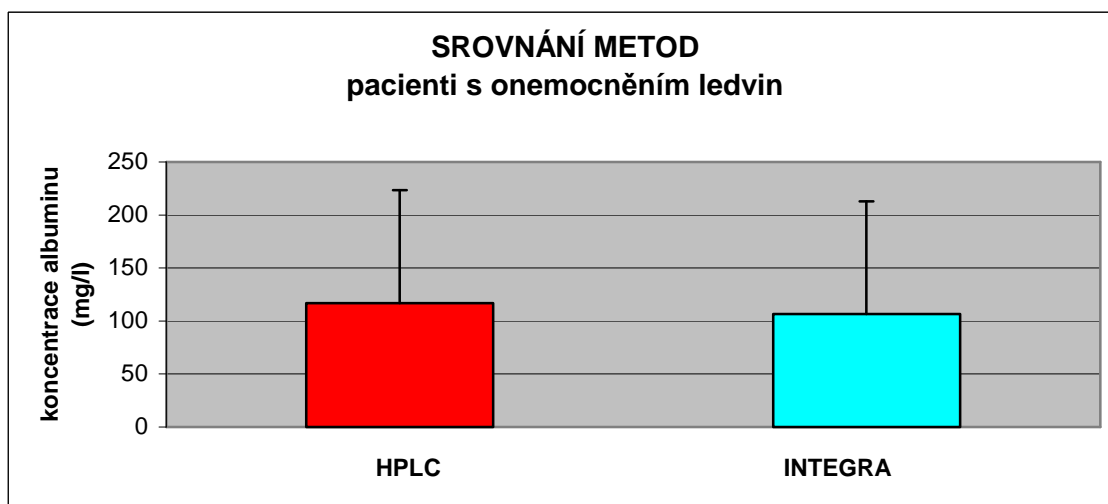
Obr. 17: Srovnání metod u skupiny všech pacientů

Následující obrázky znázorňují srovnání metody HPLC a analýzu na analyzátoru Integra u skupiny pacientů s hypertenzí (obr. 18), pacientů s onemocněním ledvin (obr. 19) a pacientů s onemocněním diabetes mellitus (obr. 20).



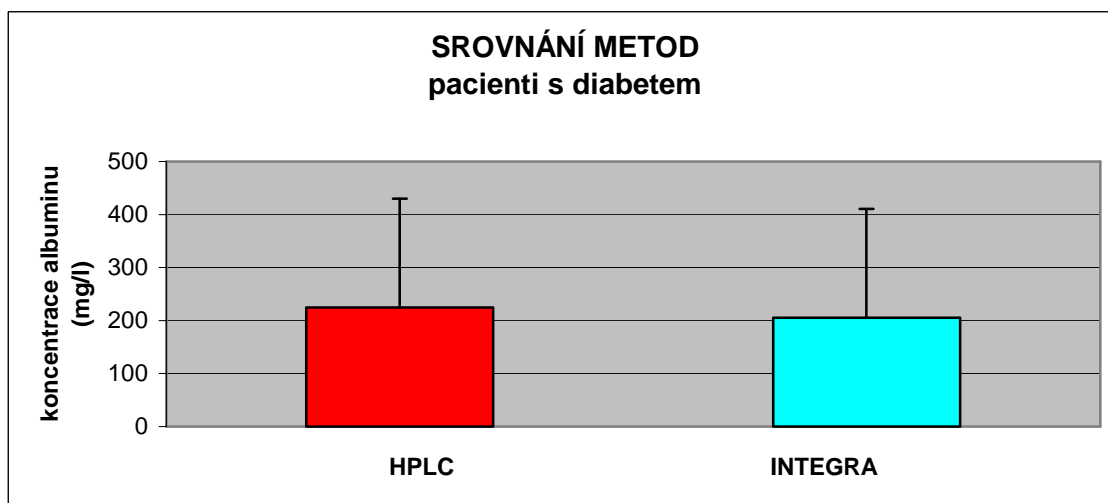
*Obr. 18: Srovnání metod u skupiny pacientů s hypertenzí*

Skupina pacientů s hypertenzí měla průměr výsledků analýzy močového albuminu pomocí HPLC  $533,2 \pm 775,4$  mg/l. Průměr výsledků imunochemickou metodou u této skupiny byl  $499,5 \pm 734,4$  mg/l.



