PYROGALLOL RED MOLYBDAT BOYA BAĞLAMA YÖNTEMİ İLE İDRARDA TOTAL PROTEİN ÖLÇÜMÜ

1.Giriş ve Amaç

1695 yılında Danimarkalı araştırmacı Frederik Dekker tarafından proteinüri tanımlandığından beri bu konudaki çalışmalar hız kazanmıştır (1). Bugün proteinüri, böbrek hastalıklarına eşlik eden en önemli patofizyolojik bulgulardan birisidir (2). Yapılan çalışmalara göre sadece renal hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü olmakla kalmaz, aynı zamanda diabetik nefropati ve kardiyovasküler hastalık mortalitesi için de iyi bir göstergedir (3).

Proteinürinin patofizyolojik mekanizması ve klinik öneminin daha iyi anlaşılması ile idrarda kantitatif protein ölçümüne olan ilgi artmıştır. İdrarla atılan total protein miktarının kesin olarak ölçülmesi, tanı ve tedavinin takibinde artık büyük önem taşımaktadır. İdrarda total protein ölçümü, laboratuvar analizleri arasında doğruluk ve tekrarlanabilirlik açısından en problemli olanlardan biridir (4). Normal idrardaki proteinlerin çok düşük miktarda ve kompleks bir karışım halinde bulunması, total protein ölçümünde sorun yaratır. İdrarla atılan total protein miktarının kantitatif ölçümü için birçok yöntem geliştirilmiş fakat çeşitli nedenlerle tek bir metot, standart bir yöntem olarak geniş kabul görmemiştir (2).

Biz bu çalışmada, striple protein tayininin, idrardaki total protein miktarını göstermedeki etkinliğini tespit etmeye çalışırken, aynı zamanda bütün dünyada kullanımı yaygınlaşan pyragallol kırmızısı metodunu, türbidimetrik trikloroasetik asit ve sülfosalisilik asit yöntemleriyle de karşılaştırdık. Bu yöntemler arasında sensisitivite ve spesifite açısından en uygun olanı belirlemeye çalıştık.

2.Genel Bilgiler

2.1.Proteinürinin tanımı

Organizmanın en önemli yapı taşlarından biri olan proteinlerin idrarda normalden fazla bulunmasına proteinüri denir. İdrarda protein varlığının klinik önemi ile ilgili bazı bulgular Hipokrat tarafından ortaya konmuşsa da proteinüri ilk olarak 1695’de Danimarkalı araştırmacı Frederik Dekker tarafından tanımlanmıştır (1). Proteinürinin nefrotik sendrom ile ilişkili olduğu ise 18. yüzyılda Richard Bright tarafından bulunmuştur. Takip eden yıllarda proteinürinin glomerül ve tübüllerin yapısal bütünlüğündeki değişiklikler için bir gösterge olduğu kabul edilmiş ve glomerüler ve tubüler proteinüri tanımları ortaya atılmıştır (5). Son 20-30 yılda proteinürinin patofizyolojik mekanizmasının ve klinik öneminin anlaşılması için başarılı çalışmalar yapılmıştır (1). Bu çalışmalara göre proteinüri sadece renal hastalık gelişiminde bağımsız bir risk faktörü olmakla kalmaz, aynı zamanda diabetik nefropati ve kardiyovasküler hastalık mortalitesi için de iyi bir göstergedir (3).

2.2. Üriner proteinlerin kaynağı

Normalde idrardaki prteinlerin %50’si plazma proteinlerinden, %50’si ise renal ve üriner sistemden kaynaklanan proteinlerden oluşur (Tablo 2.1) (6). İdrarla atılan proteinler kaynaklarına göre altı gruba ayrılır (1):

1. Plazma proteinleri: Bunlar normal plazma içeriğinde bulunan ve glomerüler filtrasyon ile elimine edilen proteinlerdir. Bu proteinler büyüklüklerine bağlı olarak nefronun glomerüler ve tübüler bölgelerindeki fonksiyonel veya morfolojik değişimlerin göstergeleri olarak kullanılırler. İdrarda atılan plazma proteinleri antikorlar, enzimler, hormonlar, hücre antijenleri, taşıyıcı proteinler ve inhibitörler gibi çeşitli biyokimyasal gruplar şeklindedir (1).
2. Böbrek kaynaklı proteinler: Böbrek hücrelerinin normal metabolizması sonucunda ortaya çıkan proteinlerdir. Bu proteinlerin salınımı, doku hasarı, anormal hücre döngüsü ve fonksiyonel bozukluklardan etkilenebilir. İdrarda bulunan ve molekül ağırlığı albüminden büyük olan proteinlerin çoğu böbrek kaynaklıdır. Böbreklerdeki çeşitli enzimlerin yerleşim bölgeleri farklıdır ve bu da renal lezyonların lokalizasyonuna yardım edebilir. Genel bir kural olarak enzimatik aktivite kortekste en fazla (özellikle proksimal tübüllerde), medullada orta ve papillada en düşük düzeydedir. Pratikte enzümüri özellikle proksimal tübüler hasara duyarlıdır (1).

Bazı böbrek kaynaklı proteinler ise immünoreaktif özellikleri nedeniyle renal antijenler olarak adlandırılırlar. İmmünokimyasal olarak idrarda ölçülebilen renal antijenler, alanin aminopeptidaz, adenozin deaminaz bağlayıcı protein, ligandin (glutatyon-S-transferaz), karbonik anhidraz C ve çeşitli tübüler antijenlerdir. Bunlardan bazıları böbrek dokusuna çok spesifiktir ve en çok bilineni Henle’nin çıkan kolundaki epitelial hücrelerden sentezlenen Tamm-Horsfall glikoproteinidir (1).

1. Ürogenital sistem kaynaklı proteinler: Üriner sistem epitelinden (üreter, mesane, üretra), prostattan veya vajinal sekresyonlardan kaynaklanır (1).
2. Ürogenital sistem dışı dokulardan kaynaklanan proteinler: Hastalıklı veya hasarlı dokulardan salınan proteinler glomerüler filtrata geçecek kadar küçük olabilir. Bunlara en iyi örnek, iskelet kası lezyonlarında idrara atılan myoglobulindir (1).
3. Hamilelelik kaynaklı proteinler: Plasenta veya fetal doku kaynaklı antijenler hamilelerin idrarında görülebilir (1).
4. Tümör kaynaklı proteinler: Kanserli hastaların idrarında çok miktarda protein bulunabilir ve bu proteinler tümör belirtesi olarak (karsinoembriyojenik antijen) kullanılabilirler. Multiple myelomada görülen Bence-Jones proteinürisi bu duruma diğer bir örnektir (1).

Sağlıklı kişilerdeki proteinürinin büyük kısmı Tamm-Horsfall glikoproteini ve ürogenital sistemden dökülen epitellerden kaynaklanan proteinlerden oluşurken plazma proteinleri proteinürilerin sadece %10-20’sini oluşturur. Böbrek hastalıkları ve zedelenmelerinde plazma proteinlerinin proteinürideki oranı artabilir. Nefrotik sendromlu hastalarda ise bu oran %90’a kadar çıkabilir (1).

2.3. Temel üriner prteinlerin özellikleri

2.3.1. Tamm-Horsfall glikoproteini

Tamm-Horsfall glikoproteini (THG) veya üromukoid, Tamm ve Horsfall tarafından1950 yılında idrarda tespit edilen ilk spesifik renal proteindir. Molekül ağırlığı yaklaşık 7000 kDa’dur ve normal idrarda en çok bulunan renal kaynaklı proteindir. THG’nin %30’u karbonhidrattan oluşur. Henlenin çıkan kolundaki epitel hücrelerinin membranlarında bulunur. Çökelme eğilimi olduğundan jel ve silendir oluşumunda rol oynar. THG idrar relatif olarak sabit bir oranda (20-60 mg/gün) atılır. Fakat distal tübül hasarını takiben üriner atılımı artabilir. İdrarda THG agregatlar halinde bulunur (1).

2.3.2. Albumin

Plazmadan idrara geçen majör üriner proteindir. Normal idrardaki konsantrasyonu, diğer yüksek molekül ağırlıklı proteinlerden ortalama 5 kat ve düşük molekül ağırlıklı proteinlerden 50 kat daha fazladır. Bu nedenle idrarda en kolay saptanabilen protein albümindir (1).

Moleküler büyüklüğü (çapı 3,6 nm) ve negatif yüklü olması nedeniyle albümin glomerüler bariyerde etkili bir şekilde tutulur. Buna rağmen glomerüler filtrata geçen düşük miktardaki albüminin %99’u etkili bir şekilde proksimal tubüllerde reabsorbe edilir. Bu nedenle artmış albuminüri, etkilenmiş glomerüler filtrasyona ya da filtre edilen albüminin tübüler transportundaki bir defekte bağlıdır (1).

