

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA CELINŠEK

**PRIMERJAVA DIAGNOSTIČNE UPORABNOSTI
REZULTATOV KVALITATIVNE IN KVANTITATIVNE
METODE ZA DOLOČANJE PROTEINOV V URINU**

**COMPARISON OF DIAGNOSTIC APPLICATIONS
RESULTS FROM QUALITATIVE AND QANTITATIVE
METHODS FOR PROTEIN IN THE URINE
DETERMINATION**

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, in sicer pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Meritve vseh koncentracij v urinu so opravili v Laboratoriju za klinično kemijo in biokemijo v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani.

Zahvala

Prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem., se iskreno zahvaljujem za mentorstvo in za vse napotke ter usmerjanja pri pisanju diplomske naloge.

Posebna zahvala gre tudi moji družini in mojemu fantu za podporo in razumevanje pri izdelavi diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Ljubljana, 2011

Kazalo

1 UVOD	11
1.1 LEDVICA	11
1.2 ANATOMIJA IN HISTOLOGIJA	12
1.2.1 Ledvično telesce	13
1.2.2 Proksimalne cevke.....	14
1.2.3 Henlejeva zanka	14
1.2.4 Distalne cevke	15
1.2.5 Zbiralce.....	15
1.2.6 Jukstaglomerulni aparat.....	16
1.3 SISTEM IZVODIL	16
1.3.1 Sečevod (ureter)	17
1.3.2 Sečni mehur (vesica urinaria).....	17
1.3.3 Sečnica (urethra)	17
1.4 KRVNI OBTOK	18
1.5 DELOVANJE LEDVIC	19
1.5.1 Nastajanje urina.....	19
1.6 PROTEINI	22
1.6.1 Vloga in razporeditev proteinov.....	22
1.6.2 Struktura proteinov.....	23
1.7 MOTNJE V DELOVANJU LEDVIC	25
1.8 PROTEINURIJA	25
1.8.1 Določanje	27
2 NAMEN DELA	29
3 MATERIALI IN METODE DOLOČANJA	30
3.1 OPIS SKUPINE PREISKOVANCEV.....	30
3.2 KVALITATIVNA METODA DOLOČANJA PROTEINOV S TESTNIMI LISTIČI	30
3.2.1 Princip	30
3.3.2 Oprema in instrumenti.....	30
3.2.3 Reagenti, kalibratorji in kontrole	30
3.2.4 Delovni postopek.....	31
3.2.5 Semikvantitativno določanje	33

3.3 KVANTITATIVNA METODA DOLOČANJA PROTEINOV	34
3.3.1 Princip	34
3.3.2 Instrumenti in oprema	34
3.3.3 Reagenti, kalibratorji in kontrole	34
3.3.4 Delovni postopek.....	34
3.3.5 Spektrofotometrija.....	34
3.3.6 Zgradba spektrofotometra	36
3.3.7 Merjenje s spektrofotometrom	37
4 REZULTATI.....	39
5 RAZPRAVA.....	46
6 SKLEP	51
7 LITERATURA	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Lega ledvic	12
Slika 2: Anatomija ledvice	13
Slika 3: Nefron	15
Slika 4: Krvni obtok skozi ledvice	18
Slika 5: Nastajanje urina.....	22
Slika 6: Strukture proteinov.....	25
Slika 7: Urisys 2400	32
Slika 8: Testni lističi za Urisys 2400.....	32
Slika 9: Shema enožarkovnega spektrofotometra	37
Slika 10: Shema dvožarkovnega spektrofotmetra	37

KAZALO TABEL

Tabela I: Preglednica razmerja med kreatininom in beljakovinami v urinu.....	28
Tabela II: Rezultati določanja proteinov v urinu s kvalitativno metodo.....	39
Tabela III: Določitev mejnih vrednosti posameznih merjenj s kvalitativno metodo.....	39
Tabela IV: Izračunana aritmetična sredina razreda in standardna deviacija.....	40

Tabela V: Določitev standardne deviacije in število rezultatov izven območja $\pm 2SD$	41
Tabela VI: Določitev lažno negativnih rezultatov glede na naša območja razmejitve razredov.....	42
Tabela VII: Skala(lestvica).....	43
Tabela VIII: Določitev lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov glede na referenčno lestvico.....	44

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Grafični prikaz standardnega odklona.....	40
Graf 2: Grafični prikaz vrednosti izven in znotraj območja $\pm 2SD$	41
Graf 3: Grafični prikaz lažno negativnih rezultatov glede na kvalitativno določitev in meje razredov.....	43
Graf 4: Grafični prikaz lažno negativnih in lažno pozitivnih vzorcev.....	45

POVZETEK

Ledvice imajo pomembno vlogo pri vzdrževanju ravnovesja v telesu. Uravnavajo veliko procesov, kot so izločanje odpadnih snovi, vzdrževanje stalne količine vode v telesu, osmotskega tlaka v telesnih tekočinah ter pH-ja. Če pride do porušanja le-tega, nastanejo različni bolezenski procesi. Takšno stanje je lahko tudi proteinurija, ki je stanje povečane količine proteinov v urinu. Je znak kronične ledvične bolezni, ki jo lahko povzroči diabetes, visok krvni tlak in ostale bolezni ledvic. Proteinurija je lahko posledica spremenjenega prehajanja beljakovin prek glomerulne bazalne membrane, povečane koncentracije plazemskih beljakovin, ki se normalno filtrirajo preko glomerulov, zmanjšane tubulne reabsorpcije, sicer normalne količine beljakovin, izločenih s sečem ali izločanja beljakovin iz tubulnih celic. Pri odraslih, pri katerih je proteinurija večja kot 1 g/dan, je klinično stanje zelo pomembno. Pri stanju nad 3,5 g/dan ali več pride do stanja, ki ga imenujemo nefrotski sindrom.

Laboratorijsko testiranje je edini način, da ugotovimo prisotnost proteinov v urinu. Določamo jih s kvalitativno in kvantitativno metodo. Kvalitativno merjenje smo izvajali s testnimi lističi, ki so nam rezultate podali glede na intenziteto spremembe barve testnega lističa. Rezultati so bili podani z razredi 0, 1, 2, 3 in 4. Kvantitativno merjenje pa smo izvajali z biuret metodo, po principu spektrofotometrije, ki nam je podala točno določene koncentracije proteinov. Rezultate, ki smo jih dobili pri merjenju s kvalitativno metodo, smo primerjali z rezultati, dobljenimi s kvantitativno metodo. Pri tem smo uporabili referenčne vrednosti, ki so za določeni razred podale točno določene koncentracije proteinov in so bile naslednje: za razred 0 $<0,1$ g/l, za razred 1 0,1–0,3 g/l, za razred 2 0,3–1,0 g/l, za razred 3 1,0–3,0 g/l in za razred 4 $\geq 3,0$ g/l.

Pri primerjavi rezultatov smo ugotovili, da je standardna deviacija zmeraj normalna. Največje odstopanje je bilo pri lažno negativnih vrednostih, pri primerjavi rezultatov z referenčno lestvico, kjer smo imeli največ odstopanj pri kvalitativni določitvi v razredu 0 ($<0,1$ g/l) in v razredu 1 (0,1–0,3 g/l). Pri razredu 1 smo imeli glede na kvantitativno določitev kar 81% lažno negativnih rezultatov za en razred – torej takšnih, ki so pri kvalitativni določitvi bili določeni v razred 1, pri kvantitativni določitvi pa smo glede na referenčno lestvico izračunali, da v bistvu padejo v razred 2, saj so imeli koncentracije več

kot 0,3 g/l. Ta rezultat sovpada tudi z aritmetično sredino razreda 1, ki je bil 0,43 g/l, kar je izven referenčne določitve, ki je med 0,1 in 0,3 g/l za razred 1. Pri razredu 0 pa je 48,8-odstotno odstopanje. Razlika je velika, kar lahko privede do napačnih interpretacij rezultatov. Iz tega lahko sklepamo, da kvalitativna metoda glede tega ni tako zanesljiva kot kvantitativna določitev, ki nam poda točno določeno koncentracijo.

ABSTRACT

The kidney have an important role in maintaing balance in the body. The regulate many processes, such as elimination of waste products, maintenance constantly quantitativy of water in the body, osmotic pressure in the body fluids and pH.

If there is a collapse of various disesase processes ocur. This situation can also be proteinuria, which is the situation of increased amounts of proteins in urine. It is a sign of chronic kidney disease that can cause diabetes, high blood pressure and kidney disease.

Proteinuria may result from modified protein transition through the glomerualr basement membrane, increased concentrations of plasma proteins that are normally filtered through the glomerular, tubular acception reuced by normal amounts of protein or eliminated in the urine excretion of protein in tubular cells. In adults in which proteinuria greater than 1 g per day is a clinically relevant. In the state of 3,5 g per day or more result, the reality, which is called nephrotic syndrome.

Laboratory testing is the only way to fingure out the presence of protein in the urine.

Determined by the qualitative and quantitative method. Qualitative measurements were performed with a dipstick, which gave us the results, depending on the intensity of the color change test strip. The results were given to classes 0, 1, 2, 3, and 4.

Qualitative measurements were performend with the biuret method, the principle of spectrophotometry, which has give us a specific protein concentration. The results we obtained in measuring qualitative method, were compared with those obtained by the quantitative method. We used the reference values are presented for a class of specific protein concentration and were as follows: a class 0 $<0,1$ g/l, class 1 0,1–0,3 g/l, class 2 0,3–1,0 g/l, class 3 1,0–3,0 g/l and class 4 $\geq 3,0$ g/l.

When comparing the results we found that the standard deviation always normal. Most deviations were in false-negative values, when comparing the results with a referenece sample, where we had the most discrepancies in the indentification of the class 0 ($<0,1$ g/l) and class 1 (0,1–0,3 g/l). For class 1 we have on the qualitative determination of which 81 % false-negative results for a single class. So those who have been in the qualitative determination specified in class 1, the quantitative determination, we are in relation to a

reference values to calculate that in fact fall within class 2, which had concentrations exceeding 0,3 g/l.

This result coincides with the arithmetic class, which is 0,43 g/l which is outside the reference designation, which is between 0,1 to 0,3 g/l for class 1. In class 0 we had 48,8% deviation. The difference is large, which can lead to misinterpretation of results. From this we can conclude that the qualitative method in this respect is not as reliable as the quantitative method that we make a specific concentration.

SEZNAM OKRAJŠAV

n. –nervus (živec)

a. –arteria (arterija)

v. –vena (vena)

GFR–glomerular filtration rate (hitrost glomerularne filtracije)

AS–aritmetična sredina

SD–standardna deviacija

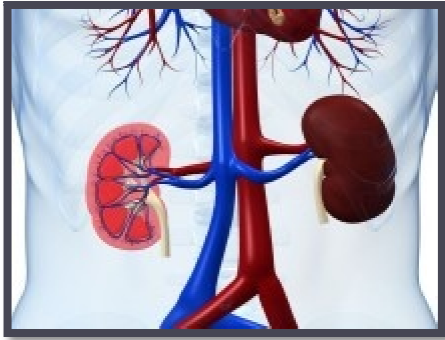
1 UVOD

Ledvice skupaj s sečnimi izvodili sestavljajo sečila. Urin, ki je nastal v ledvicah, teče po sečevodu do sečnega mehurja, kjer se za nekaj časa shranjuje in se skozi sečnico izloči iz telesa. Funkcija sečil je, da vzdržujejo stalno sestavo telesnih tekočin, ker iz telesa odstranjujejo ali zadržujejo vodo, elektrolite in presnovne produkte. Homeostazo vzdržujejo z aktivno in pasivno absorpcijo, filtracijo in izločanjem. Sečila so pomembna tudi za vzdrževanje kislinsko bazičnega ravnovesja. Izločajo večino odpadnih snovi, ki jih pomožna izločala ne morejo. Če ledvice prenehajo delovati, jih nobena druga izločala ne morejo nadomestiti. Ledvici sta tudi endokrini organ, saj sproščata hormona renin in eritropoetin. Hormon renin sodeluje pri uravnavanju krvnega tlaka, eritropoetin pa spodbuja tvorbo eritrocitov. V ledvicah se aktivira tudi vitamin D3 (2,5).

1.1 LEDVICA

Ledvici ležita paravertebralno za potrebušnico ob hrbtenici v višini 12. prsnega in 1. ter 2. ledvenega vretenca – tako je ledvica tudi zaščiten. Desna ledvica zaradi jeter praviloma leži nižje od leve, kar vidimo na sliki 1. S sprednje strani sta pokriti s trebušno mrežo. Sredica ledvične line se nahaja približno v višini drugega ledvenega vretenca. Za zgornjim polom leve ledvice leži 11. rebro, med zgornjo in srednjo tretjino ledvice pa 12. rebro. Zgornji del desne ledvice leži samo na 12. rebro. Spodnja ledvična dela, ki sta bolj odmaknjena od sredinske ravnine kot zgornja, se nahajata 2–3 cm nad črevničnim grebenom (4). Ledvica ima fižolasto obliko in je v hrbtno-trebušni smeri (dorzoventralno) sploščena. Sprednja in zadnja stran sta konveksni, zgornji in spodnji pol sta zaokrožena (5). Ledvici zaradi lege na preponi med dihanjem spreminjata lego. Spodnji del zadnje površine meji na mišici psoas major in quadratus lumborum (4).