*Obr. 19: Srovnání metod u pacientů s onemocněním ledvin*

Pacienti s onemocněním ledvin měli průměrné výsledky močového albuminu metodou HPLC  $116,8 \pm 125,1$  mg/l. Imunochemickou metodou byl průměr  $106,5 \pm 115,4$  mg/l.



*Obr. 20: Srovnání metod u skupiny pacientů s diabetem*

U pacientů s diagnózou diabetes mellitus byla pomocí HPLC naměřena průměrná hodnota močového albuminu  $224,4 \pm 618,4$  mg/l. Metoda imunochemická vykazovala průměrnou koncentraci albuminu  $205,4 \pm 590,7$  mg/l. Ze srovnání všech skupin pacientů je patrné, že metoda HPLC detekuje vyšší koncentrace albuminu v moči, než metoda imunochemická. Nejvyšší průměrnou koncentraci měla skupina pacientů s hypertenzí, což je pravděpodobně způsobeno ztrátou podocytů, zvýšením objemu glomerulů a expanzí mesangia postižených ledvin [39, s. 25].

Ze studií uvedených v literatuře vyplývá, že včasnou detekcí močového albuminu pomocí metody HPLC lze zachytit diabetickou nefropatii o 3,9 roku dříve u pacientů s 1. typem diabetes mellitus a o 2,4 roku u pacientů s 2. typem diabetes mellitus než u klasických imunochemických metod [38, s. 150].

## ZÁVĚR

Byla vyvinuta metoda pro stanovení albuminu v moči pomocí HPLC. Tato metoda byla testována a validována z hlediska přesnosti a správnosti. Variační koeficient u opakovatelnosti a reprodukovatelnosti byl nejvýše 5,00 %. Variační koeficient u robustnosti metody byl menší než 10 %. Bylo zjištěno, že uchovávání albuminu při cca 2-8 °C nebo cca -20 °C nemá významný vliv na vlastní analýzu.

Metoda byla testována na přibližně 105 patientských vzorcích moče. V této skupině pacientů bylo zjištěno, že se výsledné hodnoty analýzy močového albuminu významně liší od stanovení metodou imunoturbidimetrickou. Metodou HPLC lze detekovat celkový albumin, včetně jeho nereaktivních fragmentů. Touto optimalizovanou metodou se podařilo dostatečně separovat ostatní bílkoviny podobné velikosti jako je albumin, což je transferin, alfa-1-kyselé glykoprotein, hemopexin, prealbumin, antichymotrypsin a antitrypsin, s čímž jsme se u ostatních autorů nesešli.

Nevýhodou stanovení močového albuminu pomocí HPLC by mohla být vyšší pracnost a delší doba zpracování vzorků oproti imunochemickým metodám. Tato nevýhoda je však vyvážena možností dřívějšího detekování mikroalbuminurie a tudíž i možností časnějšího zahájení léčby. Tím se dá lépe předcházet následkům poškození ledvin pacientů.

Tato metoda je vhodná ke stanovení koncentrace albuminu v moči. Je zřejmé, že nenahradí rutinní stanovení pomocí imunochemických metod, ale u rizikových skupin pacientů by měla své opodstatnění.