Masif albuminüri (proteinüri >3,5 g/gün), hipoprtoteinemi ve ödemin birarada bulunması nefrotik sendrom tanısı için yeterlidir. Buradaki albuminüri şüphesiz artmış bir glomerüler atılım ile ilişkilidir. İdrardaki albümin miktarı 0,5 g/gün’den düşükse strip ile tespit edilemez ve mikroalbuminüri adını alır. Mikroalbuminüri, düşük molekül ağırlıklı proteinlerin üriner atılımının artışı ile beraberse muhtemel nedeni albümin reabsorbsiyonunun kısmen ya da tamamen bozulmuş olmasıdır. Düşük molekül ağırlıklı proteinüri olmadan albuminüri varsa glomerüler permeabilite bozulmuştur. Albüminin tübüler reabsorbsiyonunda spesifik bir defekt olması muhtemelen imkansızdır çünkü proteinlerin tübüler reabsorbsiyonu seçici olmayan bir karakterdedir (1).

Albuminüri, renal hemodinamik değişimlere çok hassastır. Birçok durumda idrarla albümin atılımında geçici ve tamamen geri dönebilen yükselmeler görülebilir. Ağır egzersiz, ateş ve ortostatizm bu durumlara örnek olarak verilebilir. Ayrıca albüminin moleküler özellikleri ve renal davranışı bazı sistemik metabolik hastalıklar (diabetes mellitus, asidoz) ve kimyasal maddelerden de (gentamisin) etkilenebilir (1).

2.3.3. Transferrin

Demir taşıyıcı bir protein olan transferrin idrarda albüminden 15 kat daha az bulunur. Moleküler çapı albüminden biraz daha büyüktür (4 nm). Negatif yüklüdür ve elektroforezde beta1 bandına göç eder. Diabetik nefropati ve kadmiyum nefropatisindeki erken glomerüler zedelenmenin gösterilmesinde üriner transferrin oldukça hassas bir göstergedir (1).

2.3.4. Gama Glubulinler

İdrarla atılan başlıca gama globülinler IgG, IgA ve immünoglobulin hafif zincirleridir. Bence Jones proteini gibi monoklonal hafif zincirlerin idrarla atılımının artması genellikle multiple myeloma veya Waldenström makroglubulinemisi gibi neoplastik hastalıklarda görülen fazla yapımın bir göstergesidir. Yaşlılarda idrarda immünglobulin hafif zincirleri normalde de bulunabilir. OgG ise glomerüler proteinürinin seçiciliğinin değerlendirilmesinde kullanılır (1).

2.3.5. Beta2-mikroglobulin

1968 yılında Berggard ve Bearn tarafından tübüler disfonksiyonlu hastaların idrarında bulunan küçük bir proteindir. Moleküler ağırlığı 11,8 kDa ve çapı 1,6 nm’dir. Beta2-mikroglobulin (B2M) hemen hemen bütün çekirdekli hücrelerde sentezlenir ve çekirdek membranlarında class I histokompatibilite antijenlerinin bir komponenti olarak bulunur. Sağlıklı kişilerde idrarla çok az (70-80 µg/gün) B2M atılır. B2M’in tübüler reabsorbsiyon eşiği 5 mg/L’dir ve bu eşik aşıldığında beta2-mikroglobulinüri oluşur. Üriner atılımı renal tübüler zedelenmelerden etkilenir. Kronik kadmiyum zehirlenmesi, Fanconi sendromu, Wilson hastalığı ve rabdomyoliz gibi durumlarda oluşan akut tübüler nekrozlarda idrarla B2M atılımı artar. Ayrıca maligniteler, sistemik inflamatuar olaylar ve AIDS gibi böbrek dışı durumlarda da idrarda B2M görülebilir. Normal şartlarda B2M %99,97 oranında proksimal tübüllerden reabsorbe olduğundan idrarda bulunmasının sensitivitesi çok yüksektir. Üriner B2M tayini, proksimal tübüler hasarın gösterilmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. En önemli dezavantajı asit idrarda stabil olmamasıdır. Üriner pH 5,5’in altına indiğinde B2M hızla yıkılır. Bu yıkım 37°C’de öylesine hızlıdır ki yıkım bazen mesanede tamamlanır. Bu nedenle idrar toplandıktan sonra pH nötralizasyonu bu problemi çözmede başarılı olmaz. B2M proksimal tübüler fonksiyonlar için uygun bir gösterge olduğundan idrar örneğinin alımından birkaç saat önce hastalara oral NaHCO3 verilmelidir. Bu da tarama testleri için uygun ve kolay bir prosedür değildir. Bu nedenle proteolitik yıkıma daha çok dayanıklı olan retinol bağlayıcı protein veya alfa1-mikroglobulin, B2M’in yerine tercih edilmektedir (1).

2.3.6. Retinol Bağlayıcı Protein

Retinol bağlayıcı proteine (RBP) alfa2-mikroglubulin de denir. İlk olarak 1968’de Kanai tarafından plazmada, 1971’de Berggard tarafından idrarda respit edilmiştir. Düşük molekül ağırlıklı (21,4 kDa) bir proteindir ve karaciğer parankim hücrelerinin endoplazmik retikulumunda sentezlenir. A vitamininin alkolik formu olan retinolün karaciğerden hücresel dokulara taşınmasını sağlar. Retinole bağlı iken boyutunun büyük olması nedeni ile idrara geçemez. Serbest RBP ise glomerüler filtrasyon ile plazmadan hızla temizlenir. Daha sonra proksimal tübüler hücrelerde reabsorbe ve katabolize edilir (1).

RBP’nin böbrekteki katabolizması B2M’e çok benzer. Her iki protein de proksimal tübüler hücrelerce %99,97’lik bir etkinlikle reabsorbe edilir. Ayrıca her ikisinin de reabsorbsiyonu renal yetmezlikten aynı derecede etkilenir. Fakat pratikte üriner RBP ölçümü iki nedenle B2M’den daha avantajlıdır. Birincisi, RBP asit idrarda B2M’den daha stabildir ve idrar örneklerinin toplanmasında ön hazırlık gerektirmez. İkincisi, serum RBP seviyesinin böbrek eşiğini aştığı tek klinik durum böbrek yetmezliğidir (1).

2.3.7. Alfa1-mikroglobulin

Alfa1-mikroglobulin (A1M), molekül ağırlığı 26-33 kDa olan bir proteindir. Serumda serbest ve IgA, albümin gibi birkaç yüksek molekül ağırlıklı proteine bağlı olarak bulunur. Temel sentez yeri karaciğerdir. Ağır karaciğer hastalıklarında A1M miktarı azalırken, böbrek yetmezliğinde artar. Bunların yanı sıra birçok inflamatuar ve neoplastik hastalıkta plazma A1M seviyesinde değişimler gözlenebilir. A1M’in renal absorbsiyon etkinliği tam olarak bilinmediğinden tübüler fonksiyonların takibinde B2M ve RBP, A1M’den daha değerlidir (1).

2.3.8. Lizozim

Lizozim veya muramidaz, bakteriyel hücre duvarlarındaki peptidoglikan tabakasının hidrolizini katalizleyen bir enzimdir. Fagositik hücrelerden aktif olarak salınır. Monositik veya monomyelositik lösemi, sarkoidozis ve kronik bakteriyel enfeksiyonlarda serum lizozim seviyesi artar. Üriner lizozim atılımı ise üriner sistem enfeksiyornu, proksimal tübüler hasar ve aşırı yapım durumunda artar. Bu nedenle üriner lizozim seviyesi proksimal tübüler disfonksiyonun gösterilmesinde iyi bir gösterge değildir (1).

Tablo 2.1. Normal idrardaki protein dağılımı (6).

|  | Atılım Miktarı (mg/gün) | İdrarla Atılan  Total Protein İçindeki Yüzdesi (%) |
| --- | --- | --- |
| Plazma proteinleri |  |  |
| Albumin | 5-25 | 15 |
| IgG | 2-7 | 5 |
| IgA | 0,4-3,0 | 5,4 |
| IgM | 0,3 | <0,1 |
| Hafif zincirler | 3,7 | 4,6 |
| B2M | 0,12 | <0,2 |
| Diğer plazma protein ve enzimleri | ~20 | 20 |
| Bütün Plazma Proteinlerinin Toplamı | 40 | 50 |
| Plazma Dışı Proteinler |  |  |
| Tamm-Horsfall proteini | 40 | 50 |
| Diğer böbrek kaynaklı proteinler | <1 | <1 |
| Plazma Dışı Proteinlerin Toplamı | 40 | 50 |
| Total Protein | 80±24 mg/gün | %100 |

2.3.9. Protein 1

Protein 1, molekül ağırlığı 20 kDa olan bir alfa mikroproteindir. Cinsiyete bağımlı bir proteindir ve erkeklerde daha fazla bulunur. Diğer düşük molekül ağırlıklı proteinlergibi protein 1’in de proksimal tübüler harabiyet sonucunda idrardaki seviyesi artar. Protein 1’in biyolojik fonksiyon ve kaynağı henüz tam olarak bilinmemektedir (1).