Desna ledvica zgoraj meji na desni jetrni reženj, spodaj pa preko nje poteka ascendentni kolon in desni zavoj debelega črevesa. Medialni sprednji del in rob mejita na descendentni del dvanajstnika. Zgoraj leži desna nadledvična žleza. Sprednja stran leve ledvice je zgoraj v stiku z zadnjo stranjo želodca, v višini ledvične line poteka preko ledvice rep trebušne slinavke, spodaj meji na vijuge tankega črevesa. Lateralni rob je zgoraj v stiku z vranico, spodaj pa z descendentnim kolonom. Nad njo leži leva nadledvična žleza (2,4).



Slika 1: Lega ledvic

1.2 ANATOMIJA IN HISTOLOGIJA

Ledvica je parni organ z gladko površino in čvrsto konsistenco. V zgodnjem otroštvu je razdeljena na režnje, kasneje se meje zabrišejo. Dolga je 10–12 cm, široka 5–6 cm, debela 3–4 cm in tehta 130–200 gramov (1,2,5).

Ledvico opisujemo s sprednjo in zadnjo površino (*facies anterior* in *posterior*), z medialnim konkavnim robom (*margo medialis*) in lateralnim konveksnim robom (*margo lateralis*) ter zgornjim polom (*extremitas superior*) in spodnjim polom (*extremitas inferior*). Ledvico ovija čvrsta vezivna ovojnica (*capsula renis*), ki povezuje organ z drugimi organi v okolici. Preko vezivne ovojnice je maščobna ovojnica, ki mehansko varuje ledvico in tvori ložo. Loža je v dve poli razcepljena ovojnica mišice *transversus abdominis* (*fascia prerenalis* in *retrorenalis*) in pritruje ledvico na zadnjo trebušno steno. Na medialnem delu je špranja, ledvična lina (*hilus renalis*), skozi katero vstopajo v ledvico ledvična arterija in živčno nitje, izstopajo pa ledvična vena, sečevod in mezgovnice (1,2,4). Iz ledvične line vodijo žile v ozko špranjo (*sinus renalis*), ki sega okoli 3 cm v notranjost ledvice, ki vsebuje ledvični meh, ledvične čašice, ledvične žile in maščevje (15). Maščobno tkivo, ki obdaja ledvico, je najdebelejše lateralno pod ledvico, na sprednji površini pa ga skoraj ni.

Na čelnem prerezu ledvice vidimo dve vrsti tkiva:

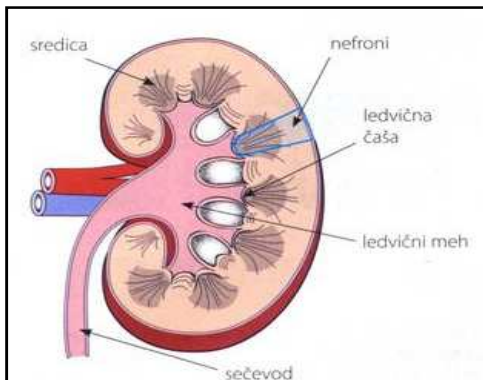
– skorjo (*cortex renis*): 1 cm debela, svetla in zrnata plast, ki se med piramidami ugreza v globino;

– sredico (medulla renis): temnejša in daje videz vzdolžne progavosti (slika 2).

Sredico tvorijo 8–18 piramid, baza piramide je vzporedna s površino ledvic. Vrh piramid imenujemo ledvična bradavica (papilla renalis) in je usmerjen proti ledvičnemu mehu in tvori papilo. Tako seč, ki se izloča na vrhu papil, zbirajo male ledvične čašice (calices renales minores), ki se združijo v večje čašice (calices renales majores). Večje čašice pa se med seboj združijo v lijak, ledvični meh (pelvis renalis), ki leži za ledvičnimi žilami in se nadaljuje v sečevod (1,2). V steni ledvičnega meha je gladko mišičje, ki skrbi za pravilno odtekanje urina. Ledvici tvorita parenhim in intersticij. Parenhim ledvic sestoji iz nefronov in zbiralc. Nefron je funkcionalna enota ledvic in vsaka od ledvic jih vsebuje 1–4 milijonov. Nefron sestavlja:

- ledvično telesce (corpusculum renalis), ki je sestavljeno iz kapilarnega klobčiča in Bowmanove cevke;
- ledvične cevke (tubuli renales), ki se delijo v proksimalno cevko, v Henlejevo zanko in v distalno cevko.

V predelu med skorjo in sredico leži približno ena sedmina nefronov, ki se imenujejo jukstamedularni nefroni. Ostali nefroni so kortikalni nefroni.



Slika 2: Anatomija ledvice

1.2.1 Ledvično telesce

Ledvično telesce ima premer okoli 0,2mm in je klobčič kapilar (glomerulus), ki ga obdaja glomerularna ali Bowmanova ovojnica. Ovojnica ima visceralni list, ki obdaja kapilare in parietalni list, ki predstavlja zunanjo mejo telesca. Med njima je urinski ali Bowmanov

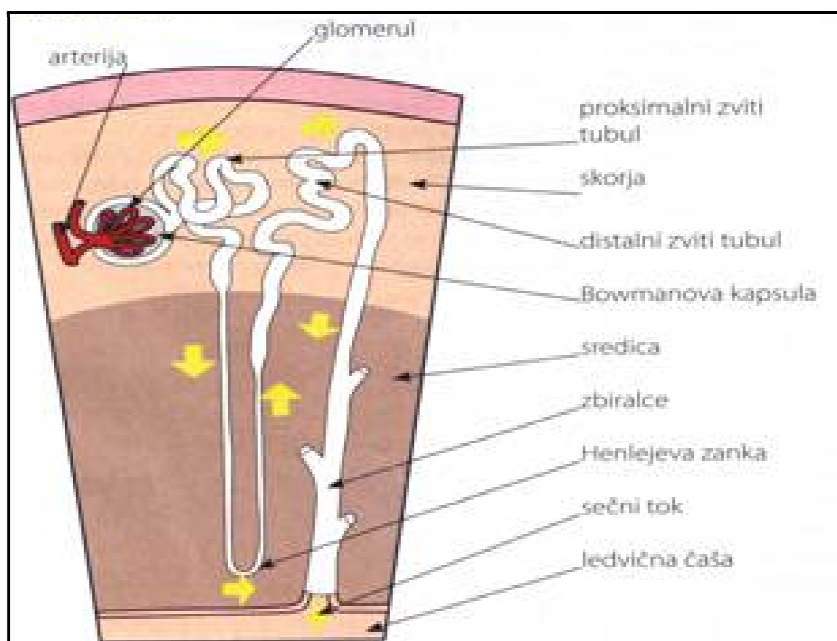
prostor. Vsako ledvično telesce ima žilni pol, kjer vstopa arteriola afferens in izstopa arteriola efferens. Nasproti njemu je urinski pol in se urinski prostor nadaljuje v svetlino proksimalno zvite cevke (1). Preko nje poteka ultrafiltracija plazme iz glomerulnih kapilar v urinski prostor. Urinska membrana predstavlja selektivni makromolekularni filter, skozi katerega težko prehajajo molekule, večje od 10 μ m. Zaradi tega je po kemični sestavi glomerulni filtrat podoben krvni plazmi, ampak ne vsebuje plazemskih beljakovin (1,2,3).

1.2.2 Proksimalne cevke

Proksimalne cevke so dolge 14 mm in imajo premer 60 μ m. Delijo se na proksimalno zvite cevke in proksimalno ravne cevke. Cevka je nadaljevanje Bowmanove ovojnice, kar vidimo na sliki 3, kjer se ploščati epitelij parietalnega lista nadaljuje v izoprizmatški epitelij cevke. Je daljša od distalne in zato gostejše razporejena okrog ledvičnega telesca. V proksimalno zvutih cevkah poteka reabsorpcija glukoze, aminokislin, večina natrijevega klorida in vode ter izločanje kreatinina in drugih snovi iz krvne plazme intersticijskih kapilar (1,2,3).

1.2.3 Henlejeva zanka

Henlejeva zanka leži v sredici, manjši del tudi v skorji, in ima obliko črke U, kar vidimo na sliki 3. Sestavljena je iz širokega descendentnega kraka, ozkega descendentnega kraka, ozkega ascendentnega kraka in širokega ascendentnega kraka. Dolžina ozkega dela je različna, premer je 15–20 μ m, široki del pa je dolg 10 mm. Široki kraki so podobni distalni zviti cevki, ozki kraki pa spominjajo na kapilare (1,2). Naloga Henlejeve zanke je, da vzdržuje hipertoničnost intersticija v ledvični sredici. V njej pa se tudi vrši aktivni in pasivni transport natrijevega klorida (2,15).



Slika 3: Nefron

1.2.4 Distalne cevke

Cevke delimo na distalno zvite cevke in distalno ravne cevke. Široki ascendentni krak Henlejeve zanke preide skorjo, se zviije in se imenuje distalno zvita cevka. V predelu žilnega pola ledvičnega telesca postane del celic visokoprizmatskih, z jedri tesno drug ob drugem. Večina ima v bazalnem delu Golgijev aparat. Ta del se zaradi videza pod mikroskopom imenuje gosta pega (macula densa). Te celice so občutljive na koncentracijo ionov in količino vode v glomerularnem filtratu. Hormon aldosteron (hormon nadledvične žleze) vpliva na celice distalne zvite cevke in tako poveča izmenjavo ionov, natrij se absorbira, kalij se izloči. Tako se vzdržuje homeostaza vode in soli v telesu. Za vzdrževanje kislinsko-bazičnega ravnovesja je pomembno izločanje vodikovih in amonijevih ionov v glomerularnem filtratu (1,2).

1.2.5 Zbiralce

Distalno zvita cevka se nadaljuje v zbiralce (tubuli colligens), ki se povečujejo proti vrhu piramid sredice. Delijo se na kortikalni (v skorji), medularni (v sredici) in papilarni del (na konici papile). Dolžina zbiralca je 20 mm, premer pa do 200 µm. Zbiralca imajo

pomembno vlogo pri koncentriranju urina. Pod vplivom antidiuretičnega hormona iz hipotalamusa in nevrohipofize se iz zbiralc voda reabsorbira naprej v hipertonični intersticij ledvične sredice ter od tod v krvne žile (1,2).

1.2.6 Jukstaglomerulni aparat

Jukstaglomerulni aparat leži ob žilnem polu ledvičnega telesca. Tvorijo ga makula denza (macula densa), jukstaglomerulne celice (aferentne arteriole in eferentne arteriole) in ekstraglomerulni mezangij. V bližini ledvičnega telesca sestavljajo tuniko medijo aferentne arteriole modificirane gladke mišične celice, imenovane jukstaglomerulne celice. Jukstaglomerulni aparat je odgovoren za vzdrževanje krvnega tlaka. Aktivira se pri nenadnem znižanju krvnega pritiska ali zmanjšanju pretoka krvi in urina skozi ledvice ter privede do krčenja gladke mišičnine perifernih žil in zoženja njihove svetline, kar posledično poveča krvni pritisk (1,2,15).

1.3 SISTEM IZVODIL

Urin iz zbiralc odteka v velike in male čašice, nato v ledvični meh, skozi sečevod v sečni mehur in skozi sečnico izven telesa. Ledvični meh, sečevod, sečni mehur in sečnico sestavljajo tri plasti:

– *sluznica*:

– prehodni epitelij (urotelij), ki ga sestavljajo celice, razporejene v pet do šest plasti. Vrhnje celice so okrogle in štrlijo v svetlino. Pri polnem sečnem mehurju se celice razporedijo v tri do štiri plasti, vrhnje celice pa postanejo ploščate. Vrhnje celice prehodnega epitelija imajo debelo plazmalemo, ki predstavlja ozmotsko pregrado med urinom in tkivno tekočino;

– lamina propria sluznice, ki je iz rahlega veziva in je dobro oživčena ter ožiljena. V njej so posamezna elastična vlakna in posamezne gladke mišične celice;

– *mišična plast* je iz notranje in zunanje vzdolžno potekajoče gladke mišičnine ter centralno krožno potekajoče plasti;

– *seroza ali adventicija* (1,2,15).

1.3.1 Sečevod (ureter)

Iz ledvičnega meha izhaja sečevod, po katerem gre seč v sečni mehur. Sečevoda sta dolga 30 cm in potekata od ledvičnega meha ob hrbtenici navzdol, pokrita s trebušno mrežo. V medenici se od strani odpirata v sečnik. Sečevod ima debelo mišično steno, znotraj pa je pokrit z blede rožnato sluznico, ki je vzdolžno nagubana. Sečevod se neprestano krči peristaltično v smeri ledvic proti sečnemu mehurju in v tankih curkih izbrizgava seč v sečni mehur (1,2).