## SEZNAM LITERATURY

1. ŽABKA, J. Pacienti s proteinurií, léčba. *Interní medicína pro praxi*, 2008, roč. 10, č. 2, s.62-63. ISSN 1803-5256
2. <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text4.htm>
3. Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Turkyňe, DOPORUČENÉ POSTUPY PRO PRAKTICKÉ LÉKAŘE, Projekt MZ ČR zpracovaný ČLS JEP za podpory grantu IGA MZ ČR 5390-3
4. [http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/proteinurie\\_25-07-2010.pdf](http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/proteinurie_25-07-2010.pdf)
5. MASOPUST, J. *Klinická biochemie, požadování a hodnocení biochemických vyšetření*, 1. vydání. Karolinum, Praha, 1998, ISBN 80-7184-649-3
6. MURRAY, Robert K. et al. *Harperova biochemie*, z angl. 23. vyd. přel. Lenka Fialová et. al. 4. vyd. v ČR. Praha: H & H, 2002, ISBN 80-7319-013-3
7. SCHNEIDERKA, P. a kol. *Kapitoly z klinické biochemie*, Karolinum, Praha, 2000, ISBN 80-246-0140-0
8. RACEK, J. a kol. *Klinická biochemie*, 1. vydání. Galén, Praha, 1999. ISBN 80-7262-023-1. Karolinum, Praha, 1999, ISBN 80-7184-971-5
9. TESAŘ, V., ZIMA, T., RACEK, J. a kol. Doporučení České nefrologické společnosti a České společnosti klinické biochemie ČLS JEP k vyšetřování proteinurie, *Klinická biochemie a metabolismus*, Roč. 19, č. 1, s. 28-35, 2010, ISSN 1210 – 7921
10. FOŘTOVÁ, M., KLAPKOVÁ, E., PRŮŠA, R. Analytická úskalí při stanovení albuminurie vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, *Labor aktuell*, 2010, č. 4, s. 24-27, ISSN 1214-7672

11. ZIMA, T. a kol. *Laboratorní diagnostika*, 2. doplněné a přepracované vydání. Galén, Praha, 2007, ISBN 978-80-7262-372-3. Karolinum, Praha ISBN 978-80-246 1423-6
12. ŠTERN, P. a kol. *Obecná a klinická biochemie*, 1. vydání. Karolinum, Praha, 2007, ISBN 978-80-246-1025-2
13. DOUMAS, B. Standards for Total Serum Protein Assays A Collaborative Study *Clinical Chemistry*, 1975, Vol. 21, No. 8, s. 1159-1166, ISSN 0009-9147
14. KRÁLOVÁ, B. a kol. *Bioanalytické metody*, 3. přepracované vydání. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, 2001, ISBN 80-7080-449-1
15. TEPLAN, V. a kol. *Praktická nefrologie*, 2. zcela přepracované a doplněné vydání. Grada, Praha, 2006, ISBN 80-247-1122-2
16. SCHNEIDERKA, P. a kol. *Stanovení analytů v klinické biochemii*, 2. část, 1. vydání. Karolinum, Praha, 2006, ISBN 80-246-1189-9
17. ŠTERN, P. Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie, *Klinická biochemie a metabolismus*, 2006, Roč. 14/35, č. 3, s. 146–151, ISSN 1210-7921
18. RYBKA, J. *Diabetes mellitus – komplikace a přidružená onemocnění*, 1. vydání, Grada, Praha, 2007, ISBN 978-80-247-1671-8
19. MAREK, J. a kol. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*, 4. zcela přepracované a doplněné vydání, Grada, Praha, 2010, ISBN 978-80-247-2639-7
20. ROZTOČIL, A. a kol. *Moderní porodnictví*, 1. vydání, Grada, Praha, 2008, ISBN 978-80-247-1941-2
21. CÍFKOVÁ, R. Hypertenze v těhotenství, *Časopis lékařů českých*, 2009, č. 2 s. 65-71, ISSN 1803-6597

22. DOLEŽALOVÁ, V. a kol. *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*, 4. přepracované vydání, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno, 1995, ISBN 80-7013-198-5
23. HOHENBERGER, E.F., KIMLING, H. *Compendium urinanalysis. Urinanalysis with test strip*. 1. vydání. Mannheim, 2008, Roche Diagnostics, dostupné také z <http://www.diavant.com/diavant/servlet/MDBOutput?fileId=1392>
24. EKNOYAN, G., HOSTETTER, T., BAKRIS, G. et al. Proteinuria and other markers of chronic kidney disease: A position statement of the National Kidney Foundation (NKF) and the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK). *American Journal Kidney Diseases*, 2003, Vol. 42, No. 4, p. 617-622, ISSN 0272-6386
25. JABOR, A. a kol. *Vnitřní prostředí*, 1. vydání, Grada, Praha, 2008, ISBN 978-80-247-1221-5
26. PECK, P. ACE Inhibitor Use Shows Benefit in Microalbuminuria without Clinical Signs of Vascular Disease, Nov. 12, 2003, <http://www.medscape.com/viewarticle/464446>
27. [http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy\\_B/chromatografie.doc](http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc)
28. SHAIKH, A., SEEGMILLER, J., BORLAND, T., et al. Comparison between immunoturbidimetry, size-exclusion chromatography, and LC-MS to quantify urinary albumin, *Clinical Chemistry*, 2008, Vol. 54, No. 9, p. 1504-1510 ISSN 0009-9147
29. SVIRIDOV, D., MEILINGER, B., DRAKE, S. et al. Coelution of Other Proteins with Albumin during Size-Exclusion HPLC: Implications for Analysis of Urinary Albumin, *Clinical Chemistry*, 2006, Vol. 52, No. 3, p. 389-397, ISSN 0009-9147