2.3.10. Sistatin C

Sistatin C, yaklaşık olarak B2M ile aynı molekül ağırlığına sahip olan (13 kDa) basit bir proteindir. Sistein proteinazlarının fizyolojik bir inhibitörüdür (1).

2.3.11. Diğer Proteinler

Beta trace; molekül ağırlığı 31 kDa olan ve çok düşük konsantrasyonlarda bulunan bir glikoproteindir.

Amilazlar; tübüler proteinürilerde atılımı artan düşük molekül ağırlıklı enzimlerdir. Proksimal tübüllerden reabsorbsiyonları B2M ve RBP’den daha az olduğundan, tübüler hasar için sensitiviteleri düşüktür (1).

2.4. Proteinlerin Glomerüler Filtrasyonu ve Tübüler Reabsorbsiyonu

Glomerüller plazma proteinleri için bir ultrafiltre olarak davranırlar (7). Proteinlerin renal elminasyonundaki temel bariyer glomerül kapiller duvarıdır. Bu duvar içten dışa, pencereli epitel, glomerül bazal membranı ve dış epitel hücreleri ile ayaksı çıkıntılardan oluşur (1).

Glomerül bazal membranı, endotelial ve epitelial hücreler arasında bulunan ekstraselüler bir matrikstir. Porlar içeren üç boyutlu ağsı bir yapısı vardır. İnsandaki genişliği 300 nm civarındadır. Ortada lamina densa ve yanlarda lamina rar interna ve eksterna olmak üzere üç tabakadan oluşur. Ayrıca bazal membranın yapısında tip IV kollajen ve proteoglikan heparan sülfat da bulunur. Tip IV kollajenin ağsı yapısı ultrafiltrasyon ünitesinin büyüklük seçiciliğinin sağlanmasında rol oynar. Heparan sülfatın, sülfat grupları ise bazal membrana negatif yük kazandırır ve glomerüler bariyerin yük seçiciliğine katkıda bulunur (1).

Proteinlerin membrandan geçiş miktarı, moleküler büyüklük ve şekil, molekül ağırlığı, iyon yükü, sialik asit konsantrasyonu ve plazma konsantrasyonlarına bağlıdır. Genelde protein büyüklüğü arttıkça glomerüler membrandan geçiş azalır. Normalde IgM gibi yüksek molekül ağırlıklı proteinler (900 kDa) eser miktarlar dışında glomerüler filtrata geçemez. Albumin ise düşük molekül ağırlığı (66 kDa) ve yüksek plazma konsantrasyonu nedeni ile önemli miktarlarda filtrata geçer. Molekül ağırlığı 15-40 kDa olan proteinler daha kolay filtre olur fakat düşük plazma konsantrasyonları nedeniyle filtratta çok düşük miktarda bulunur. Sonuç olarak idrarla atılan proteinin %60’ını albümin oluşturur. Çünkü tübüler hücreler tarafından filtrattan tamamen temizlenemez. Düşük molekül ağırlıklı proteinler ise filtrattan aktif olarak reabsorbe edilir ve proksimal tübüllerde katabolize edilir. Tübüler reabsorbsiyon için proteinlerin spesifik reseptörlerine bağlanması gerekir. Daha sonra proteinler pinositoz ile hücre içine alınır ve lizozomlarda lizozimal enzimlerle hidrolize uğrar. Sonuçta açığa çıkan amino asitler vücut amino asit havuzuna katılır. Normalde idrara çıkan protein miktarı 20-150 mg/dL’dir ve bunun büyük kısmını albümin oluşturur. Geri kalan kısmı ise muhtemelen distal tübüllerden sekrete edilen Tamm-Horsfall proteininden oluşur. Bu nedenle glomerüler permeabilite artışının ilk göstergesi idrardaki albümin miktarının artmasıdır. Daha sonra büyük molekül ağırlıklı proteinler idrarda görülmeye başlar. Düşük molekül ağırlıklı proteinlerin daha fazla görülmesi tübüler reabsorbsiyonun bozulduğunu gösterir (1).

2.5. Proteinüri Tipleri

2.5.1 Glomerüler Proteinüri

En sık görülen ve prognozu en ciddi olan proteinüri tipidir (7). Normalde yüksek molekül ağırlıkları nedeniyle idrara geçmeyen proteinlerin, glomerüler bazal membran bütünlüğünün bozulması ile idrarla atılımının artmasına bağlıdır (8). Bazal membrandaki yapısal değişimler, glomerüler anyon kaybı, renal kan akımının azalması gibi hemodinamik değişimler ve majör plazma proteinlerindeki yük kaybı veya yapısal bozukluklar bu bariyerin bütünlüğünün bozulmasında etkilidir (1).

Erken selektif glomerüler proteinüride artıştan sorumlu olan proteinler tipik olarak albümin (>%80) ve transferrindir. Glomerüler lezyonlar ciddileştikçe membran seçiciliğini kaybeder ve immünglobulinler de dahil olmak üzere her boyutta protein idrara geçebilir (8). Hastalık çok ilerlediğinde glomerüller bozulur, proteinüri azalır ve böbrek yetmezliği gelişir (7). Diabetes mellitus, amyloidozis, disglobulinemi ve kollajen doku hastalıklarında glomerüler bazal membran zedelenir ve proteinüri görülebilir. Ayrıca dolaşımda civa ve eroin gibi toksik ajanların bulunması da glomerüler bütünlüğü bozabilir (Tablo 2.2.) (8).

Glomerüler disfonksiyonun en erken belirtisi mikroalbuminüri varlığıdır. Normal üriner albümin atılımı <20 µg/dk veya <30 mg/gün’dür. Mikroalbuminüri deyimi, idrarda strip ile tayin edilemeyen fakat normalden fazla bulunan albümin konsantrasyonları için kullanılır (8). Son çalışmalara göre özellikle tip I diabetli hastalarda mikroalbuminüri nefropatiden önce gelir. Mikroalbuminüriden nefropatiye ilerleme, kan glukozu ve kan basıncının etkili tedavisi ile geciktirilebilir. Bu nedenle bütün diabetiklerin mikroalbuminüri açısından sürekli kontrolü önerilmektedir (9). Ayrıca tedavinin etkinliği de atılan protein miktarı ölçülerek takip edilebilir (6, 8).

Glomerüler prteinürilerde idrarla atılan protein miktarı 15 mg/gün ile 20 g/gün arasında değişebilir. 3,5 g/gün’ün üzerindeki bir proteinüri sıklıkla nefrotik proteinüri olarak adlandırılır. Bu sınırın altındaki miktarlar ise nonnefrotik proteinüriler olarak değerlendirilir (6).

2.5.2. Tübüler Proteinüri

Normalde renal tübüllerce reabsorbe edilen düşük molekül ağırlıklı proteinlerin (B2M, RBP, A1M, ribonükleaz, lizozim, insülin vb.) atılımı ile oluşur (3). Proteinlerin tübüler reabsorbsiyonunun temel olarak proksimal tübülde oluştuğu birçok morfolojik çalışma ile gösterilmiştir. Proteinlerin moleküler yapısı ne olursa olsun, reabsorbsiyonlarını sağlayan mekanizmalar ve proksimal tübüler hücrelerdeki yıkımları temelde aynıdır. Ayrıca proteinlerin tübüler reabsorbsiyonunun seçici olmadığı kabul edilmektedir. Fakat tübüler proteinürilerde sadece düşük molekül ağırlıklı proteinlerin atılımı artmaktadır. Bunun nedeni, tübüllerdeki protein reabsorbsiyon etkinliğinin değişken olmasıdır. B2M ve RBP’nin tübüllerdeki reabsorbsiyonu %99,97 iken, albümininki %90-99’dur. Albumin %99 reabsorbe edildiğinde bile proksimal tübüler fonksiyonlardaki %10’luk bir düşüş, albüminin atılımını 10 kat, B2M ve RBP’ninkini ise 300 kat arttırır (1).

Düşük molekül ağırlıklı proteinlerin yarı ömrü çok kısadır (B2M ve RBP’ninki 2 saat) ve bu proteinlerin çoğunda temel katabolizma bölgesi böbreklerdir. Küçük moleküllerin dolaşımdan temizlenmesindeki sınırlayıcı olay böbreklerdeki filtrasyonlarıdır ve bu da glomerüler filtrasyon hızı ile ilişkilidir. Glomerüler filtrasyon hızı azaldığında düşük molekül ağırlıklı proteinlerin serum seviyesi artar (1). Tübüler hastalıklardaki protein atılımı nadiren 2 g/gün’ü aşar (3). Ayrıca tübüler proteinüri genellikle glomerüler proteinüri ile beraber bulunduğu gibi tek başına da görülebilir. Strip yöntemi albümine hassas olduğundan basit tübüler proteinüriyi tespit etmek için daha spesifik testler gereklidir (7).