1.3.2 Sečni mehur (vesica urinaria)

Sečni mehur je mišičast meh v mali medenici za sramnično zrastjo. Pri ženski za njim leži maternica, pri moškem pa danko. Zgoraj ima zožen vrh, spodaj pa je razširjen. Čvrste vezi povezujejo sečni mehur z okolico. Debelina sluznice je odvisna od polnosti mehurja. Prazen mehur ima debelo steno in nagubano sluznico, poln pa raztegnjeno in tanko steno ter gladko notranjo površino. Okrog ustja sečnice je mišičnina v obliki pentlje in na ta način tvori mišico zažemalko notranjega ustja sečnice. Sečnico nad mehurjem oklepa še zunanji sfinkter iz skeletnega mišičja, ki preprečuje odtok urina. Sečni mehur sprejme okoli pol litra urina, v sili pa tudi več litrov (1,2).

1.3.3 Sečnica (urethra)

Sečnica je izvodilo iz sečnega mehurja. Po njej odteka seč iz sečnega mehurja na prosto.

Ženska sečnica je malo drugačna kot pri moškem:

a) ženska sečnica (urethra feminina)

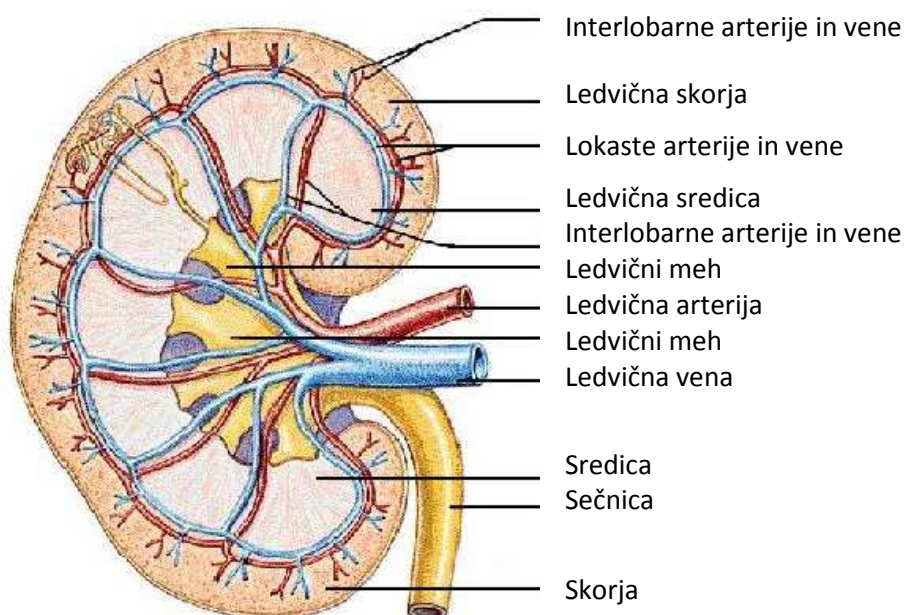
Ženska sečnica je dolga okoli 4 cm in se prilega simfizi. Začne se z notranjo odprtino v sečnem mehurju, poteka pred sprednjo steno nožnice navzdol in naprej ter prestopi medenično dno. Konča se z zunanjo odprtino v preddvoru nožnice. Sečila in ženski spolni organi so anatomsko ločeni. Zunanje ustje obdajata dve majhni obsečnični žlezi (gladulae paraurethrales), ki sta analogni prostati pri moškem. Izvodili se odpirata ob zunanjem ustju sečnice (1,2,3).

b) moška sečnica (urethra masculina)

Moška sečnica je dolga približno 30 cm in se začne ob notranji odprtini sečnice, poteka skozi obsečnico in medenično prepono, nato pa vstopi v penis in se konča ob zunanji odprtini sečnice. Pri moškem sečila in spolni organi niso anatomsko ločeni, zato je moška sečnica končni del sečil in končni del izvodil spolnih organov (1,2,15).

1.4 KRVNI OBTOK

Ledvica dobi arterijsko kri iz svoje ledvične arterije (a. renalis). Preden vstopi v ledvice, se deli na dve veji. Ena veja gre v zgornji, druga v spodnji del ledvice. Veje se delijo v interlobarne arterije, ki potekajo med sosednjima piramidama do meje med sredico in skorjo, kar vidimo na sliki 4. Tu se delijo v lokaste arterije, ki zavijejo pod kotom 90 stopinj in potekajo vzdolž baz piramid. Iz vsake lokaste arterije izhaja več interlobularnih arterij, ki potekajo v skorjo in se cepijo na tanjše aferentne (dovodne) arteriole. Dovodne arterije se razvejijo v klobčič (glomerulus) kapilar in vsaka oskrbuje en nefron. Iz glomerula izstopa eferentna (odvodna) arteriola. Ta vodi v pletež kapilar peritubulne kapilare, ki obdajajo ledvične cevke. Iz peritubulnih kapilar odteka kri v vene, ki potekajo vzporedno z arterijami in imajo enaka imena. Ledvična vena (v. renalis) se izliva v spodnjo votlo veno (v. cava inferior) (2).



Slika 4: Krvni obtok skozi ledvice

1.5 DELOVANJE LEDVIC

Ledvici opravljata različne naloge:

- izločata odpadne snovi, predvsem nekoristne in škodljive snovi;
- vzdržujeta stalno količino vode v telesu, tako da v ustreznih količinah izločata vodo;
- vzdržujeta osmotski tlak v telesnih tekočinah, ker uravnavata izločanje anorganskih soli in tako vplivata na koncentracijo posameznih soli v telesnih tekočinah;
- vzdržujeta pH krvi, ker izločata kisline in baze. Če je v telesu acidoza, izločata ledvici več kislin, pri alkaloziji pa izločata več bazičnih spojin.

Zaradi izločanja številnih snovi iz krvi sta ledvici bogato prekrvavljeni. Skozi ledvici dnevno priteče 1500 litrov krvi. Kri razmeroma hitro in količinsko veliko teče skozi ledvice, kar je videti pri venozni krvi, ki iz ledvic odteka še precej svetlo rdeča (1,5).

1.5.1 Nastajanje urina

Nastanek urina je ključnega pomena za zdravje telesa. Urin je bistra, slana in nekoliko kislina tekočina. Dnevno se ga izloči od 1000 do 1800 ml. Barva je svetlo do temno rjava. Barvo mu dajejo barvila, kot so hemoglobin in urokromi, ki nastanejo iz hemoglobina odmrlih eritrocitov. Specifična teža urina je okoli 1015–1020. Urin je sestavljen iz vode (95 %), organskih snovi, katerih najpomembnejša je sečnina (urea), ki vsebuje dušik in se je dnevno izloči približno 30g. Ta nastaja v jetrih ob spajanju amoniaka z ogljikovim dioksidom. Sečna kislina, ki nastaja v jetrih pri razgradnji purinov in pri razgradnji sestavin celičnih jeder (ob propadanju celic in nastajanju novih), je topna v krvi in se izloči skozi ledvice. Dnevno se je izloči približno 1g. Od anorganskih snovi se izloča NaCl, okoli 15g dnevno. Druge anorganske sestavine so fosforjeva kislina, dušikova kislina, kalijeve in druge natrijeve soli ter kreatinin. V urinu so raztopljeni tudi plini, ogljikov dioksid in amoniak. Normalno pa v urinu ni proteinov, glukoze in krvnih celic. PH urina je 5,0–8,0, odvisno od zaužite hrane.

Urin je normalno steril, ko pa stoji na zraku, se vanj naselijo bakterije. V sečnem mehurju se urin zbira do volumna 200ml, ko pa dosežejo to vrednost, receptorji zaznajo raztegnjenost stene urina. Ta impulz se prenese v sakralno področje hrbtenjače, kar povzroči refleksno skrčenje mehurja in premik urina proti notranjemu ustju sečnice in

takrat začutimo potrebo po uriniranju. Mišica zažemalka deluje pod vplivom naše volje, tako lahko praznjenje mehurja preložimo na nam ugoden čas. Nato se zunanji sfinkter sprosti in urin steče navzven.

Nepotrebne snovi iz krvnega obtoka je treba iz telesa odstraniti. S pomočjo glomerulne filtracije, tubulne reabsorpcije in sekrecije se v ledvicah iz plazme odstranijo nepotrebne snovi ter zadržijo pomembne. To zmožnost ledvic imenujemo klirens. Vsaka snov, ki jo ledvice odstranijo iz plazme, ima svoj klirens, ki je enak razmerju med količino v urinu izločene snovi v časovni enoti (mg/min) in koncentracijo te snovi v plazmi (mg/ml). Klirens je torej navidezni volumen plazme, ki se očisti določene snovi v določeni časovni enoti (ml/min) (2).

Glomerulna filtracija

Filtracija plazme poteka v glomerulih. Podociti v glomerulih tvorijo filter (slika 5), kjer se plazma filtrira. Med fenestriranimi endoteljiskimi celicami kapilar in podaljški podocitov je 0,1 µm debela bazalna membrana, ki določa selektiven prehod za molekule. Molekule, ki so večje od 10 nm, težko prehajajo.

Vsako minuto skozi ledvice preteče 1,2–1,3 l krvi, pri tem pa se v minuti tvori približno 125 ml filtrata; od tega se 124 ml reabsorbira in odteče samo 1 ml urina (2). Nadalje lahko izračunamo, kako velik je obseg filtracije.

GFR na uro je:

$$125 \text{ ml/min} \times 60 \text{ min/h} = 7500 \text{ ml/uro}$$

GFR na dan je:

$$7500 \text{ ml/uro} \times 24 \text{ ur/dan} = 180.000 \text{ ml/dan ali } 180 \text{ litrov/dan.}$$

Glomerulni filtrat je kemično podoben plazmi, samo da je v njem malo beljakovin. Sestavljen je predvsem iz vode, presežka soli (Na in K), glukoze in sečnine (2).

Tubulna reabsorpcija in sekrecija

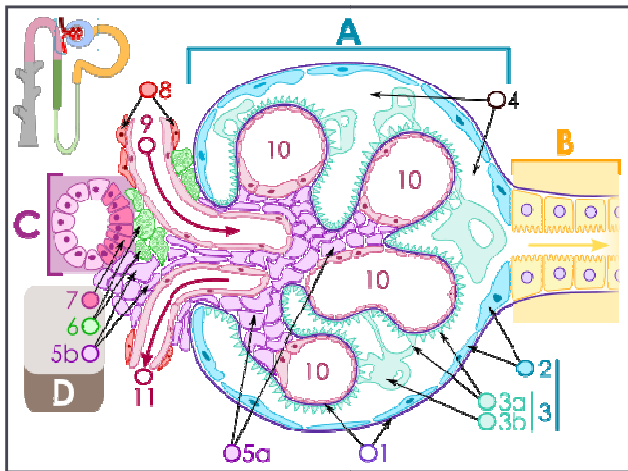
V proksimalno zvitem tubulu se iz glomerulnega filtrata reabsorbira večina vode, glukoze, aminokislin in 85% natrijevega klorida. To poteka z aktivnim transportom ali pasivno

difuzijo. V svetlino proksimalnega zvitega tubula se izločajo tudi kreatinin in druge snovi (zdravila – penicilin).

V Henlejevi zanki se ustvarijo pogoji za nastanek hipertoničnega intersticija, ki vpliva na koncentriranje urina. Osmolarnost intersticija na vrhu piramid je štirikrat višja kot v krvi. Ozki descendentni del Henlejeve zanke je zelo prepusten za vodo in zmerno prepusten za druge snovi, medtem ko je ascendentni del neprepusten za vodo. V širokem ascendentnem kraku Henlejeve zanke se natrijev klorid aktivno prenaša iz tubula, kar omogoča hipertoničnost intersticija v sredici in tubulna tekočina postane hipotonična (2). Voda se v kri vrne nazaj po proksimalnih cevkah s pasivnim transportom, medtem ko glukoza in natrijev klorid z aktivnim.

Če aldosteron deluje na celice distalno zvitega tubula, se poveča njihova prepustnost. Pod njegovim vplivom se reabsorbirajo natrijevi ioni, kalijeve pa se izločijo. V distalno zvitem tubulu se izločijo tudi vodikovi in amonijski ioni, kar je pomembno za vzdrževanje kislinsko-bazičnega ravnovesja (2).

Pod vplivom antidiuretičnega hormona se urin v zbiralcih koncentrira. Ko je vnos vode zmanjšan in omejen, postane pod njegovim vplivom epitelij zbiralc prepusten za vodo, ki se tako reabsorbira v hipertonično sredico. V nefronih in zbiralcih se voda in topljenci reabsorbirajo v peritubulne kapilare ter se s krvjo odplavijo iz ledvic. Izločajo se pa predvsem vodikovi ioni, kalijeve ioni, amoniak in druge škodljive snovi (2).



