

Albumin v moči – je nutná zásadní změna metody stanovení?

Friedecký B.¹, Palička V.²

¹SEKK, spol. s r. o., Pardubice

²Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN, Hradec Králové

SOUHRN

Měření albuminu v moči, zásadně důležité zejména v diagnostice komplikací diabetu, se nachází ve stavu významných změn. Jejich příčinou je zjištění, že část albuminu ztrácí při průchodu ledvinnými tubuly imunoreaktivitu následkem proteolýzy a s ní související změnou konformace albuminových molekul. Následkem toho doposud obecně používané imunochemické metody poskytují s velkou pravděpodobností nesprávně nízké výsledky. Snížení výsledků je přitom podstatně výraznější u diabetiků než u osob bez diagnostikovaného diabetu. Toto stručné sdělení shrnuje možné příčiny jevu a uvádí možnosti řešení. Tím je patrně zavedení separačních metod a následné vytváření referenčního systému, zejména certifikovaných referenčních materiálů a ustanovení nových hodnot referenčních intervalů. Uvádíme i alternativní názory, které spatřují příčinu pozorovaných jevů spíše v nedokonalosti použité HPLC metody než ve změnách konformace a imunoreaktivity. V každém případě lze očekávat při měření albuminu v moči řadu změn, studií a nových poznatků.

Klíčová slova: albumin v moči, imunochemické stanovení, HPLC, imunoreaktivita, systematické diference.

SUMMARY

Friedecký B, Palička V.: Urinary albumin: Change in measurement?

Urinary albumin measurement is very important laboratory examination, namely for diagnosis of renal complications in diabetes mellitus. The methods of measurement of urinary albumin are at present under intensive development and revision. Many recent communications describe that urinary albumin loses after passage through kidneys the part of its immunoreactivity. This should be the reason of obtaining the falsely lower results of urinary albumin obtained by immunochemical methods in comparison with HPLC. The decrease of immunochemical results is bigger in diabetic patients than in non diabetic subjects. Our brief communication deals with possible reasons of this phenomenon and also with its consequences for diagnosis. This problem can be resolved by introduction of new separation methodology instead of immunochemistry. Then will follow creating the certified reference materials and establishing the new reference values. We also introduce alternative approach to the explanation of urinary albumin problem, based on the non-specificity of HPLC method.

Key words: urinary albumin, immunochemical methods, HPLC, immunoreactivity, systematic differences.

V letech 2000 a 2002 [1, 2] publikovali australští autoři sdělení, která by mohla od základu změnit pohled na výsledky měření albuminu v moči diabetiků. Podstatou sdělení byl fakt, že určitý podíl albuminu při průchodu renálními proximálními tubuly je proteolyticky štěpen na několik fragmentů o relativní molekulové hmotnosti 500–15 000, zatímco intaktní albumin vykazuje molekulovou hmotnost 66 500. Za štěpení odpovídají lysozomální proteolytické enzymy. Tyto fragmenty nevykazují vždy stejnou imunoreaktivitu. Fragmenty močového albuminu byly pozorovány už v roce 1995 japonskými autory pomocí Western blottingu [3]. U zdravých lidí se předpokládá, že peptidy odvozené od albuminu mohou tvořit i více než 90 % celkového množství albuminu v moči; intaktní molekuly albuminu pak méně než 10 %. Zajímavé je, že zatímco u nediabetiků nebyly mezi HPLC a imunochemickými metodami zjištěny významné rozdíly, u diabetiků bylo zjištěno, že 33 % ze souboru 97 pacientů vykazovalo normální hodnoty albuminu v moči metodou RIA, ale zvýšené hodnoty metodou HPLC [4]. To znamená, že fragmentace albuminu a následný výskyt imunochemicky nereaktivního albuminu se vyskytuje významně častěji u diabetiků, než u nediabetiků. Comper et al. tvrdí, že detekce zvýšených hladin imunochemicky nereaktivního albuminu v moči metodou HPLC umožní diagnostikovat diabetickou nefropatii v průměru o 3,9 roku dříve u diabetu I. typu a o 2,4 roku u diabetu II. typu [5].

Ještě závažnějším důsledkem je podle australských autorů fakt, že přítomnost fragmentů mění konformaci určité části albuminu, která ztrácí imunoreaktivitu, i když velikost molekuly zůstává nezměněna („nicked albumin“). Konkrétně by mělo docházet ke ztrátě části disulfidových můstků. Výsledkem je, že metodou HPLC se v řadě vzorků moči naměří významně vyšší hodnoty albuminu než metodami, které jsou založené na imunochemické detekci a nemusí tedy zachytit všechny součásti toho, co označujeme jako „albumin v moči“. V roce 2004 charakterizovali Osicka (podle křestního jména Tanya jde patrně o dámu) a Comper imunochemicky nereaktivní albumin v močích diabetiků elektroforetickou metodou PAGE v kombinaci s HPLC a patrně experimentálně prokázali, že metodou HPLC se skutečně stanovuje směs imunoreaktivní a neimunoreaktivní formy albuminu, zatímco metoda RIA stanovuje jen imunoreaktivní podíl [6]. Metodami ELISA, PAGE a CE (kapilární elektroforéza) stanovili, že případná kontaminace frakce albuminu při metodě HPLC jinými proteiny, přítomnými v moči, je menší než 1%. Významnou skutečností je rovněž to, že všechny dosud používané protilátky pro imunochemickou detekci albuminu v moči jsou vyráběny proti albuminu sérovému a ne močovému.