Akut tübüler proteinüri, yanık, akut pankreatit, ağır metal zehirlenmesi ve bazı nefrotoksik ilaçlar nedeniyle oluşabilir. Bu hastalıklarda görülen proteinüri yavaşça düzelirken, kronik tübüler proteinüri genelde geri dönüşümsüzdür. Fanconi sendromu, siroz, sarkoidozis, kadmiyum zehirlenmesi ve fenasetin, kronik tübüler proteinüriye neden olabilir. Renal allograft rejeksiyonunun takibi, aminoglikozid ve kadmiyum toksisitesi ve kronik pyelonefrit tanısı gibi bazı durumlarda ise hafif tübüler proteinüri, progresif böbrek hasarının tek göstergesi olabilir (7). Tübüler proteinürilerde idrarla atılan protein miktarı genelde günde 150 mg-2 g arasındadır (6).

Tablo 2.2 Patolojik proteinüri nedenleri (6).

| Glomerüler proteinüri |
| --- |
| Primer glomerüler hastalıklar |
| Minimal değişim hastalığı |
| Mezengial proliferatif glomerülonefrit |
| Fokal ve segmental glomerüloskleroz |
| Membranöz glomerülonefrit |
| Mazangiokapiller glomerülonefrit |
| Fibriller glomerülonefrit |
| Kresentrik gşomerülonefrit |
| Sekonder glomerüler hastalıklar |
| İlaçlar (merküri, altın bileşikleri, eroin, penisillamin, kaptopril, lityum) |
| Allerjenler |
| Enfeksiyonlar |
| Neoplastik hastalıklar |
| Multisistem hastalıkları (SLE, amyloidozis) |
| Heredofamilier hastalıklar (diabetes mellitus, Alport sendromu, Fabry hastalığı) |
| Diğerleri (transplant rejeksiyonu, reflü nefropatisi, gebelik toksemisi) |
| Diğer glomerüler proteinüriler (egzersiz sonrası, ortostatik, febril) |
| Tübüler Proteinüri |
| Toksin ve ilaçlar |
| Endojen |
| Hafif zincirler |
| Lizozim (myelomonositik lösemi) |
| Eksojen |
| Merküri |
| Kurşun |
| Kadmiyum |
| Süresi geçmiş tetrasiklin |
| Arjinin veya lizin infüzyonu |
| Tübülointersitisiel hastalıklar (özellikle proksimal nefronu ilgilendiren) |
| Lupus eritamatozus |
| Akut hipertansif intersitisiel nefrit |
| Akut bakteriyel pyelonefrit |
| Obstrüktif üropati |
| Kronik intersitisiel nefrit (Sjögren sendromu, Balkan nefropatisi, tübülointersitisiel nefrit) |
| Fankoni sendromu |
| Taşma proteinürisi |
| Multiple myeloma |
| Hafif zincir hastalığı |
| Amyloidozis |
| Hemoglobinüri |
| Myoglobinüri |
| Pankreas ve kolon kanserleri |
| Postrenal proteinüri |
| Akut üriner sistem enfeksiyonu |
| Üroepitelial tümörler |

2.5.3. Taşma Proteinürisi

Dolaşımla böbreklere gelen ve glomerüler filtrata geçen protein miktarı çok fazla olduğundan tübüllerin reabsorbsiyon kapasitesi yetersiz kalır (8). Hemoglobinüri, myoglobinüri ve multiple myelomada artmış olan immünglobulin hafif zincir konsantrasyonuna bağlı olarak oluşan Bence-Jones proteinürisi bu tip proteinürinin örnekleridir (7).

2.5.4. Postrenal Proteinüri

Üriner sistemdeki protein sekresyonlarının artışına bağlıdır. Genelde inflamasyon veya malignitenin büyüklük veya yayılımı ile orantılıdır. İdrarla atılan protein miktarı genelde 1 g/gün’den azdır (7).

2.5.5. İzole Proteinüriler

Sağlıklı bireylerde herhangi bir renal ya da sistemik hastalık bulgusu yokken, idrarla atılan protein miktarının artmış olmasıdır. İzole proteinüriler genelde rutin idrar tetkiki sırasında tesadüfen farkedilir ve prevalansı %0,6 ile %10,7 arasında değişir. Bu bireylerde idrar mikroskobisi de tamamen normaldir ve idrarla atılan protein miktarı genelde 2 g/gün’ün altındadır (10). İzole proteinüri paternleri sabit değildir. Zaman ve tedavi ile yok olabildikleri gibi birbirlerine geçiş de olabilir (6). İzole proteinüriler ikiye ayrılır (10):

2.5.5.1. Benign İzole Proteinüriler

a. Fonksiyonel Proteinüri: Sık görülen bir izole proteinüri tipidir. Başta yüksek ateş, ağır egzersiz, soğuğa maruz kalma, emosyonel stres ve konjestif kalp yetmezliği olmak üzere, birçok akut hastalıkta görülür. Bu vakalarda idrarla atılan protein miktarı 1 g/gün’den düşüktür ve progresif renal hastalık gelişme riskinde herhangi bir artış yoktur (10).

b. İdiopatik Geçici Proteinüri: Çocuk ve genç erişkinlerde çok görülen bir benign proteinüri tipidir. Bazı çevrelere göre normal bir fizyolojik durumdur. Progresif bir hastalık gelişimine neden olmaz. Bu nedenle ileri tetkik yapılmasına gerek yoktur (10).

c. Düzensiz Atılan Proteinüri: Düzensiz aralıklarla proteinüri saptanmasıdır. Bazı vakalarda çeşitli minimal lezyonlar saptanmışsa da renal biopsilerin büyük çoğunluğu normaldir. Prognoz hemen hepsinde çok iyidir ve birkaç yıl içinde proteinüri kaybolur. Son dönem böbrek yetmezliği gelişme riski normal popülasyonla aynıdır (10).

d. Ortostatik Proteinüri: Normalde idrarda bulunan proteinin %70-80’i ayakta iken atılır (4). Eğer proteinüri kişi sadece ayağa kalktığında oluşuyor ve yatarken yok oluyorsa buna postural ya da ortostatik proteinüri denir. Adolesanlarda daha sık görülür ve protein atılımı hemen her zaman 2 g/gün’ün altındadır. Genellikle renal bir hastalıkla ilişkisi yoktur fakat glomerüler hastalıkların başlangıç fazında da görülebilir. Vakaların %80’inde ortostatik proteinüri geçicidir. Geri kalanların da çoğunda 20 yıl içinde idrarla protein atılımı normale döner. Bazı vakalarda minimal renal lezyonlar saptanmışsa da genel prognozu çok iyidir. Ortostatik proteinürisi olanlarda kalıcı paterne dönüşümün kontrolü için 1-2 yılda bir idrar tetkiki tekrarlanmalıdır (10).

2.5.5.2. Kalıcı İzole Proteinüriler

Bu vakalardaki bütün idrar örneklerinde (ayakta ya da yatarken) anormal miktarda protein bulunur. İzole proteinürilerin %5-10’u kalıcıdır ve genelde altta yatan bir renal hastalık vardır. Fizik muayene, idrar mikroskobisi ve renal fonksiyonlar normaldir fakat progresif renal hastalık gelişme riski artmıştır. Prognoz her vakada kötü olmamakla beraber, morbidite ve mortalite düzensiz atılan proteinüriye göre yüksektir. Yapılan bir çalışmada 5 yıllık izlem sonunda vakaların %80’inde proteinüri devam etmiş ve onuncu yılda bu hastaların %50’sinde hipertansiyon gelişmiştir. Böbrek yetmezliği gelişme oranı ise onuncu yılda %20 ve yirminci yılda %40’tır. Çalışmaya göre yaşı ileri, idrarla atılan protein miktarı fazla ve hipertansiyonu olanlarda prognoz daha kötüdür (10).

Kalıcı proteinürili hastalarda idrarla nefrotik düzeyde protein atılıyorsa vakit kaybetmeden böbrek biyopsisi ve diğer ileri tetkikler yapılmalıdır. İdrarla atılan protein miktarı 3 g/gün’den düşük, böbrek fonksiyonları ve kan basıncı normal olan kalıcı proteinürili hastalar ise 6-12 ayda bir kontrol edilmelidir (Şekil 2.1.) (10).