Slika 5: Nastajanje urina

- A – ledvično telesce
- B – proksimalni tubul
- C – distalni zviti tubul
- D – jukstaglomerulni aparat
- 1 – bazalna membrana
- 2 – Bowmanova ovojnica – parietalni sloj
- 3 – Bowmanova ovojnica – visceralni sloj
- 3a – prstasti podaljšek podocita
- 3b – podocit
- 4 – Bowmanov prostor
- 5a – mezangij (intraglomerulna celica)
- 5b – mezangij (ekstraglomerulna celica)
- 6 – granularne celice (jukstaglomerulne celice)
- 7 – maculadensa
- 8 – miociti (gladko mišičje)
- 9 – aferentna arteriola
- 10 – glomerulne kapilare
- 11 – eferentna arteriola

1.6 PROTEINI

Proteini so sestavljeni iz aminokislin. Aminokislina se med seboj povezujejo s peptidnimi vezmi in tako tvorijo peptide. Povežeta se α -karboksilna skupina ene aminokislina in α -aminska skupina druge aminokislina, iz te reakcije pa izstopi voda. Proteini so polipeptidi z več kot 100 aminokislina. Polipeptidne verige se zvijejo v specifično tridimenzionalno strukturo oziroma konformacijo. Samo strukturo peptidov in proteinov v prostoru določa njihovo aminokislinsko zaporedje. Poznamo primarno, sekundarno, terciarno in kvartarno strukturo, ki je prikazana na sliki 6 (9, 10).

1.6.1 Vloga in razporeditev proteinov

Omenili smo, da se dve α -aminokislina povežeta s peptidno vezjo. Reakcijo kemijsko imenujemo kondenzacija, saj izstopi molekula vode, spoji pa karboksilno skupino ene aminokislina z aaminsko skupino druge aminokislina. Zaradi določenega zaporedja aminokislinskih ostankov imajo proteini v svoji vrsti značilno velikost, obliko in biološko aktivnost. Zato proteini v telesu opravljajo različne vloge. Poznamo encime, strukturne proteine, obrambne proteine, transportne in skladiščne proteine, regulatorne in receptorske proteini, gibalne proteine ter proteine, ki omogočajo krčenje mišic. Kadar so proteini zgrajeni iz ene same polipeptidne verige, jih uvrščamo med monomerne proteine. Druge,

ki pa imajo več polipeptidnih verig, pa prištevamo med oligomerne. Posamezno polipeptidno verigo imenujemo podenota, medtem ko celotnemu proteinu pravimo protein z več podenotami. Razvrščamo jih na enostavne in konjugirane proteine. Med enostavne proteine spadajo tisti, ki so sestavljeni samo iz aminokislinskih ostankov. Konjugirani pa imajo v svoji strukturi kovalentno ali nekovalentno vezane neproteinske skupine, t.i. prostetično skupino (npr. majhna organska molekula, lipidi, sladkorji, kovinski ioni). Glede na osnovni obliki in topnosti delimo proteine v dve kategoriji: glomerulne in fibrilarne proteine. Fibrilarni proteini so netopni in so temelj strukturne čvrstosti ter trdnosti celic in organizmov. Glomerulni proteini so topni in imajo dinamično vlogo pri transportu, imunski zaščiti, katalizi ter drugih procesih (9,10).

1.6.2 Struktura proteinov

1. Primarna struktura

Linearno zaporedje aminokislin, povezanih s peptidnimi vezmi v posameznem proteinu. Mednje uvrščamo tudi prisotnost in položaj disulfidnih vezi, ki povezujejo različna dela ene polipeptidne vezi ali dve različni polipeptidni verigi (10).

2. Sekundarna struktura

Gre za zvitje polipeptidnih verig primarne strukture. Najbolj znani sta α -vijačnica in β -struktura. Lahko pa imajo tudi neurejeno sekundarno strukturo in se nahajajo v obliki naključno urejene strukture.

α -vijačnica je paličasta struktura, ki jo tvori polipeptidno ogrodje, iz njega pa štrlijo stranske verige. Je ena najpogostejših oblik sekundarne strukture (1/4 vseh aminokislin v proteinih se nahaja v tej strukturi). Strukturo stabilizirajo vodikove vezi, ki so skoraj vzporedne z osjo vijačnice. Kisik karbonilne skupine n -te aminokislinske je povezan z vodikom aminske skupine $n+4$ -te aminokislinske. Vsak obrat predstavlja dvig 0,54 nm in pri tem je vključenih povprečno 3,6 ostanka aminokislinske. Strukturo stabilizirajo tudi van der Waalsove interakcije med atomi ogrodja vijačnice in hidrofobne ter ionske interakcije med stranskimi verigami. Vijačnica je pogosto amfipatična, kar pomeni, da imajo nepolarne aminokislinske vijačnice na eni strani, polarne pa na drugi strani.

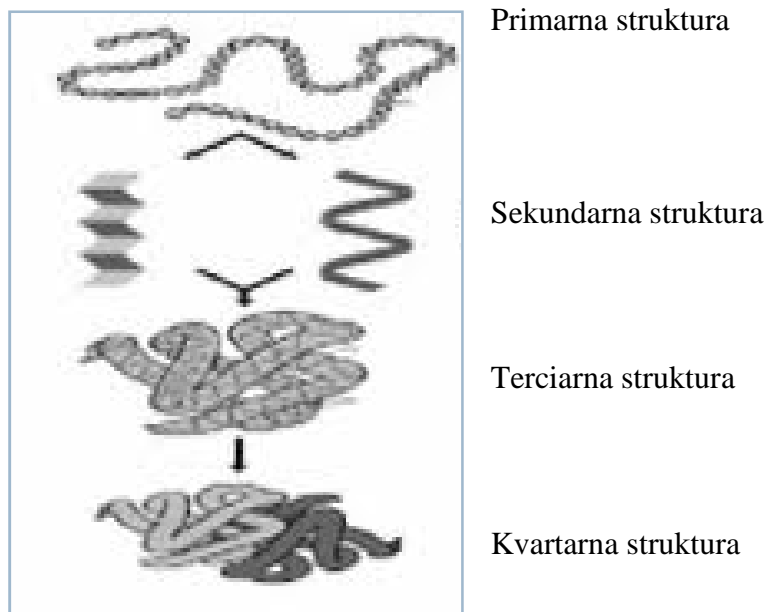
Pri β -strukturi gre za plastovito strukturo, kjer se z vodikovimi vezmi povežejo karbonilne skupine in aminske skupine dveh delov ene polipeptidne verige ali se povežeta dve polipeptidni verigi. Struktura je lahko usmerjena paralelno, če obe polipeptidni verigi potekata v isto smer, ali antiparalelno, če sta polipeptidni verigi v nasprotnih smereh. V β -strukturi so pomembni zavoji in zanke. Običajno β -zavoj sestavljajo 4 aminokisliline; med prvo in četrto je vodikova vez, ki strukturo stabilizira. V zavoju se povežeta karbonilni kisik n -te aminokisliline in vodik aminske skupine $n+3$ -te aminokisliline. Zanka predstavlja širši zavoj, običajno vključuje 6–156 aminokislinskih ostankov (9,10).

3. Terciarna struktura

Terciarna struktura predstavlja prostorsko razporeditev celotne polipeptidne verige v prostoru. Strukturo večinoma določa primarna struktura in tudi okolje, v katerem se nahaja protein. V terciarni strukturi se motivi sekundarnih struktur zložijo v kompaktno strukturo, tako da se lahko v neposredni bližini znajdejo tudi aminokisliline, ki so v aminokislinskem zaporedju precej narazen. Pri proteinih, ki so vodotopni, so interakcije, ki usmerjajo zvijanje proteinov, hidrofobne interakcije, ki usmerjajo hidrofobne aminokisliline v notranjost, polarne aminokisliline pa v zunanji del proteina. Konformacijo proteina v fiziološko aktivni obliki imenujemo tudi nativna konformacija. Poleg hidrofobnih interakcij vzdržujejo konformacijo tudi ostale šibke vezi, kot so vodikove vezi, ionske in van der Waalsove interakcije (9,10).

4. Kvartarna struktura

Kvartarna struktura vključuje prostorsko razporeditev posameznih polipeptidnih podenot in interakcij med njimi. Kvartarna struktura pomeni združitev več podenot v funkcionalen protein. Ko se povežejo med seboj identične ali skoraj identične podenote, jih imenujemo homotipična struktura, ko pa so združene različne podenote, jih imenujemo heterotipična struktura. Kot že omenjeno, nam struktura določa razporeditev in položaj vsake podenote v nativni proteinski molekuli. Podenote med seboj povezujejo šibke nekovalentne interakcije, kot so vodikove, ionske in van der Waalsove vezi ter hidrofobne interakcije (9,10).



Slika 6: Strukture proteinov

1.7 MOTNJE V DELOVANJU LEDVIC

Kot smo že omenili, imajo ledvice nalogo vzdrževanja in reguliranja ravnovesja tekočin, kislinsko-bazičnega ravnovesja in elektrolitov. Bolezni ledvic se pojavljajo z različnimi sindromi, kot so ledvična odpoved (akutna, kronična), akutni nefrotični sindrom, sindrom kroničnega glomerulonefritisa, okužba sečil, tubulointersticijske bolezni... Proteinurija se lahko pojavlja s sindromom brez simptomne spremembe v seču, takrat ko je pod nefrotičnim pragom. Podobno kot hematurija, sterilna levkociturija in cilindurija (7,8).

Odvzem in analiza seča sta zelo pomembna dejavnika pri kliničnem pregledu ter pri obravnavi ledvičnih bolezni. Nenormalnosti v seču pa ne pomenijo vedno ledvične bolezni, lahko da so vzrok prizadetosti drugih organov. Pomembno je pravilno vrednotenje najpogostejših in tudi najpomembnejših sprememb v njem. Urin presojamo kvalitativno in kvantitativno (7,8).

1.8 PROTEINURIJA

Proteinurija je stanje, v katerem so v urinu povečane količine beljakovin. Proteinurija je znak kronične ledvične bolezni, ki jih lahko povzroči diabetes, visok krvni tlak in bolezni,

ki povzročajo vnetje v ledvicah. Najbolj ogroženi so ljudje s sladkorno boleznijo, bolniki z visokim pritiskom ter tisti z družinsko anamnezo o proteinuriji.

Pri proteinuriji ni nobenih specifičnih znakov ali simptomov. Večje količine beljakovin v urinu lahko povzročijo, da je urin videti penast. Zato ker proteini izstopajo skozi ledvice, se v kri ne more reabsorbirati dovolj tekočine, zato nastanejo t.i. edemi. Edem že kaže na veliko izgubo proteinov in da je bolezen ledvic napredovala. Laboratorijsko testiranje je edini način, da ugotovimo prisotnost proteinov v urinu (13).

Splošno zdravje ledvic se oceni z merjenjem izločanja proteinov v urinu. Skozi ledvice preteče več kot 10 g serumskih beljakovin na dan in od tega se jih na dan izloči največ do 150 mg. Plazemske beljakovine sestavljajo 60% v seču izločenih beljakovin: 40 % od teh je serumskega albumina, 15% imunoglobulinov, 5% pa je drugih plazemskih beljakovin. Ostanek sestavlja predvsem Tamm-Horsfallov mukoprotein, ki ga secernirajo celice Henlejeve zanke in začetnega zvitega dela distalnega tubula. Tamm-Horsfallova beljakovina je po sestavi povsem enaka uromodulinu, glikoproteinu, ki inaktivira nekatere limfokine, predvsem interlevkin-1 (IL-1) in faktor tumorske nekroze (TNF). V urin se lahko izločijo še manjše količine urokinaze, imunoglobulina IgA, beljakovin semenskih vezikul, prostate in beljakovin izločka sečnice (8).

Proteinurija oziroma povečano izločanje beljakovin s sečem je lahko posledica:

- spremenjenega prehajanja beljakovin prek glomerulne bazalne membrane;
- povečane koncentracije plazemskih beljakovin, ki se normalno filtrirajo prek glomerulov;
- zmanjšane tubulne reabsorpcije, sicer normalne količine beljakovin, izločenih s sečem;
- izločanja beljakovin iz tubulnih celic (6,7,8).

Pri odraslih, pri katerih je proteinurija večja kot 1 g/dan, je klinično stanje zelo pomembno. Pri stanju nad 3,5 g/dan ali več pride do stanja, ki ga imenujemo nefrotski sindrom. Nefrotski sindrom je klinični sindrom obsežne proteinurije, hipoalbuminemije, edemov in hiperlipidemije (8).

Glede na patofiziološki mehanizem razlikujemo:

1. glomerulno proteinurijo: spremenjena prepustnost glomerulne bazalne membrane ali hemodinamičnih dejavnikov. Za njo je značilna predvsem albuminurija in izločanje β -globulinov, predvsem transferina;
2. tubulno proteinurijo: zmanjšana reabsorpcijo beljakovin ali izločanje beljakovin iz tubulnih celic. Albuminov je manj kot 15% in vsebnost proteinov je zelo različna. Največ jih sestavljajo α_2 -globulini;
3. preobremenitveno proteinurijo: povečana količina filtrabilnih beljakovin v serumu, ki jih tubuli zaradi preseženih sposobnosti niso sposobni reabsorbirati, zato gredo v urin (npr. patološkega imunoglobulina pri plazmocitomu) (7,8).