30. GREIVEL, A., BALAZS, D., COMPERLA, W. Protein Fragments in Urine Have Been Considerably Underestimated by Various Protein Assays, *Clinical Chemistry*, 2001, Vol. 47, No 9, 1717-1719, ISSN 0009-9147
31. CHOUDHURY, D. Diabetic Nephropathy – A Multifaceted Target of New Therapies, *Discovery Medicíně*, 2010, Vol. 10, No. 54, 406-415, ISSN 1539-6509
32. TESAŘ. V. a kol. *Klinická nefrologie*, 1. vydání, Grada, Praha, 2006, ISBN 80-247-0503-6
33. Datový standard MZ ČR 03.08.01 - Národní číselník laboratorních položek MZ ČR 02.15.01, dostupné z:  
<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200610/hypertext/JAACH.htm>
34. COMPER, W., JERUMS, G., OSICKA, T. et al. Differences in urinary albumin detected by four immunoassays and high-performance liquid chromatography, *Clinical Biochemistry*, 2004, Vol. 37, No. 2, p. 105-111, ISSN 0009-9120
35. TURPEINEN, U., KOLVUNEN, E., STENMAN, U. Liquid-Chromatographic Determination of  $\beta_2$ -Microglobulin,  $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein, and Albumin in Urine, *Clinical Chemistry*, 1987, Vol. 33, No. 10, ISSN 0009-9147
36. KUSHNIR, M., MROZINSKI, P., ROCKWOOD, A. et al. A Depletion Strategy for Improved Detection of Human Proteins from Urine, *Journal of Biomolecular Techniques*, 2009, Vol. 20, No. 2, p. 101-108, ISSN 1524-0215
37. ELVING, L., BAKKEREN, J., JANSEN, M. et.al. Screening for Microalbuminuria in Patients with Diabetes Mellitus: Frozen Storage of Urine Samples Decreases Their Albumin Content, *Clinical Chemistry*, 1989, Vol. 35, No. 2, p. 308-310, ISSN 0009-9147

38. CONTOIS, J., HARTIGAN, C., RAO, L. et al. Analytical validation of an HPLC assay for urinary albumin, *Clinica Chimica Acta*, 2006, Vol. 367, No. 1-2, p. 150-155, ISSN 0009-8981
39. MASOPUST, J. Zvýšení krevního tlaku z hlediska patobiochemie a klinické biochemie: Patogeneze a laboratorní vyšetření u arteriální hypertenze, *Zdravotnické noviny: Příloha: Lékařské listy*, 2001, Roč. 2001, č. 10, s. 21-26, ISSN 1214-7664

Jacobs, D. S., Demott, W. R., Finley, P. R., Horvat, R. T., Kasten, B. L., Tilzer, L. L. *Laboratory test handbook*. Hudson (Cleveland) : Lexi-comp Inc, 1994, 1513 p., ISBN 0-916589-12-9.

MUNTAU, Ania Carolina. *Pediatric*. 4. vydání. Praha : Grada, 2009. s. 420. [ISBN 978-80-247-2525-3](#).

<http://www.nature.com/ki/journal/v70/n7/full/5001729a.html>

<http://www.discoverymedicine.com/Devasmita-Choudhury/2010/11/12/diabetic-nephropathy-a-multifaceted-target-of-new-therapies/>

17 <http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0603-146.pdf>

<http://www.zdn.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/diferencialni-diagnostika-hematurie-proteinurie-a-mocovych-kamen-145387>