2.6. Proteinürinin Klinik Önemi

Proteinüri ölçümü renal fonksiyonların değerlendirilmesinde önemli bir role sahiptir. Üriner proteinler, renal yapıların etkilendiği durumlarda erken tanı için sensitif göstergelerdir. İdrarla protein atılımının artışı bazı durumlarda sadece fizyolojik faktörlere (egzersiz, ateş, ortostatik proteinüri vb.) bağlıdır ve renal fonksiyon kaybı ile ilişkisizdir. Geçici ve tamamen geri dönüşümlü fonksiyonel ve yapısal değişimlerde de proteinüri görülebilir. Travma, antibiyotik tedavisi, cerrahi operasyonlar ve akut zedelenmeler, bu fonksiyonel değişimlere örnektir. Birkaç ay veya yıl aralıklarla tekrar eden proteinürilerde ise prognoz biraz daha kötüdür. Bu tip proteinüriler sürekli renal hasara neden olarak, geri dönüşümsüz dejeneratif zedelenmelere neden olabilirler (1).

Proteinüri, renal hastalık gelişimi ile çok yakından ilgilidir. Ciddi ve persistan proteinüride böbrek yetmezliği gelişme riski her zaman daha yüksektir. Değişik zamanlarda yapılan çeşitli idrar testlerinde hastanın postürüne bağlı olmaksızın idrarda protein bulunması böbreklerde bir harabiyet varlığının bir göstergesidir (11). Bununla beraber renal hastalıklarda her zaman albuminüri veya proteinüri görülmeyebilir (5). Proteinürinin derecesi renal hastalığın kaynağı hakkında bilgi verebilir. Genelde 1 g/gün’lük bir proteinüri parankimal hasarı, 2 g/gün’lük proteinüri glomerüler hasarı ve >3,5 g/gün’lük proteinüri ise nefrotik sendromu işaret eder (7). Ancak proteinürinin az olması primer glomerüler hastalık riskini ekarte ettirmez. Tek başına total protein ölçümü, glomerüler lezyonun tabiatını tanımlamaya yetmez. Beraberinde diğer böbrek fonksiyon testleri ve hatta renal biyopsinin de yapılması gerekir. İdrarla atılan protein miktarı 5 g/gün’ü aşarsa proteinüri ağırdır. Bu durum hipoalbuminemi ve periferik ödem ile beraber ise nefrotik sendrom tanısı konur. Hastalardaki kalıcı proteinüri, prognoz açısından yol göstericidir. Genelde bu tip hastalarda renal yetmezlik ve hipertansiyon daha sık görülmektedir. Ayrıca ağır proteinürilerde prognoz daha da kötüleşmektedir. Klinik olarak önemli böbrek hastalığını yansıtan proteinüriler kalıcıdır ve strip testleriyle ortaya konabilir. Böbrek hastalıkları için tarama, striplerle yapılabilir. Proteinüride ortaya çıkan küçük artışlar (mikroalbuminüri), renal hastalıklarla birlikte olabileceği gibi böbrek dışından da köken alabilir. Diabetli ve hipertansif hastalarda strip testleri olumsuz olsa da miktar tayini yapılmalıdır (5).

Yapılan çalışmalara göre IgA nefropatisi, membranöz nefropati ve fokal segmental glomerülosklerozda en güçlü bağımsız prognostik indikatör ağır proteinüridir. Proteinüri miktarı renal hastalık ciddiyetinin bir göstergesi olduğu gibi aynı zamanda proteinürinin kendisi de direkt olarak renal hastalık gelişimine neden olabilir. Artmış proteinüri, makromoleküllerin mesengiuma akımını arttırarak mesengial hücrelerde yüklenme, mesengial hasar ve proliferasyona neden olarak, sonuçta glomerüloskleroz gelişimine yol açar. Ayrıca makromoleküller subendotelial boşluğu genişletir ve hyalen materyal birikimini de arttırır (1).

Proteinüri, glomerüler hastalıklarla ilişkili tübülointersitisiel hasardan da direkt sorumludur. Çalışmalara göre minimal change glomerülnefriti hariç bütün glomerüler hastalıklarda lökosit infiltrasyonu proteinüri ile ilişkilidir. Proteinürili hastalarda distal tübüler birikimler oluşması, intratübüler basıncın artması ve Tamm-Horsfall proteinlerinin renal intersitisiyuma geçişinin artması da inflamatuvar cevabı tetikleyebilir (1).

Proteinürinin direkt glomerüloskleroza neden olmasındaki diğer bir mekanizma da ağır proteinüri kaynaklı hiperlipideminin intrarenal arteriollerde atherosklerotik lezyonların gelişimine ve glomerüler zedelenmeye yol açmasıdır. İntrarenal arter duvarlarında oluşan atherosklerotik lezyonlar, böbreklerde iskemik hasara neden olur ve bu da renal hastalık gelişimini hızlandırabilir. Bütün bu verilere rağmen glomerüloskleroz gelişiminde proteinürinin direkt rolü olduğu hakkında kesin bir bulgu henüz yoktur. Bu nedenle bu konuda daha çok araştırma yapılmalıdır (11).

Esansiyel hipertansiyon ve diabetli hastalarda da üriner protein atılımının artması morbidite ve mortalite insidansını arttırır. Tip I diabetik nefropatili hastalarda üriner protein atılımı renal fonksiyon kaybı için güçlü ve bağımsız bir göstergedir. Tip II diabetik nefropatide, proteinürinin bu özelliği tam olarak henüz kanıtlanamamış olmasına rağmen, burada da renal fonksiyon kaybı için bir gösterge olarak kullanılabilir. Diabetik hastalarla farklı laboratuvarlarda yapılan çalışmalara göre mikroalbuminürisi olan hastaların %80’inde 6-14 yıllık izlem içinde klinik proteinüri gelişirken, mikroalbuminürisi olmayanlarda bu oran %0-5 olarak kalmıştır (1).

Tip I ve tip II diabetik nefropatilerde idrarla albümin atılım oranının >30 mg/gün olması, renal fonksiyon kaybı gelişimi için bağımsız bir risk faktörüdür (5). Diabetik bir hastada 6 aylık süre içinde toplanan 3 örnekten en az ikisinde 20-200 µg/dk veya 30-300 mg/gün albümin varsa bu, diabetik mikroalbuminüridir. Bu hastalarda proteinüri takip edilmeli ve gerekirse müdahale edilmelidir (3). Diabetikler ve çevresel risk altındaki popülasyonla yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, bu hastalarda erken tanı için yapılacak minimal test kombinasyonunda en az iki proteine bakılmalıdır. Bunlardan biri yüksek molekül ağırlıklı grubu (albümin, transferrin), diğeri ise düşük molekül ağırlıklı grubu (RBP) temsil etmelidir (1).

Esansiyel hipertansif hastalarda da üriner albümin atılımının >30 mg/gün olması renal hastalık gelişimi için bağımsız bir risk faktörü olarak kabul edilir. Bu hastalarda da proteinürinin takibi prognoz açısından önemlidir (5). Ayrıca kalp yetmezliği olan hastaların da %24-47’sinde geçici proteinüri (>500 mg/gün) görülür (12).

Tedavi ile proteinürinin azaltılması renal fonksiyonların daha iyi korunmasını sağlar. Bunun için diet ve ilaç tedavisi kullanılır. Yüksek proteinli bir diet nefrotik sendromda renal fonksiyon açısından tehlikeli bile olabilir. Düşük proteinli bir diet ise protein atılımını azaltır. Burada negatif nitrojen dengesi ve protein malnutrisyonuna dikkat edilmelidir. Düşük proteinli vejeteryan dieti ve esansiyel amino asitlerin kullanılması ile proteinüri, hiperfiltrasyon ve hiperkolesterolemi düzelir. Bu da renal hasarın önlenmesinde önemli bir rol oynar (13).

Yapılan bir çalışmaya göre renal hastalıkların progresyonunda altta yatan mekanizmalar multifaktöriyel olsa da, hipertansiyon ve proteinüri progresif renal fonksiyon kaybına iştirak eder. Bu nedenle renal hastalığı olanlarda hipertansiyon ve proteinüri kontrol edilmelidir. Çalışmanın sonuçlarına göre kan basıncının düşürülmesi proteinüriyi azaltır ve renal hastalık gelişimini yavaşlatır ya da durdurur. Bunun için idrarla protein atılımı >1 g/gün olan hastalarda kan basıncı hedefi 92 mmHg (125/75) ve 0,25-1,0 g/gün olan hastalarda ise 98 mmHg’dır (130/80) (9).