Urin zdravega človeka vsebuje do 150 mg beljakovin na dan. Proteinurijo opredelimo kot:

- blago (od 150 mg do 1g beljakovin v 24-urnem seču);
- zmerno (od 1g do 3g beljakovin v 24-urnem seču);
- nefrotsko (več kot 3g beljakovin v 24-urnem seču) (11).

Poseben pomen dajemo tudi mikroalbuminuriji, ki je definirana kot povečano izločanje albumina (več kot 30 mg/l dnevno oziroma 20 g/min; normalno se ga izloči 10–15 mg/l), čeprav je celokupna količina izločenih proteinov normalna (manj kot 150 mg/dan). Mikroalbuminurija je lahko stalna ali prehodna. Je znak značilne ledvične okvare pri bolnikih s sladkorno boleznijo ali pri bolnikih z zvišanim krvnim pritiskom (8,11). Še en poseben primer je ortostatična proteinurija, ki je značilna predvsem za adolescente, ko se pri hoji ali pokončni drži pojavi povečano izločanje beljakovin, ponoči oziroma med ležanjem pa popolnoma izgine (8,11).

1.8.1 Določanje

Najbolj učinkovit sistem določevanja proteinurije naj bi bil s testnimi lističi –kvalitativen način določevanja. Uporablja pa se tudi kvantitativen način z biuret metodo. S standardno kvantitativno metodo določamo beljakovine v 24-urni količini urina.

Poleg določanja beljakovin določamo tudi koncentracijo kreatinina in se tako izognemo napakam pri zbiranju urina. Obstaja linearna povezava med 24-urno izločeno količino beljakovin z urinom in razmerjem med koncentracijo kreatinina ter beljakovin v seču.

Normalno razmerje je blizu 0,1 (100–150 mg beljakovin/24 ur in 1000–1500 mg kreatinina/24 ur). Količnik med kreatininom in beljakovinami v urinu 1,0 ustreza 1g beljakovin v 24-urnem seču. Tako lahko določimo pomembnost proteinurije, ki je prikazana v tabeli I.

Tabela I: Preglednica razmerja med kreatininom in beljakovinami v urinu

	Količnik
Minimalna proteinurija	do 0,3
Blaga proteinurija	do 1,0
Zmerna proteinurija	do 3,0
Huda proteinurija	>3,0

2 NAMEN DELA

Za ugotavljanje prisotnih proteinov v urinu se v laboratoriju uporabljata kvalitativna metoda s testnimi lističi in kvantitativna biuret metoda. Naš namen dela je primerjava kvalitativne metode s kvantitativno metodo. Izračunali bomo aritmetične sredine in standardne deviacije ter pogledali odstopanja od referenčnih vrednosti. Ugotoviti želimo, pri kateri vrednosti je meja občutljivosti reagenčnega traku. Namen je tudi ugotoviti, kje je prehod iz negativnega v pozitiven rezultat in pri vseh višjih določitvah iz prehoda določitve kvalitativnega razreda 1 v razred 2, iz razreda 2 v razred 3 in iz razreda 3 v razred 4. Glede na to in naša območja razmejitve razredov želimo pogledati, koliko je lažno negativnih rezultatov. Naš namen je tudi določitev lažno negativnih in lažno pozitivnih rezultatov glede na referenčno lestvico.

3 MATERIALI IN METODE DOLOČANJA

3.1 OPIS SKUPINE PREISKOVANCEV

V raziskavo je bilo vključenih 498 preiskovancev, od tega 250 moških in 248 žensk, ki so bili sprejeti v Univerzitetni klinični center v Ljubljani od leta 2008 do januarja leta 2011. Pri vseh je bila narejena preiskava za merjenje proteinov, in to kvalitativno ter kvantitativno. Starost preiskovancev je bila 20–93 let.

3.2 KVALITATIVNA METODA DOLOČANJA PROTEINOV S TESTNIMI LISTIČI

3.2.1 Princip

Trak na določenem polju vsebuje pH indikator, vgrajen v pufer s pH vrednostjo 3. V stiku z urinom, ki vsebuje proteine, se indikator veže na NH_3^+ skupine proteinov. S tem molekula indikatorja pri stalnem pH-ju pufru spremeni ionsko obliko, s tem pa tudi barvo. Intenziteta nastale barve indikatorja je sorazmerna koncentraciji proteinov. So veliko bolj občutljivi za albumine in manj občutljivi za globuline, mukoproteine, monoklonske imunoglobuline in njihove lahke verige ter nizkomolekularne proteine. Treba je paziti na lažno pozitivne rezultate pri prisotnosti rentgenskih kontrastnih sredstev, dezinfekcijskih sredstev, močno puferiranega urina, zdravilnih, umetni plazmi... Meja dokazljivosti je 0,15–0,20 g/L (7,8).

3.3.2 Oprema in instrumenti

Analizator Urisys 2400, Roche Diagnostics

Analizator Clinitek 500 (Model 6470), Bayer/Siemens

3.2.3 Reagenti, kalibratorji in kontrole

– URISYS 2400 Cassette, Roche Diagnostics, kataloška št.: 3012557061;

- URISYS 2400 Calibration Strip, Roche Diagnostics, kataloška št.:3012590061;
- Liquid urinalysis control billevel 12x12 ml Bio Rad, kataloška št.: 435;
- Reagentni trakovi Multistix 10 SG (Kat.št. 2300), Siemens;
- Chek-Stix Negative, Siemens, kataloška št.: 1365;
- Chek-Stix Positive, Siemens, kataloška št.: 1360.

Kalibracija analizatorja Urisys 2400 se vrši po potrebi, in sicer v skladu z navodili proizvajalca. Kalibracija analizatorja Clinitek 500 se izvrši vsakodnevno samodejno, in sicer pred začetkom dela ter po potrebi med delom v skladu z navodili proizvajalca.

3.2.4 Delovni postopek

a)Clinitek 500

Imamo pripravljen glavni zaslon in zraven testni listič, vzorec ter papirnato brisačo. Testni listič pomočimo v urin, ob robu popivnamo odvečno količino urina. Testni listič položimo na mizico aparata, tako da je obrnjen navzgor, nato s startom zaženemo program. Aparat povleče mizico s testnim lističem v aparat, kjer odčita rezultate, ki jih nato poda.

Podajanje rezultatov:

- neg. ($< 0,1 \text{ g/l}$) = 0;
- sled ($0,1\text{--}0,3 \text{ g/l}$) = 1;
- $0,3\text{--}1 \text{ g/l}$ = 2;
- $1,00\text{--}3,0 \text{ g/l}$ = 3;
- $\geq 3,0 \text{ g/l}$ = 4.

b)Urisys 2400 (prikazan na sliki 7)

Vzorci urina nalijemo v epruvete, na katerih so nalepljene črtne kode, ki predstavljajo posameznega pacienta. Posamezno epruveto vstavimo v stojalo. Nato stojalo z epruvetami vstavimo na mizico aparata, ki nato povleče stojalo v aparat, kjer naprej odčita kode, kar zagotavlja varnost in zanesljivost rezultatov. Nato samodejno napipetira testne lističe z avtomatskim mešanjem, ker ima vgrajeno tipalo za zaznavanje tekočine. Testni lističi, ki so prikazani na sliki 8, se merijo 60 sekund. Določitev barv posameznih parametrov se

opravi s pomočjo odbojne vrednosti od posamezne svetlobe. Opravi se s pomočjo treh barv, s pomočjo treh valovnih dolžin. Po merjenju nam izpiše rezultate. Ko se izmerijo vse epruvete v stojalu, aparat vrne stojalo nazaj ven in pripravljen je na nova merjenja.



Slika 7: Urisys 2400



Slika 8: Testni lističi za Urisys 2400

3.2.5 Semikvantitativno določanje

Kadar opazimo, da vzorec in rezultat nista skladna (npr.: vzorec je moten, rezultat pri merjenju, pa je bil negativen), naredimo še primerjavo s semikvantitativnim določanjem. Semikvantitativno določanje beljakovin se določa tudi, ko si rezultata pri kvalitativnem in kvantitativnem merjenju nista enaka. Semikvantitativno določamo z obarjalno metodo z 20-odstotno raztopino sulfosalicilne kisline. V dve plastični epruveti nalijemo 2 mL svežega, dobro premešanega urina. V eno epruveto dodamo 4–5 kapljic 20-odstotne raztopine sulfosalicilne kisline, premešamo in primerjamo nastalo motnost z motnostjo urina v drugi epruveti.

3.3 KVANTITATIVNA METODA DOLOČANJA PROTEINOV

3.3.1 Princip

Z uporabo avtomatiziranega sistema Dimension Xpand določimo koncentracijo beljakovin v vzorcih urina spektrofotometrično z uporabo barvila pyrogallol rdeče (PR). Pyrogallol rdeče tvori z natrijevim molibdatom rdeče obarvan kompleks, ki ima absorbanco največjo pri 470 nm. Beljakovine v vzorcu reagirajo s tem kompleksom v kisli raztopini in tvorijo modro-vijolični barvni kompleks, ki absorbira pri 600 nm. Absorbanca pri 600 nm je proporcionalna koncentraciji beljakovin v urinu.

3.3.2 Instrumenti in oprema

Dimension®Xpand

3.3.3 Reagenti, kalibratorji in kontrole

- Urinary/cerebrospinal fluid protein flex® reagent cartridge (Kat.št. DF26), Siemens;
- Dade®Tru-Liquid® Urine, liquid assayed urine control (Kat.št. B5230), Siemens;
- UC/CFP calibrator (Kat.št. DC45), Siemens.

Vsi reagenti, kontrole in kalibratorji so tekoči in pripravljene za uporabo.

3.3.4 Delovni postopek

Vsi reagenti so tekoči in pripravljene za delo. Samo vzorčenje, dodajanje reagentov, mešanje, določanje in izpisovanje naredi aparat samodejno. Rokovanje s sistemom je po navodilih proizvajalca.

3.3.5 Spektrofotometrija

Spektrofotometrijo uvrščamo med molekulsko absorpcijsko spektrometrijo –med UV-VIS spektrometrijo, ki se ukvarja z absorpcijo svetlobnega sevanja v območju vidnega polja (350–700nm) in bližnjega ultravijoličnega spektra (250–350nm). Ta temelji na merjenju

absorpcije svetlobe pri prehodu skozi raztopino vzorca. Tako izračunamo ustrezne koncentracije določenih snovi. Izmerjena količina svetlobe, ki gre skozi raztopino, prikazuje koncentracijo določenih snovi, ki absorbirajo svetlobo. Če snov močno absorbira v UV ali vidnem območju, jo lahko s spektrofotometrijo kvantitativno določimo. V drugih primerih dodamo reagent, ki z določano snovjo tvori obarvano spojino.

Absorbanco merimo tako, da vir svetlobe (pri VIS volframove in volfram/halogenske žarnice, pri UV pa devterijeve žarnice) spustimo skozi selektor valovne dolžine (monokromator) in nato skozi kiveto z vzorcem in naprej na fotodetektor (fotocelice, fotopomnoževalke). Tu se izmeri intenziteta prepuščene svetlobe (I), ki je manjša od intenzitete vpadne svetlobe (I_0). Iz teh podatkov izračunamo prepustnot (T –transminanco), ki nam pove, kolikšen del svetlobe je prešel vzorec, na da bi se pri tem absorbiral. Izračunamo jo po formuli:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

T = transmitanca, I = intenziteta prepuščene svetlobe, I_0 = intenziteta vpadne svetlobe.

Bolj pogosto se uporablja formula za absorbanco, ki pa jo izračunamo po formuli:

$$A = \log \frac{1}{T}$$

A = absorbanca, T = transmitanca.

Po Beer-Lambertovem zakonu lahko izračunamo koncentracijo vzorca. Zakon opisuje odnos med absorbanco, debelino kivete in koncentracijo vzorca.

$$A = \varepsilon \times b \times c$$

A = absorbanca, ε = molarni absorptivni koeficient, c = molarna koncentracija, b = debelina kivete oziroma dolžina optične poti, ki jo svetloba prepotuje, pri potovanju skozi vzorec.

3.3.6 Zgradba spektrofotometra

Spektrofotometer je sestavljen iz izvora svetlobe, monokromatorja, kivete, fotodetektorja in dela za izpis.

Za izvor svetlobe pri UV uporabljamo devterijeve žarnice, pri VIS pa volframove in volfram/halogenske žarnice. Monokromator je ponavadi sestavljen iz optične rešetke ali optične prizme, v nekaterih primerih pa tudi iz optičnega filtra. Z izbiro kota padanja svetlobe na optično rešetko ali optično prizmo lahko izberemo valovno dolžino svetlobe, ki jo bo monokromator prepustil.