Situace se zdála být jasná, avšak zcela recentně byla publikována další práce o stanovení albuminu v moči metodou HPLC, jejíž autoři došli k diametrálně odliš-

ným závěrům [7]. Podle nich nepůsobí zvýšené hodnoty albuminu získané metodou HPLC ve srovnání s imunochemickými metodami imunochemicky nereaktivní podíl albuminu, ale koeluce některých močových proteinů z kolony. Konkrétně mají v podezření orosomukoid, transferrin a inhibitor proteináz alfa 1. Metoda HPLC není tedy podle nich schopna rozlišit albumin od některých jiných močových proteinů a poskytuje falešně zvýšené výsledky.

Jak je tomu doopravdy, zatím nevíme. Pro Australany a jejich imunochemicky nereaktivní albumin svědčí několik závažných faktů. Výsledky, dosažené pomocí elektroforézy PAGE [6], korelovaly mnohem těsněji s metodou HPLC než s imunochemickým měřením. Studie dalších autorů, provedené s použitím velkých souborů pacientů, potvrdily vyšší hodnoty albuminu stanovené metodou HPLC ve srovnání s imunochemickými metodami [8, 9]. Závěry Sviridova et al. existenci imunochemicky nereaktivního albuminu se změněnou (nicked) konformací silně zpochybňují. V každém případě je práce Sviridova et al. cenná tím, že přistupují v případě albuminu k poněkud mýtizované metodě HPLC s opatrností a kritičností a zkoušejí, zda i ona nemá slabiny.

Peters ve svých dvou editorialech, věnovaných problému měření albuminu v moči [10, 11], utilitaristicky uzavírá, že prioritním cílem je prověřit, zda používané metody měří skutečně správně celkový albumin v moči, a nabídnout takové metody praxi. Výzkum fragmentace albuminu a ztráty jeho imunoreaktivity je velmi důležitý, ale podle něj pro péči o diabetiky ve druhém sledu. Je signifikantní, že pracovní skupina pro standardizaci měření albuminu v moči, ustavená IFCC, si jako nejbližší úkoly stanovila:

- a) definovat albumin v moči (!);
- b) zjistit, zda se liší formy albuminu v moči při různých klinických stavech – diabetu, kardiovaskulárních chorobách, hypertenzi atd.;
- c) chemickou a imunochemickou definici albuminu v moči;
- d) návrh doporučeného analytického postupu.

Co by mělo následovat, pokud se teorie o ztrátě části imunoreaktivity albuminu v moči nezvratně potvrdí? Pravděpodobně náhrada imunochemických metod jinými – separačními. Metoda HPLC, s jejíž pomocí byla celá kauza otevřena, nepřichází pro rutinní analýzu v úvahu. Jako možné optimální řešení se jeví elektroforéza, především elektroforéza kapilární. Následovaly by další standardní kroky: tvorba referenčního materiálu, stanovení nových referenčních intervalů. V každém případě jde o zcela nový a vzrušující problém laboratorní medicíny.

Literatura

1. **Osicka, T. M., Houlihan, C. A., Chan, J. G., Jerums, G., Comper, W. D.** Albuminuria in patients with type 1 diabetes is directly linked to changes in the lysozyme mediated degradation of albumin during renal passage. *Diabetes*, 2000, 49, p. 1579–1584.
2. **Russo, L. M., Bakris, G. L., Comper, W. D.** Renal handling of albumin: a critical review of basic concepts and perspective. *Am. J. Kidney Dis.*, 2002, 39, p. 899–919.
3. **Yagame, M., Suzuki, D., Jinde, K., Kyano, N., Naka, R. et al.** Urinary albumin fragments as a new clinical parameter for the early detection of diabetic nephropathy. *Intern. Med.*, 1995, 34, p. 463–468.
4. **Comper, W. D., Osicka, T. M., Jerums, G.** High prevalence of immuno-unreactive albumin in urine of diabetic patients. *Am. J. Kidney Dis.*, 2003, 41, p. 336–342.
5. **Comper, W. D., Osicka, T. M., Clark, M., MacIssac, R. J., Jerums, G.** Earlier detection of microalbuminuria in diabetic patients using a new urinary albumin assay. *Kidney Int.*, 2004, 65, p. 1850–1855.
6. **Osicka, T. M., Comper, W. D.** Characterization of immunochemically nonreactive urinary albumin. *Clin. Chem.*, 2004, 50, p. 2286–2291.
7. **Sviridov, D., Meilinger, B., Drake, S. K., Hoehn, G. T., Hortin, G. L.** Coelution of other proteins with albumin during site-exclusion HPLC: Implications for analysis of urinary albumin. *Clin. Chem.*, 2006, 52, p. 389–397.
8. **Brinkman, J. W., Bakker, S. J., Gansevoort, R. T., Hillege, H. L., Kerna, I. P. et al.** Which method for quantifying urinary albumin excretion gives what outcome? A comparison of immunonephelometry with HPLC. *Kidney Int. Suppl.*, 2004, 92, p. 69–75.
9. **Owen, W. E., Roberts, W. L.** Performance characteristics of an HPLC assay for urinary albumin. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2005, 124, p. 219–225.
10. **Peters, T. Jr.** New form of urinary albumin in early diabetes. *Clin. Chem.*, 2004, 50, p. 2238–2239.
11. **Peters, T. Jr.** How should we measure the albumin in urine? *Clin. Chem.*, 2006, 52, p. 555–556.

Do redakce došlo 27. 4. 2006.

Adresa pro korespondenci:
RNDr. Bedřich Friedecký, Ph.D.
SEKK, spol. s r. o.
Bartolomějská 90
530 02 Pardubice
e-mail: friedecky@sekk.cz