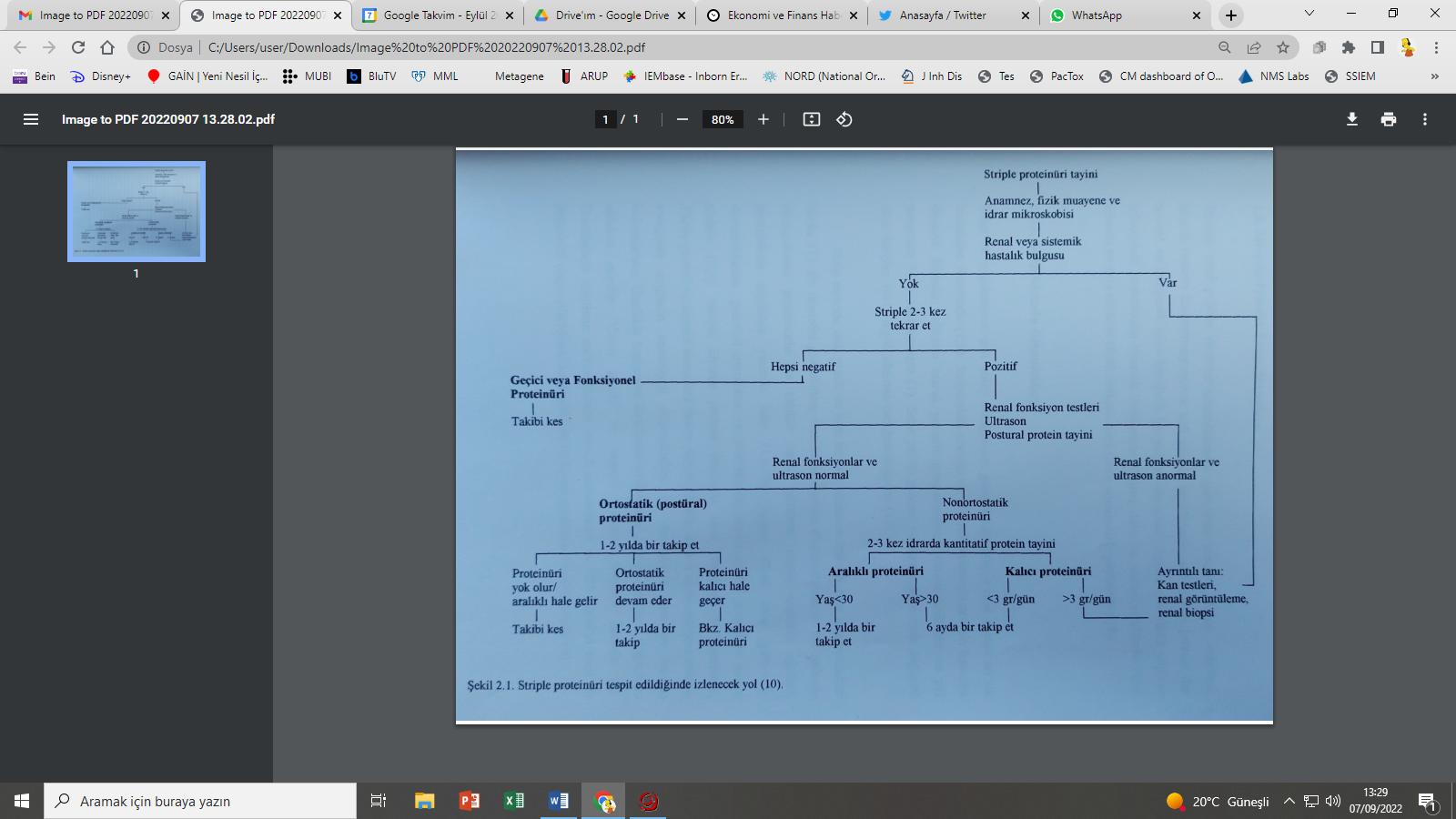
Proteinürinin kontrol edilmesi için ilaç tedavisi de kullanılabilir. Bunun için anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörleri kullanılır. ACE inhibitör tedavisi zamana bağımlıdır ve uzun dönemli tedavinin etkisi daha fazladır. Ayrıca uzun dönem ACE inhibitör tedavisi hastalık progresyonunda remisyona da neden olabilir. Beznazapril ile yapılan bir çalışmaya göre proteinüri miktarı ile ACE inhibitör tedavisinin etkinliği birbiri ile ilişkilidir. ACE inhibitör tedavisi ile son dönem börek yetmezliği gelişme riski üriner protein atılımı <1 g/gün olanlarda %31, 1-3 g/gün olanlarda %53 ve >3 g/gün olanlarda %66’dır. Bu nedenle ilaç tedavisinden en çok proteinürisi fazla olanlar yarar görür (5).

Diğer bir çalışmaya göre glomerüler filtrasyon hızındaki (GFH) kayıp miktarı ve son dönem böbrek yetmezliği gelişme riskinin en önemli klinik göstergesi üriner protein atılımıdır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, üriner protein atılımı 1 g/gün olan hastalarda GFH kaybı 0,13 mL/dk ve yıllık renal survive oranı %97 iken, protein atılımı 4 g/gün olan hastalarda GFH kaybı 0,90 mL/dk ve yıllık renal survive oranı %78,8’dir. Proteinüri miktarı >4 g/gün olan hastalarda ise tahmini diyaliz zamanı 1 yıldan kısadır (5).

Asemptomatik erişkinlerde rutin muayene sırasında bulunan proteinürinin prognostik önemi Framingham çalışmasında araştırılmıştır. Burada 16 yıllık takip sonucunda rutin muayenede proteinürisi olan kişilerde morbidite ve mortalite saptanmıştır. Elde edilen verilere göre rutin muayenede proteinüri saptananlarda kardiyovasküler morbidite ve mortalite genel popülasyona göre 3 kat ve toplam mortalite ise 4 kat artmıştır. Normal popülasyonda proteinüri görülme sıklığı %0,6-7,1 olduğundan proteinüri sağlıklı bir kişide daima beklenmeyen bir durumdur. Framingham çalışmasına göre sağlıklı bir kişide proteinüri görüldüğünde, bu kişide hipertansiyon, diabetes mellitus, kardiyovasküler veya renal hastalıklar vardır, ya da ileride gelişmes riski yüksektir. Sonuç olarak bu çalışmaya göre sağlıklı popülasyondaki proteinüri benign bir durum değildir ve ciddi risk taşır (14).

2.7. Referans Değerler

Sağlıklı erişkinlerde idrarla atılan protein miktarı 80±24 mg/gün’dür (6). Günümüzde çoğu laboratuvar tarafından 100 mg/gün’ün altındaki değerler normal olarak kabul edilmekle beraber, üst sınır gebelerde 150 mg/gün ve ağır egzersiz sonrası 300 mg/gün’e kadar yükselmektedir (7). Sağlıklı çocuk ve adolesanlarda da idrarla protein atılımı hafif artmıştır ve 250 mg/gün’e ulaşabilir. Ateş, ağır egzersiz, hipertonik lbumin infüzyonu ve bazı vazopressör ajanlar da (norepinefrin vb.) normal bireylerde geçici proteinüriye neden olabilir (6).



2.8. İdrarda Protein Tayin Metotları

İdrarda total protein ölçümü serumdakinden çok daha zordur. Bunun nedenleri, idrarın protein konsantrasyonunun çok düşük, interferansa neden olan protein dışı madde ve inorganik iyon içeriğinin ise yüksek olmasıdır. Ayrıca çok farklı yapı ve miktardaki proteinlerin bir arada bulunması ölçümü daha da zorlaştırmaktadır (15). İdrarda protein ölçümü klinik ihtiyaca göre farklı yöntemlerle yapılabilir (16).

2.8.1. Strip Metodu (Dipstickler)

Ucuz ve uygulanması çok kolay olduğundan günümüzde tarama testi olarak en sık kullanılan yöntemdir (1, 6). Striplerdeki prnsip bir pH indikatörünün protein hatasına dayanır. Burada indikatör olarak genelde tetrabromfenol mavisi kullanılır ve pH tamponla 3,0’e sabitlenmiştir (1). Sabir pH’da protein miktarına göre renk değişimi olur. Stripler 10-15 mg/dL albümin varlığına hassastır (10).

Strip metodu çok pratik ve hızlı bir test olmasına rağmen bazı dezavantajları vardır (1). En önemlisi globülinlere olan hassasiyetinin düşük olmasıdır. Bu nedenle Bence-Jones proteinürisi ve tübüler hasarı gösteren düşük molekül ağırlıklı proteinlerin tayininde yetersiz kalır (1, 6, 10). Ayrıca alkali idrar (pH>9,0), dezenfektanlar, polivinil pyrolidon ve klorhekzidin yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir (1, 6). Striple idrarda protein tayininde idrar dansitesi de önemlidir. Yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlara neden olabilir (6, 10). İdrarla atılan protein miktarı arttığında striplerin hassasiyeti düştüğünden, bu durumlarda tanı ve takipte kullanılamaz. Özellikle toplanmış idrarlarda striple total protein tayininin doğruluğu oldukça zayıftır. Yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar oldukça fazladır (1). Günümüzde striplerin sadece tarama amaçlı kullanılması ve 100 mg/dL’yi aşan bir proteinüri tespit edildiğinde kantitatif protein tayini yapılması önerilmektedir. (6).