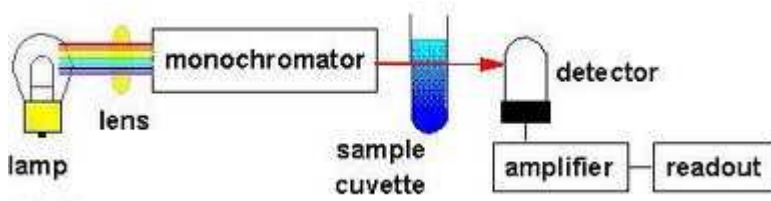
Vsebniki za vzorce/kivete so dolgi okoli 1 cm. So iz kvarčnega ali navadnega stekla. Tista stran, kjer gre vsebnik skozi žarek svetlobe, mora biti gladka in čista, saj to vpliva na točnost merjenja. Detektor je lahko fotopomnoževalka ali vrstični fotodiodni detektor. Fotopomnoževalka pretvori elektromagnetno valovanje v električni signal z ojačevalci signala s kaskado elektronov. Lahko so tudi vrstični fotodiodni detektorji, ki so sestavljeni iz silicijevih kristalov, ki so razvrščeni v vrste. Ko fotodioda absorbira svetlobo, steče električni tok, ki je sorazmeren s številom absorbiranih fotonov. Ta izmeri intenziteto prepuščene svetlobe skozi vzorec.

Spektrofotometrijska merjenja absorpcije se izvajajo pri valovni dolžini, ki odgovarja nekemu absorpcijskem maksimumu. V tej točki je sprememba absorbance na enoto koncentracije največja.

Poznamo:

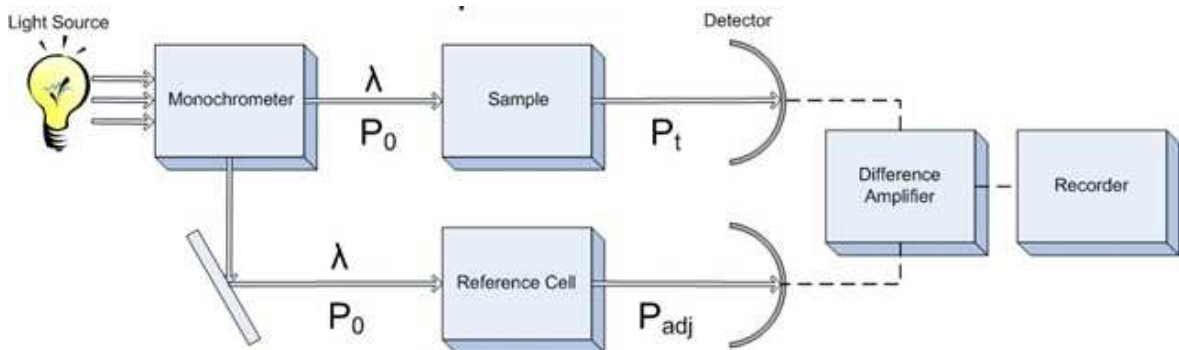
- enožarkovni spektrofotometer;
- dvožarkovni spektrofotometer;
- večkanalni spektrofotometer.

Enožarkovni spektrofotometer je sestavljen iz izvora svetlobe, monokromatorja, vzorca, detektorja in dela za izpis rezultata, kar vidimo na sliki 9. Žarek gre skozi vzorec na detektor in dobimo izpis signala.



Slika 9: Shema enožarkovnega spektrofotometra

Dvožarkovni spektrofotometer je sestavljen tako, da se žarek razdeli na dva žarka enake intenzitete in valovne dolžine, prvi potuje skozi slepo, drugi skozi vzorec, kar vidimo na sliki 10. Z njim lahko merimo večje število vzorcev in spreminjajočo se valovno dolžino, ko želimo posneti celoten spekter.



Slika 10: Shema dvožarkovnega spektrofotometra

3.3.7 Merjenje s spektrofotometrom

Merjenje s spektrofotometrom ni zahtevno. Za kvantitativno določanje izberemo valovno dolžino, pri kateri je absorbanca maksimalna. Spektrofotometer mora biti umerjen. Absorbanca referenčnega vzorca ali slepe mora biti nastavljena na 0, tako da so vse ostale absorbance merjenih vzorcev prikazane glede na referenčni vzorec. Tako spektrofotometer poda delež absorbirane svetlobe glede na referenčni vzorec. Če spojina sama ne absorbira svetlobe, ji dodamo reagente, s katerimi bo tvorila obarvan produkt. Temu pa lahko spektrofotometrično določimo koncentracijo.

Zaporedje dogodkov, ki se zgodijo v spektrofotometru:

- svetlobni vir osvetli vzorec;
- del svetlobe je prepuščen oziroma odbit od vzorca;
- svetloba vzorca je projecirana na monokromator;
- monokromator loči posamezne valovne dolžine in jih zaporedno usmerja na fotodetektor;
- izpis preko računalnika.

4 REZULTATI

Pri računanju smo uporabili 498 preiskovancev, od tega 250 moških in 248 žensk. Vsi so imeli proteine merjene kvalitativno in tudi kvantitativno. Tako smo jih razvrstili v razrede in določili število oseb v posameznem razredu, ki so prikazani v tabeli II.

Tabela II: Rezultati določanja proteinov v urinu s kvalitativno metodo

Kvalitativno	Število oseb
0 (<0,1 g/l)	66 (13%)
1 (0,1–0,3 g/l)	146 (29%)
2 (0,3–1,0 g/l)	114 (22%)
3 (1,0–3,0 g/l)	71 (14%)
4 (\geq 3,0 g/l)	101 (20%)

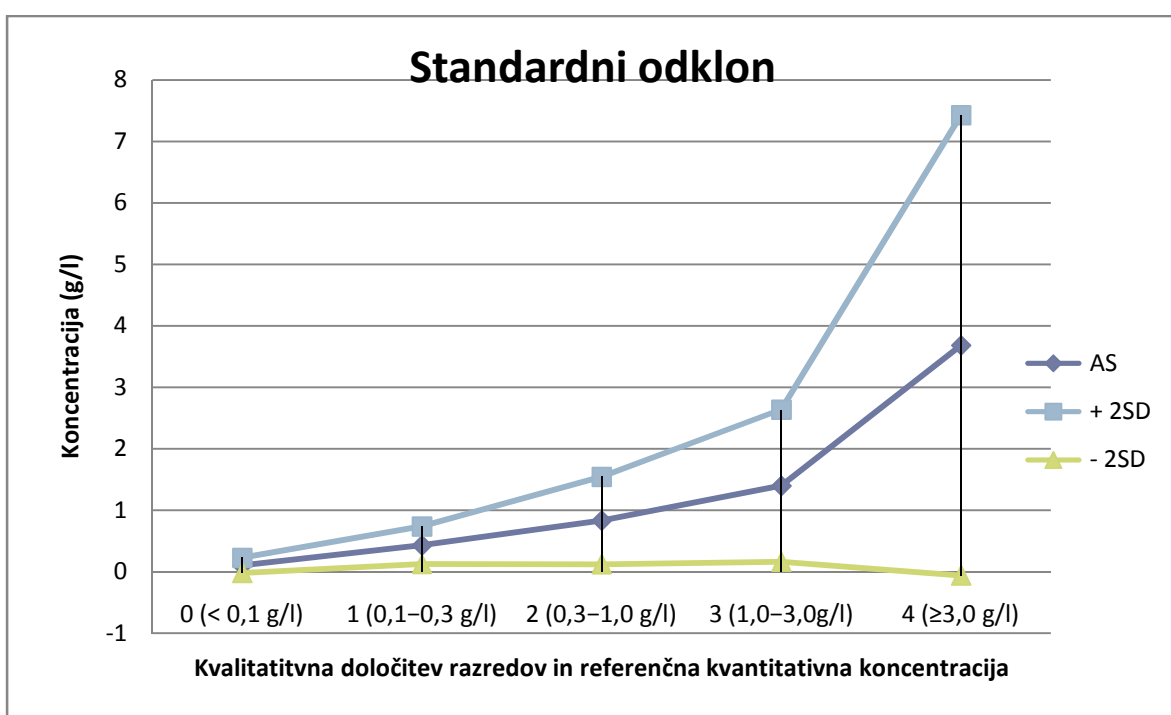
Pri tem smo določili meje razredov glede na kvalitativno določitev, tako da smo vzeli kvantitativne rezultate, pri katerih sta bili izmerjeni najnižja in najvišja koncentracija za posamezni razred. Rezultati so prikazani v tabeli III. Določili smo tudi aritmetično sredino kvantitativnih rezultatov posameznih razredov, kar je prav tako prikazano v tabeli III. V tabeli IV in grafu 1 so prikazani rezultati standardne deviacije.

Tabela III: Določitev mejnih vrednosti posameznih merjenj s kvalitativno metodo

Kvalitativno	Kvantitativno minimalno (g/l)	Kvantitativno maksimalno (g/l)	Aritmetična sredina razreda (g/l)
0 (<0,1 g/l)	<0,03	0,28	0,10
1 (0,1–0,3 g/l)	0,12	1,37	0,43
2 (0,3–1,0 g/l)	0,40	3,46	0,83
3 (1,0–3,0 g/l)	0,78	4,24	1,40
4 (\geq 3,0 g/l)	1,25	14,6	3,68

Tabela IV: Izračunana aritmetična sredina razreda in standardna deviacija

Rezultat kvalitativno	Aritmetična sredina (AS)	Standardna deviacija (1SD)	Standardna deviacija (2SD)
0 (<0,1 g/l)	0,103	0,062	0,125
1 (0,1–0,3 g/l)	0,430	0,153	0,306
2 (0,3–1,0 g/l)	0,833	0,356	0,712
3 (1,0–3,0g/l)	1,399	0,615	1,238
4 (≥3,0 g/l)	3,682	1,872	3,744



Graf 1: Grafični prikaz standardnega odklona

Glede na AS in njegov interval $\pm 2SD$ smo glede na naše podatke izračunali, koliko rezultatov je bilo izven meja 95-odstotnega intervala. Rezultati so prikazani v tabeli V in grafu 2.

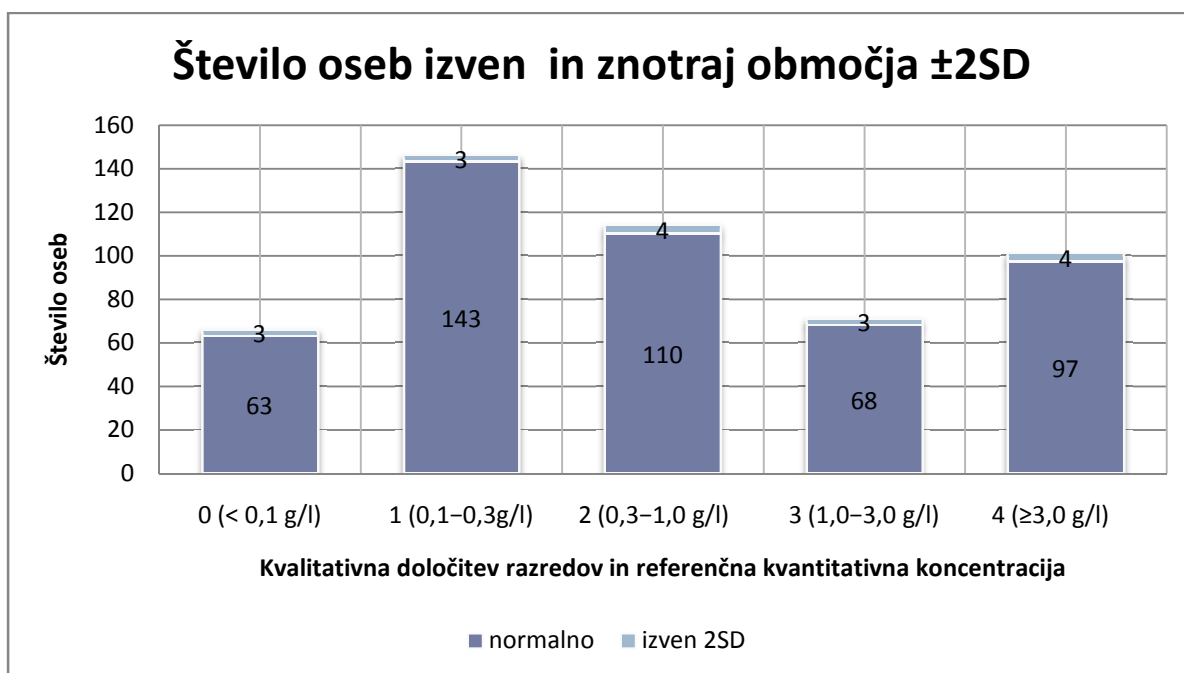
Glede na $AS \pm 2SD$ so rezultati naslednji:

- v razredu 0 ($0,103 \pm 0,125$) je 63 oseb padlo v 95-odstotni interval $\pm 2SD$, 3 osebe (4,5%) pa so bile izven intervala;

- v razredu 1 ($0,430 \pm 0,306$) je 143 oseb padlo v 95-odstotni interval $\pm 2SD$, 3 osebe (2,1%) pa so bile izven intervala;
- v razredu 2 ($0,833 \pm 0,712$) je 110 oseb padlo v 95-odstotni interval $\pm 2SD$, 4 osebe (2,6%) pa so bile izven intervala;
- v razredu 3 ($1,399 \pm 1,238$) je 68 oseb padlo v 95-odstotni interval $\pm 2SD$, 3 osebe (4,2%) pa so bile izven intervala;
- v razredu 4 ($3,682 \pm 3,744$) je 97 oseb padlo v 95-odstotni interval $\pm 2SD$, 4 osebe (4,0%) pa so bile izven intervala.