2.8.2. Total Protein Ölçümü

Yapılan çalışmalara göre idrarda total protein ölçümü, laboratuvar analizleri arasında doğruluk açısından en zor olanlardan biridir (5). İdrarda total protein ölçümü için bazıları otomatize olmak üzere birçok metot geliştirilmiştir fakat bunlardan hiçbiri standart bir metot olarak geniş kabul görmemiştir (2, 17). Bütün bu metotların presizyonu, hassasiyeti, doğruluğu, uygulanma kolaylığı, farklı proteinlere cevabı, otomatizasyona uygunluğu ve maliyeti birbirinden farklıdır (2, 18). Ayrıca laboratuvarlar arası korelasyonlar da zayıftır (4).

Normal idrarda proteinler kompleks bir karışım şeklinde bulunur. Toplam miktarları yaklaşık 100 mg/L’dir ve bu oran plazmadakinin yaklaşık %0,14’ü kadardır. Bu da idrarda total protein ölçümünde sorun yaratır. Bu nedenle öncelikle proteinlerin yaklaşık 1000 kat konsantre edilmesi gerekir. Bunun için presipitasyon, pervoporasyon, diyaliz ve ultrafiltrasyon gibi çeşitli konsantrasyon yöntemleri kullanılır. Diğer bir problem de idrarda molekül ağırlığı hem çok büyük (THG), hem de çok küçük proteinlerin (peptid hormonları) bir arada bulunmasıdır (4, 19). İdrarda bulunan proteinlerin çeşit ve miktarı, proteinüri tipi ve ciddiyetine göre değişir. Bu faktör kontrol edilemediğinden, idrarda total protein ölçümünde kullanılacak metodun geniş çeşitlilikte protein tip ve konsantrasyonlarını tespit edebilmesi gerekir (2).

İdrarda total protein ölçümü üç ana gruba ayrılır: Türbidimetrik, boya bağlayıcı ve kimyasal yöntemler (15).

2.8.2.1. Türbidimetrik Yöntemler

Kolay ve hassasiyetleri yüksek olduğundan, türbidimetrik metotlar geniş bir kullanım alanı bulmuştur (20, 21). Günümüzde klinik laboratuvarlarda idrarda kantitatif protein tayininde en çok kullanılan yöntemler, spektrofotometre ve nefelometre ile türbidimetrik ölçüm yapılmasıdır (16). Bu yöntemlerde protein çökertici bir madde örneğe eklendiğinde proteinler denatüre olarak çöker ve oluşan bulanıklık türbidimetrik olarak ölçülür (15). Uygun ve stabil bir çözeltinin elde edilme zorluğu, interfere edici maddeler, idrarda farklı yapılarda proteinlerin bulunması, agregat oluşumu, türbidimetrik inhibisyon, zaman ve ısı ayarı türbidimetrik yöntemlerdeki başlıca hata kaynaklarıdır (22, 23). Bütün bu faktörler türbidimetrik metotların doğruluk ve presizyonunu etkiler (23). Ayrıca lineariteleri de sınırlıdır (24). Türbidimetrik metotların protein ölçümündeki zayıflığını gösteren birçok çalışma yapılmıştır (2, 21, 24). Fakat daha iyi bir yöntemin geliştirilememesi, türbidimetrik yöntemlerin kullanılmaya devam edilmesine neden olmuştur (21).

Konsantre idrarlar, radyokontrast ajanlar, sülfonamide, tolbutamid, penisilin ve sefalosporinler türbidimetrik yöntemlerde yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir. Alkali ve dilüe idrarlarda ise yanlış negatif sonuçlar görülebilir (16).

Türbidimetrik protein tayininde kullanılan reaktifler trikloroasetik asit (TCA), sülfosalisilik asit (SSA) ve benzetonium kloriddir (BZC). BZC ve SSA’nın hassasiyeti daha yüksek olduğu halde genelde albümin ve gama globülinleri eşit ölçen TCA tercih edilir (15).

1. Trikloroasetik Asit: Proteinlerin TCA ile denatüre edilerek çöktürülmesi esasına dayanan kolay ve ucuz bir yöntemdir. İdrarda protein tayininde %3’lük TCA kullanılır. 10 dakikalık bir inkübasyonu takiben 450 nm’de okuma yapılır. Oluşan bulanıklık 2 dakika stabil olduğundan bu süre içinde okuma tamalanmalıdır. Sensitivitesi 20 mg/L ve linearitesi 2400 mg/L’dir. 20-25°C ısı aralığında albümin/glubulin oranındaki değişimlerden etkilenmez. 25°C’nin üzerinde ise albümin ile oluşan buanıklık, globülininkinden fazladır. Bu nedenle bu yöntemde ısı kontrolü önemlidir. Ayrıca mikonazol, benzilpenisilin ve kloksasilin TCA yönteminde interferansa neden olabilir (15). TCA yöntemi Cheung ve arkakadaşları tarafından otomatize edilmiştir (20). Özellikle presizyonun kötü olduğunu ve idrarda protein ölçümünde kullanılmaması gerektiğini öne süren çalışmalar varsa da (2, 21, 22, 24) günümüzde en çok kullanılan yöntemdir (20, 21).
2. Sülfosalisilik Asit: Sık kullanılan bir diğer yöntemdir. Prensip ve uygulama TCA ile aynıdır. %3’lük SSA idrarla 6 dakika inkübe edilir ve 620 nm’de okuma yapılır. Oluşan reaksiyon ısı değişimlerinden etkilenmez. Sensitivitesi 10-25 mg/L’dir ve linearitesi 3000 mg/L’ye kadar yükselir. En önemli dezavantajı albüminlere globülinlerden 4 kat fazla türbidite vermesidir. Ayrıca aminoglikozidler de ölçümde interferansa neden olabilir (15). Kolay ve hızlı bir ölçüm sağladığından halen bazı laboratuvarlar tarafından kullanılsa da, yapılan bazı çalışmalara göre presizyon ve doğrulukları kabul edilemez düzeyde olduğundan, idrarda protein tayininde kullanılmamalıdır (4, 22, 25, 26).
3. Benzetonium Klorid: Iwata tarafından 1974’da tabımlanmıştır (27) ve daha sonra otomatize de edilmiştir (28). Türbidimetrik yöntemler arasında sensitivitesi en yüksek (10 mg/L) olan BZC’dir. Oluşan bulanıklık 25-40°C aralığında stabildir ve biüret metodu ile korelasyonu iyidir. En önemli dezavantajı globülinlere albüminden %11-31 daha az bulanıklık oluşturmasıdır (15). Genel olarak presizyon ve doğruluğu diğer türbidimetrik yöntemlerden daha iyidir (26) fakat yanlış pzitif ve yanlış negatif sonuçların fazla olduğunu gösteren bazı çalışmalar da vardır (27, 29). Özellikle protein içeriği fazla olan örneklerde dilüsyon yapılmazsa yanlış negatif sonuçlara neden olabilir (27).

2.8.2.2. Boya Bağlayıcı Yöntemler

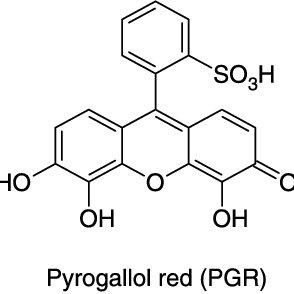
Boyaların proteinlere bağlanarak kompleks oluşturması esasına dayanır (15). İdrarda total protein ölçümünde kullanılan bazı boyalar coomasie brilliant blue (CBB), amidoblack, ponceau S, kolloidal altın ve pyrogallol kırmızısıdır (30). Genel olarak boya bağlayıcı yöntemlerin presizyon ve doğrulukları türbidemetrik yöntemlerden daha iyidir (22).

1. Coomassie Brilliant Blue: İlk olarak 1979 yılında Bradford CBB G-250 boyasını düşük konsantrasyonlu protein tayininde kullanmıştır. CBB yönteminde boyanın proteine bağlanması ile oluşan absorbans artışı 595 nm’de ölçülür. Bağlanma yaklaşık 2 dakikada tamamlanır ve oluşan renk 1 saat stabil kalır. Boya, proteinlerdeki NH3+ grupları ile reaksiyona girer fakat bütün proteinler aynı miktarda NH3+ grubu içermez ve bütün NH3+ grupları aynı reaksiyonu vermez. Bu nedenle CBB boyası kullanıldığında oluşan renk proteinin çeşidine bağlıdır (15).

CBB yöntemi boya bağlayıcı yöntemler arasında en sensitif olandır (2,5 mg/L) ve biüret yöntemi ile korelasyonu iyidir (15, 24). Manuel veya otomatize olarak kullanılabilir (24). Yapılan bazı çalışmalara göre klinik laboratuvarlarda seçilmesi gereken yöntemdir (2, 24, 31, 32) fakat özellikle cam malzeme ve küvetleri boyadığından rutin çalışmalar için kullanımı sınırlıdır (18, 24). Diğer dezavantajları linearitesinin düşük olması (1000 mg/L), deterjan, timol bileşikleri ve salisilatların interferansa neden olmasıdır (2, 18).