Tabela V: Določitev standardne deviacije in število rezultatov izven območja $\pm 2SD$

Kvalitativno	0	1	2	3	4
AS $\pm 2SD$	$0,103 \pm 0,120$	$0,430 \pm 0,306$	$0,833 \pm 0,712$	$1,399 \pm 1,238$	$3,682 \pm 3,744$
Število oseb izven območja	3 (4,5%)	3 (2,1%)	4 (2,6%)	3 (4,2%)	4 (4,0%)



Graf 2: Grafični prikaz vrednosti izven in znotraj območja $\pm 2SD$

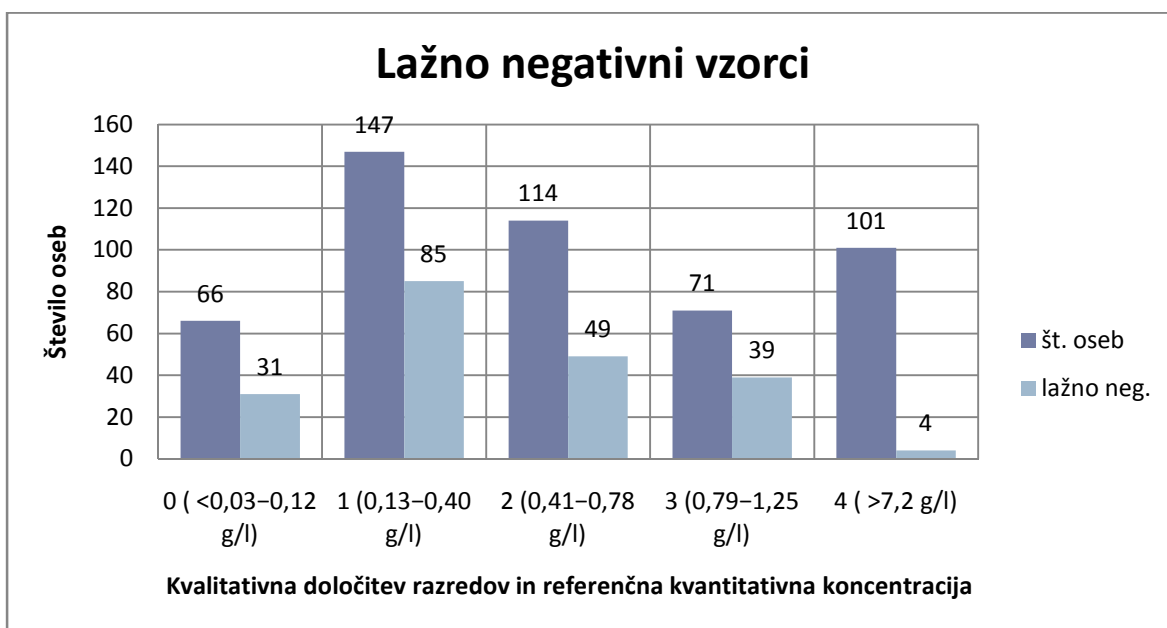
Podatke smo pogledali še glede na naše določitve razmejitve razredov glede na določeno oceno kvalitativnega merjenja.

Glede na naša območja razmejitve razredov, ki smo jih dobili tako, da smo za posamezni razred, ki je bil določen kvalitativno, podali najnižjo in najvišjo koncentracijo, ki je bila izmerjena kvantitativno. Nato smo vzeli najnižjo vrednost naslednjega višjega razreda za zgornjo mejo predhodnega nižjega razreda, kar je prikazano v tabeli VI.

Na ta način smo izračunali lažno negativne rezultate glede na naša območja razmejitve. Ti rezultati so prikazani v grafu 3. Dobili smo naslednje rezultate: v razredu 0 je bilo 31 oseb (47,0%) lažno negativnih, v razredu 1 je bilo 85 oseb (58,2%) lažno negativnih, v razredu 2 je bilo 49 oseb (42,9%) lažno negativnih, v razredu 3 je bilo 39 oseb (55,0%) lažno negativnih, v razredu 4 pa so bile 4 osebe (4,0%), ki so imele zelo povečano količino proteinov v urinu.

Tabela VI: Določitev lažno negativnih rezultatov glede na naša območja razmejitve razredov

Kvalitativna določitev	0 ($< 0,1$ g/l)	1 ($0,1-0,3$ g/l)	2 ($0,3-1,0$ g/l)	3 ($1,0-3,0$ g/l)	4 ($\geq 3,0$ g/l)
Najnižja in najvišja koncentracija(g/l)	$<0,03-0,28$	$0,12-1,37$	$0,40-3,46$	$0,78-4,24$	$1,25-14,60$
Območje razmejitve razredov (g/l)	$<0,03-0,12$	$0,13-0,40$	$0,41-0,78$	$0,79-1,25$	$1,25-14,60$
Lažno neg. (g/l)	$>0,12$	$>0,40$	$>0,78$	$>1,25$	$>7,20$
Število oseb	31	85	49	39	4



Graf 3: Grafični prikaz lažno negativnih rezultatov glede na kvalitativno določitev in naše meje razredov

Nato smo naredili še primerjavo med kvalitativnim merjenjem in kvantitativnim merjenjem z referenčno skalo, kar je prikazano v tabeli VII, kjer so tudi podatki o aritmetični sredini razredov.

Tabela VII:Skala(lestvica)

Kvalitativno	Kvantitativno (skala)	Aritmetična sredina (AS)
0	<0,1g/l	0,10 g/l
1	0,1–0,3 g/l	0,43 g/l
2	0,3–1 g/l	0,83 g/l
3	1–3,0g/l	1,40 g/l
4	≥3,0 g/l	3,68 g/l

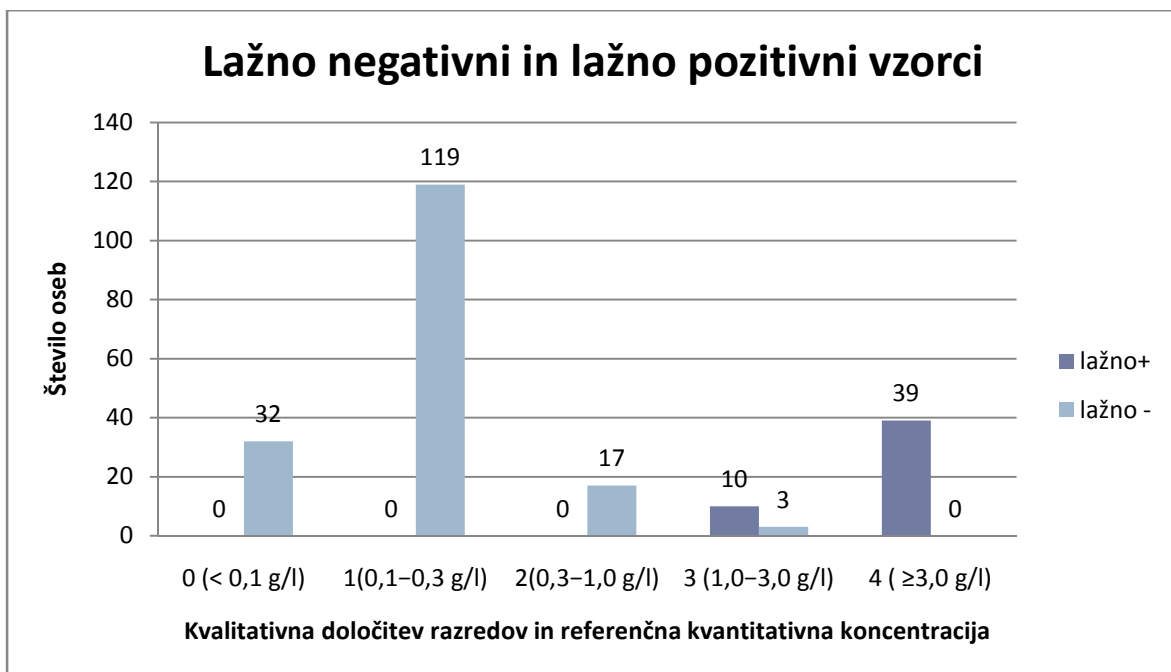
Najprej smo ugotovili, da se referenčna lestvica in aritmetična sredina razredov, ki sta prikazani v tabeli VII, ujemata pri vseh rezultatih, z izjemo razreda 1, kjer je aritmetična sredina 0,43 g/l, kar je izven intervala, ki je 0,1–0,3 g/l.

Glede na referenčne vrednosti smo izračunali lažno negativne in lažno pozitivne rezultate, ki so prikazani v tabeli VII in grafu 4 ter ugotovili:

- v razredu 0 je 32 oseb (48,4%) takšnih, ki so imele koncentracijo več kot 0,1 g/l in so lažno negativne;
- v razredu 1 je 0 oseb (0,0%) takšnih, ki so imele koncentracijo pod 0,1 g/l, torej ni lažno pozitivnih, in 119 oseb (81%) takšnih, ki so imele koncentracijo več kot 0,3 g/l, kar pomeni, da so te osebe za en razred lažno negativne;
- v razredu 2 je 0 oseb (0,0%) takšnih, ki so imele koncentracijo pod 0,3 g/l, torej ni lažno pozitivnih, in 17 oseb (14,9%) takšnih, ki so imele koncentracijo več kot 1 g/l, torej so te osebe za en razred lažno negativne;
- v razredu 3 je 10 oseb (14,0%) takšnih, ki so imele koncentracijo pod 1g/l, torej so lažno pozitivne za en razred, in 3 osebe (4,2%) takšne, ki imajo koncentracijo več kot 3,5 g/l, torej so za en razred lažno negativne;
- v razredu 4 je 62 oseb (61,4%) takšnih, ki so imele koncentracijo pod 3,0 g/l, torej so za en razred lažno pozitivne.

Tabela VIII: Določitev lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov glede na referenčno lestvico

Kvalitativna določitev	0 (<0,1 g/l)	1 (0,1–0,3 g/l)	2 (0,3–1,0 g/l)	3 (1,0–3,0 g/l)	4 (≥3,0 g/l)
Lažno poz.	/	0 (0,0%)	0 (0,0%)	10 (14,0%)	39 (38,6%)
Lažno neg.	32 (48,8%)	119 (81,0%)	17 (14,9%)	3 (4,2%)	/



Graf 4: Grafični prikaz lažno negativnih in lažno pozitivnih vzorcev

5 RAZPRAVA

Proteinurija je stanje povečane količine proteinov v urinu. Edini način, da ugotovimo proteinurijo je, da jo laboratorijsko izmerimo in določimo.

Naša naloga pri delu je bila primerjava kvalitativne in kvantitativne metode določevanja proteinov v urinu. Želeli smo preveriti, kako dobra je določitev z odčitavanjem spremembe intenzivnosti barve napram izmerjenim in točno določenim koncentracijam proteinov v urinu ter kje je tista mejna koncentracija, kjer preide iz negativnega v pozitivno določitev.

Diagnostična uporabnost rezultatov je odvisna od občutljivosti in specifičnosti testa. Občutljivost testa pomeni verjetnost pozitivnega izida testa pri osebah, pri katerih je bolezen prisotna. Občutljivost testa vsebuje tudi lažno negativne rezultate, torej rezultate tistih oseb, ki so v resnici bolne, vendar imajo negativen rezultat. Ti rezultati so največji problem pri diagnostiki bolezni, kajti spregledamo lahko klinično pomemben rezultat. Zato je pri tem v našem primeru potrebna zelo točna metoda za določevanje koncentracije proteinov v urinu.

Specifičnost testa pomeni verjetnost negativnega izida testa pri osebah, ki nimajo bolezni. Specifičnost testa pa ima tudi lažno pozitivne rezultate. Lažno pozitivni rezultati niso tako klinično pomembni, vendar pa je metoda zaradi njih manj točna.

Zanimala nas je primerjava med kvalitativno in kvantitativno metodo. Pri tem smo pri kvalitativni metodi uporabili testne lističe, pri kvantitativni pa biuret metodo. V raziskavo je bilo vključenih 498 oseb, od tega 250 moških in 248 žensk.

Kvalitativen način določevanja nam prek testnih lističev poda rezultat, ali so v vzorcu prisotni proteini ali ne in kakšna je količina le-teh (podani so z vrednostmi 0, 1, 2, 3 in 4). Kvantitativen način določevanja pa nam poda točno določeno koncentracijo proteinov v vzorcu.

Najprej smo glede na kvalitativno določitev vzorce razvrstili v razrede 0, 1, 2, 3 in 4. V razredu 0 je bilo 66 oseb (13%), v razredu 1 je bilo 146 oseb (29%), v razredu 2 je bilo 114

oseb (22%), v razredu 3 (1,0–3,0 g/l) je bilo 71 oseb (14%), v razredu 4 (> 3,0 g/l) pa je bila 101 oseba (20%).

Glede na naše kvalitativne določitve smo primerjali podatke tudi s kvantitativnimi določitvami, da smo ugotovili najmanjšo in največjo razmejitveno vrednost, pri kateri je še vedno isti določeni razred. Tako smo dobili rezultate:

da je v razredu 0 najmanjša kvantitativno določena vrednost <0,03 g/l in največja 0,28 g/l, v razredu 1 je najmanjša kvantitativno določena vrednost 0,12 g/l in največja 1,37 g/l, v razredu 2 je najmanjša kvantitativno določena vrednost 0,40 g/l in največja 3,46 g/l, v razredu 3 je najmanjša kvantitativno določena vrednost 0,78 g/l in največja 4,24 g/l, v razredu 4 je najmanjša kvantitativno določena vrednost 1,25 g/l in največja 14,60 g/l.

Glede na te podatke opazimo, da imajo posamezne kvalitativne določitve zelo velik razpon mejnih vrednosti in se med seboj pokrivajo. Tako je razmejitvena vrednost med kvalitativno določitvijo 0 in 1 med 0,12 g/l in 0,28 g/l, ki je bila izmerjena kvantitativno.

Pri teh rezultatih nas zmoti dejstvo, da naj bi bila občutljivost reagenčnega traku pri 0,1 g/l, tako pa lahko tu vidimo, da so pri kvantitativnem načinu imeli nekateri vzorci izmerjeno koncentracijo tudi do 0,28 g/l, pa vendar nam je samo merjenje pri kvalitativnem načinu pokazalo negativen rezultat. Takšni rezultati nas pogosto pripeljejo do napačnih in lažno negativnih rezultatov, ki so seveda pri določenih diagnozah zelo problematični.

Primerjali smo, kako so te vrednosti razporejene v območju aritmetične sredine s 95-odstotnim intervalom $\pm 2SD$. Glede na $AS \pm 2SD$ so rezultati naslednji: v razredu 0 ($0,103 \pm 0,120$) je 63 oseb v 95-odstotnem intervalu $\pm 2SD$, 3 osebe (4,5%) pa so bile izven intervala; v razredu 1 ($0,430 \pm 0,306$) je 143 oseb v 95-odstotnem intervalu $\pm 2SD$, 3 osebe (2,1%) pa so bile izven intervala; v razredu 2 ($0,833 \pm 0,712$) je 110 oseb v 95-odstotnem intervalu $\pm 2SD$, 4 osebe (2,6%) pa so bile izven intervala; v razredu 3 ($1,399 \pm 1,238$) je 68 oseb v 95-odstotnem intervalu $\pm 2SD$, 3 osebe (4,2%) pa so bile izven intervala; v razredu 4 ($3,682 \pm 3,744$) je 97 oseb v 95-odstotnem intervalu $\pm 2SD$, 4 osebe (4%) pa so bile izven intervala.

Iz rezultatov je razvidno, da so podatki zelo primerno razpršeni in da ni večjih odstopanj od povprečne vrednosti, tako da so skoraj vsi rezultati v 95-odstotnem intervalu $\pm 2SD$.

Sama standardna deviacija je največja pri razredu 4, kjer je tudi zelo velika razpršenost rezultatov, ki so med 1,25 g/l in 14,6 g/l.

Zanimalo nas je, koliko je takšnih rezultatov, ki so lažno negativni, ki smo jih torej kvalitativno določili kot negativne, pri kvantitativni določitvi pa so bili pozitivni in tako naprej v višje razrede.

Glede na naša območja razmejitve razredov smo izračunali še lažno pozitivne rezultate in lažno negativne rezultate. Dobili smo naslednje rezultate: v razredu 0 je kvalitativno takšnih, ki imajo vrednost več kot 0,12 g/l, 31 oseb (47,0%) in so lažno negativne; v razredu 1 je takšnih, ki so imele vrednost več kot 0,40 g/l, 85 oseb (58,2%) in so lažno negativne; v razredu 2 je takšnih, ki so imele vrednosti večje kot 0,78 g/l, 49 oseb (42,9%) in so lažno negativne; v razredu 3 je takšnih, ki so imele vrednost več kot 1,25 g/l, 39 oseb (55,0%) in so lažno negativne; v razredu 4 so takšne, ki so imele vrednost več kot 7,2 g/l, 4 osebe (4,0%) in imajo zelo povečano količino proteinov v urinu.

Sklepamo lahko, da je kvalitativno določevanje nasproti kvantitativnemu zelo različno ocenjeno. Lahko opazimo, da je veliko rezultatov lažno negativnih, kar je slabo predvsem pri rezultatih, ki so kvalitativno določeni kot negativni z 0, kajti zelo hitro lahko spregledamo klinično pomemben rezultat. Tudi pri vseh ostalih, ki so za en razred lažno negativni, je to lahko neugodno. Največje odstopanje je pri kvalitativnem razredu 1, kjer je veliko rezultatov, ki bi lahko bili v razredu 2. Sledi razred 3, nato razred 0 in razred 2 ter nazadnje razred 4.

Naše rezultate smo nato primerjali z referenčno lestvico, ki je prikazana v tabeli VII.

Pri referenčni skali smo naprej pogledali ujemanje skale in aritmetične sredine. Ugotovili smo, da se referenčne vrednosti in aritmetična sredina pri vseh ujemajo, z izjemo razreda 1, kjer je aritmetična sredina 0,43 g/l, kar je izven intervala, ki je določen z vrednostjo 0,10–0,30 g/l. Odstopanje od referenčne vrednosti je pri razredu 1 veliko, zato lahko nadalje pričakujemo tudi odstopanja pri lažno negativnih in lažno pozitivnih rezultatih.

Glede na referenčne vrednosti smo ugotovili naslednje: v razredu 0 je 32 oseb (48,4%) takšnih, ki so imele koncentracijo več kot 0,1 g/l in so rezultati lažno negativni; v razredu 1

je 0 oseb (0,0%) takšnih, ki so imele koncentracijo pod 0,1 g/l, torej ni lažno pozitivnih rezultatov, in 119 oseb (81,0%) takšnih, ki so imele koncentracijo več kot 0,3 g/l, kar pomeni, da so rezultati za en razred lažno negativni; v razredu 2 je 0 oseb (0,0%) takšnih, ki so imele koncentracijo pod 0,3 g/l, torej ni lažno pozitivnih rezultatov, in 17 oseb (14,9%) takšnih, ki so imele koncentracijo več kot 1 g/l, torej so rezultati za en razred lažno negativni; v razredu 3 je 10 oseb (14,0%) takšnih, ki so imele koncentracijo pod 1 g/l, torej so rezultati lažno pozitivni za en razred, in 2 osebi (2,8%) takšni, ki sta imeli koncentracijo več kot 3,5 g/l, torej sta rezultata za en razred lažno negativna; v razredu 4 je 57 oseb (56,4%) takšnih, ki so imele koncentracijo pod 3,5 g/l, torej so rezultati za en razred lažno pozitivni.

Tudi pri tej določitvi smo opazili, da je veliko odstopanje od referenčnih vrednosti. Največje odstopanje je ponovno pri razredu 1, tako da je veliko lažno negativnih rezultatov za en razred, kar 81,0%. Ta rezultat sovпада tudi z aritmetično sredino razreda, ki je 0,43 g/l, kar je izven referenčne določitve, ki je za razred 1 med 0,1–0,3 g/l. Že prej smo omenili, da bo odstopanje aritmetične sredine od referenčne lestvice pri razredu 1 imelo vpliv pri lažno negativnih rezultatih, kar smo z rezultati tudi potrdili.

Veliko odstopanje je bilo tudi pri kvalitativni 0, kar (48,8%), kjer je tudi aritmetična sredina na meji, torej 0,1 g/l. Tudi tukaj je veliko odstopanje, ki pa je mogoče še bolj pomembno, kajti tu je meja med negativnim in pozitivnim rezultatom. Pomembno pri tem je, da imamo pri dveh merjenjih za določen parameter čim bolj točne in podobne rezultate z malo odstopanji. Tako se lahko zanesljivo izognemo lažno negativnim rezultatom, ki so velikokrat velik problem.

Ker sta obe meritvi opravljeni avtomatizirano, lahko iz tega izločimo človeško napako. Možna pa je razlika med aparaturami, ki izvajajo določene meritve parametrov. Iz rezultatov opazimo določena odstopanja med obema meritvama. Ugotovimo lahko, da je samo določevanje s testnimi lističi z ocenjevanjem spremembe barve manj točno kot pa natančno določanje koncentracije proteinov v urinu –kvalitativna metoda nam poda veliko lažno negativnih rezultatov.

Glede na naše rezultate lahko trdimo, da je kvalitativna metoda zelo odstopajoča metoda v primerjavi s kvantitativno. Ker lahko proteinurijo dokažemo samo z laboratorijskim

testiranjem, moramo temu primerno najti metodo, ki bo najbolj prikazovala določene vrednosti. Torej je uporaba diagnostičnih rezultatov, dobljenih s kvalitativno metodo, manj zanesljiva kot pa kvantitativna določitev s točno določenimi koncentracijami.

6 SKLEP

Primerjali smo kvalitativno in kvantitativno metodo določevanja proteinov v urinu in njuno uporabnost rezultatov. Kvalitativno smo določali s testnimi lističi, pri čemer so bili rezultati razvrščeni v razrede 0, 1, 2, 3 in 4. Pri kvantitativnem merjenju, ki je temeljijo na principu spektrofotometrije, pa smo dobili točne koncentracije proteinov v urinu. Pri računanju smo uporabili referenčno lestvico, ki smo jo vzeli iz literature, z naslednjimi vrednostmi: za razred 0 $< 0,1$ g/l, za razred 1 $0,1-0,3$ g/l, za razred 2 $0,3-1,0$ g/l, za razred 3 $1,0-3,0$ g/l in za razred 4 $\geq 3,0$ g/l.

Glede na naše merjenje smo ugotovili, da je prehod iz negativnega v pozitivno stanje med $0,12$ g/l in $0,28$ g/l. Aritmetična sredina kvalitativnega razreda 0 je $0,10$ g/l, kar sovpada z občutljivostjo reagentnega traku, ki je $0,10$ g/l.

Kvalitativno določanje ima v primerjavi s kvantitativnim določanjem največ napak pri določanju razreda 0 in 1. Pri razredu 1 je kar 81% takšnih rezultatov, ki so določeni za en razred manj, torej so lažno negativni. Ta rezultat sovpada tudi z aritmetično sredino razreda, ki je $0,43$ g/l, kar je izven referenčne določitve, ki je za razred 1 med $0,1-0,3$ g/l.

Kvalitativna metoda, ki nam poda samo rezultate, ocenjene z 0, 1, 2, 3 in 4, je pri nekaterih določitvah manj zanesljiva kot pa kvantitativna metoda, ki nam poda točno določene koncentracije.

7 LITERATURA

1. Štiblar Martinčič D., Histologija, univerzitetni učbenik, Maribor 2010
2. Štiblar Martinčič D., Cor A., Cvetko E., Marš T., Legan M., Anatomija, histologija, fiziologija, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana 2008, 2.izdaja, 151–157
3. Zorc Pleskovič R., Gonšak Dahmane R., Milutinovič Živin A., Histologija, Univerza v Ljubljani, Visoka šola za zdravstvo, Ljubljana 2006
4. Hribernik M.,
Anatomijaledvic,http://www.medrazgl.si/e107_files/public/datoteke/mr05_3_01.pdf,
junij 2011
5. Plut Š., Anatomija in fiziologija človeka, DZS, Ljubljana 2002, 167–173
6. Barovič V., Patologija, patološka fiziologija in osnove interne medicine, DZS, Ljubljana 2004, 193–199
7. Laposata M., Laboratory Medicine: The Diagnosis of Disease in the Clinical Laboratory, McGraw Hill Medical, 2010, 359–369
8. Kocijančič A., Mrevlje F., Interna medicina, DZS, Ljubljana 2008, 737–747
9. Boyer R., Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana 2005, 69–124
10. Bavec A., Lanišnik Rižner T., Goličnik M., Makovec T., Ravnik Glavač M., Rozman D., Izbrana poglavja iz biokemije 1, Gradivo za seminarje, Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana 2010, 62–70
11. Kaplan-Pavlovčič S., Proteinurija, Bolezni ledvic in arterijska hipertenzija, 2. dopolnjena izdaja, Klinični oddelek za nefrologijo, interna klinika, Klinični center 2003, 11–21, 57–60
12. Scharer K., Proteinuria, Slovenska pediatrija, 1995, 130–133
13. National Kidney&Urologic Disease Information Clearinghouse (NKUDIC),
Proteinuria, <http://kidney.nidk.nih.gov/kudiseases/pubs/proteinuria/>, junij 2011
14. Hojs R., Bevc S., Ekart R., Gorenjak M., Puklavec L., Ocena glomerularne filtracije – Primerjava serumskega kreatinina, serumskega cistatina C in izračun očistka kreatinina, Zdravniški vestnik, Slovensko zdravniško društvo, Ljubljana 2006, 455–462
15. Zorc M., Petrovič D., Cor A., Legan M., Milutinovič Živin A., Štiblar martinčič D., Vraspir Porenta., Zorc Pleskovič R., Histologija, učbenik, Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, Ljubljana 2005, 199–206