1. Ponceau S: Ponceau S boyası ile proteinlerin kompleks oluşturmasına dayanan bu yöntem 1973 yılında Pesce ve Strande tarafından geliştirilmiştir. Burada örnekler TCA-Ponceau S boya solüsyonu ile inkübe edilir ve sonuçta boya bağlı proteinler çöker. Oluşan kırmızı çökelti dilüe NaOH ile çözülür ve mor renkli bir solüsyon oluşur. Meydana gelen bu renk oda ısısında 6 saat stabildir ve 560 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür. Sensitivitesi 20 mg/L ve linearitesi 1500 mg/L’dir. Ponceau S boyası, albümin ve globülinlerle eşit olarak reaksiyona girer. Ayrıca biüret yöntemi ile korelasyonu da iyidir (15). Yöntemin bir dezavantajı aminoglikozidler ve mikonazolün interferansa neden olmasıdır (15, 33, 34). Yapılan bazı çalışmalara göre presizyonu ve doğruluğu iyi olduğundan rutin kullanım için klinik laboratuvarlara önerilen bir yöntemdir (25, 34).
2. Pyrogallol Red-Molybdat (PRM): Fujita tarafından 1983 yılında tanımlanan PRM yöntemi uygulanabilirliği kolay olan bir metottur (24). Manuel olarak kullanılabildiği gibi otomasyona da uygundur ve günümüzde otoanalizörler için geliştirilmiş hazır kitleri bulunmaktadır (17, 18).

Pyrogallol kırmızısı, protein tayininde kullanılan reversable bir metal şelat boyasıdır. Aromatik bir halka yapısı vardır ve bu halkanın üzerinde sülfonik asit kalıntıları, metal bağlanma bölgesi ve şelatlayıcı yan zincirler (keton, karboksil, hidroksil vb.) bulunur (Şekil 2.2.) (30). PRM ve benzeri bazı boya metal kompleksleri proteinlerle selektif olarak etkileşerek, parlak renkli ürünlerin oluşmasını sağlar ve oluşan renk 600 nm’de ölçülür (30, 35). PRM kompleksi proteinlerdeki birçok amino asit yan zinciri ile reaksiyona girer. Özellikle lizin, arjinin ve histidin ile güçlü bağlar kurar. Bu nedenle proteinlerdeki amino asit yan zincirleri PRM ile boyanmada önemli bir rol oynar (30).



Şekil 2.2. Pyrogallolsülfonftalein (Pyrogallol kırmızısı) (30).

PRM kompleksi, postelektroforetik bant tayini, solüsyon fazındaki protein ölçümleri ve solid fazdaki protein ölçümlerinde kullanılabilir (30). Özellikle idrarda total protein ölçümünde kullanımına olan ilgi artmaktadır (30, 36). Bunun için en uygun olan reaktif bileşiminde 60 µmol/L pyrogallol kırmızısı ve 40 µmol/L molibdat bulunmalıdır. PRM yöntemi ile idrarda total protein tayini 25-37°C’de stabildir ve 10 dakikada tamamlanır (17). Linearitesi yüksek (16000 mg/L), sensitivite (10 mg/L) ve doğruluğu ise oldukça iyidir (17, 18, 24, 30, 36). Ayrıca biüret yöntemi ile korelasyonu da yüksektir. PRM yöntemi ile yapılan bir çalışmada referans sınırlar 28-141 mg/L olarak tespit edilmiştir (17).

PRM reaktifi ışıktan korunursa 6 ay stabil kalır. Koroziv değildir ve küvet duvarlarını etkilemez (24). Kuvvetli asit ve alkalilerden etkilenebilir fakat normal idrarda böyle bir durumla karşılaşılmaz. Ayrıca idrarda şelatlayıcı madde varlığında (oksalat vb.) absorbans düşer ve yanlış düşük sonuçlar çıkabilir. Reaktifteki son konsantrasyonu 1 mmol/L olacak şekilde oksalat eklenmesi ile bu interferans önlenebilir (17). En önemli dezavantajı gama globülinlerin albümine göre %30 daha az hassas olmasıdır (17, 24). Orsonneau tarafından yapılan bir çalışmaya göre PRM reaktifine 25 mg/L sodyum dodesil sülfat eklenmesi ile gama globülinlere sensitivitesi %25 artar. Böylece dezavantaj en aza indirilmiş olur. Ayrıca hafif zincirlerin tespit edilme oranı da %48’den %68’e çıkar (24).

Sonuç olarak PRM yöntemi kolay uygulanabilir ve otomasyona uygun bir yöntemdir. Ayrıca sensitivite, linearite, presizyon ve doğruluğu da oldukça iyidir. Bu nedenlerden dolayı klinik biyokimya laboratuvarlarında rutin kullanım için tavsiye edilmektedir (17, 18, 24, 30, 36).

2.8.2.3. Kimyasal Yöntemler

İdrarda total protein ölçümünde kullanılan kimyasal yöntemlerin sensitivite ve doğrulukları diğer yöntemlerden çok daha yüksektir. Buna rağmen uygulamaları çok zor olduğundan rutin çalışmadan çok araştırma laboratuvarlarında kullanılırlar (24, 25, 37).

1. Biüret Yöntemi: Doğruluğu çok yüksek olduğundan idrarda protein ölçümünün standardizasyonunda biüret yöntemi temel alınır (22). Burada alkali solüsyondaki biüret reaktifi (alkali Cu+2) ile proteinlerin peptit bağları arasında bir reaksiyon gelişir. Tek başına sensitivitesi kötü ve interferansı fazla olduğundan ön hazırlık yapılmadan kullanılamaz. Öncelikle proteinlerin TCA, perklorik asit, etanolik-HCl-fosfotungstik asit (Tsuchiya reaktifi) veya jel filtrasyonu gibi yöntemlerle konsantre edilmesi gerekir. Daha sonra bu protein biüret reaktifi ile reaksiyona sokulur. 20 dakikalık bir inkübasyonu takiben oluşan renk 540 nm’de ölçülür. Reaksiyon 56°C’de stabildir. Sensitivitesi 5 mg/L ve linearitesi 2000 mg/L’dir (13). Biüret yöntemi, albümin ve globülinlere eşit cevap verir (38). Yapılan çalışmalara göre en kuvvetli doğruluk jel filtrasyon + modifiye biüret metodu ile elde edilir fakat yapılması çok zor olduğundan rutin laboratuvarlarda kullanılamaz (22, 24, 25).
2. Folin-Lowry Yöntemi: Bu yöntemde de öncelikle interfere edici materyal, diyaliz, çöktürme veya ultrafiltrasyon ile uzaklaştırılmalıdır (15). Daha sonra proteinler alkali bakır sülfat ile reaksiyona girer ve bakır sülfat-protein kompleksi oluşur. Bu sırada ortama Folin reaktifi (fosfotungstik ve fosfomolibdik asitten oluşur) eklenir. Bu reaktif alkali bakır sülfat-protein kompleksi ile indirgenir ve kromojen maddeler olan tungsten ve molibdenum mavisi oluşur. Oluşan bu karakteristik mavi renk 660 nm’de ölçülür (15, 39). Reaksiyon için uygun pH 11,7-11,8’dir. Kullanılan alkali bakır sülfat solüsyonunun taze olmasına dikkat edilmelidir (39). Sensitivitesi 10 mg/L’dir fakat proteinlerin amino asit içeriğinden etkilenebilir. Ayrıca idrardaki ürat düzeyinin yükselmesi de interferansa neden olabilir (15).
3. Tannik Asit Presipitasyon Yöntemi: Yatzidis tarafından geliştirilen bu yöntemde öncelikle proteinler tannik asitle çöktürülür. Daha sonra bu çökelti trietanolamin ferrikklorid solüsyonu ile çözdürülür ve pembe bir renk oluşur. Bu renk 510 nm’de spektrofotometre ile okunur. Bazı dezavantajları vardır. Örneğin ortamdaki fazla tannik asit yıkama ile uzaklaştırılmalıdır yoksa yüksek değerler görülür. Ayrıca bu yöntemle globülinler albüminden %45 daha az absorbans verir (15). Bunların yanı sıra tannik asit yöntemi idrar pH’ından da etkilenir ve pH 6,0’nın altına indiğinde yanlış sonuçlar verir (2, 15).

2.8.3. Elektroforetik Yöntemler

Bu yöntemler, idrardaki proteinleri mobilitelerine göre ayırarak proteinüri tipinin tayinine olanak sağlar. Çeşitli boya ve tekniklerle elektroforetik metotların sensitivitesi arttırılabilmektedir. İdrarda proteinler çok düşük konsantrasyonlarda bulunduklarından öncelikle konsantre edilmelidirler. Ultrafiltrasyon, diyaliz, presipitasyon, liyofilizasyon veya bunların kombinasyonları konsantrasyon için kullanılabilir. Günümüzde kullanılmakta olan başlıca elektroforetik metotlar şunlardır (1):

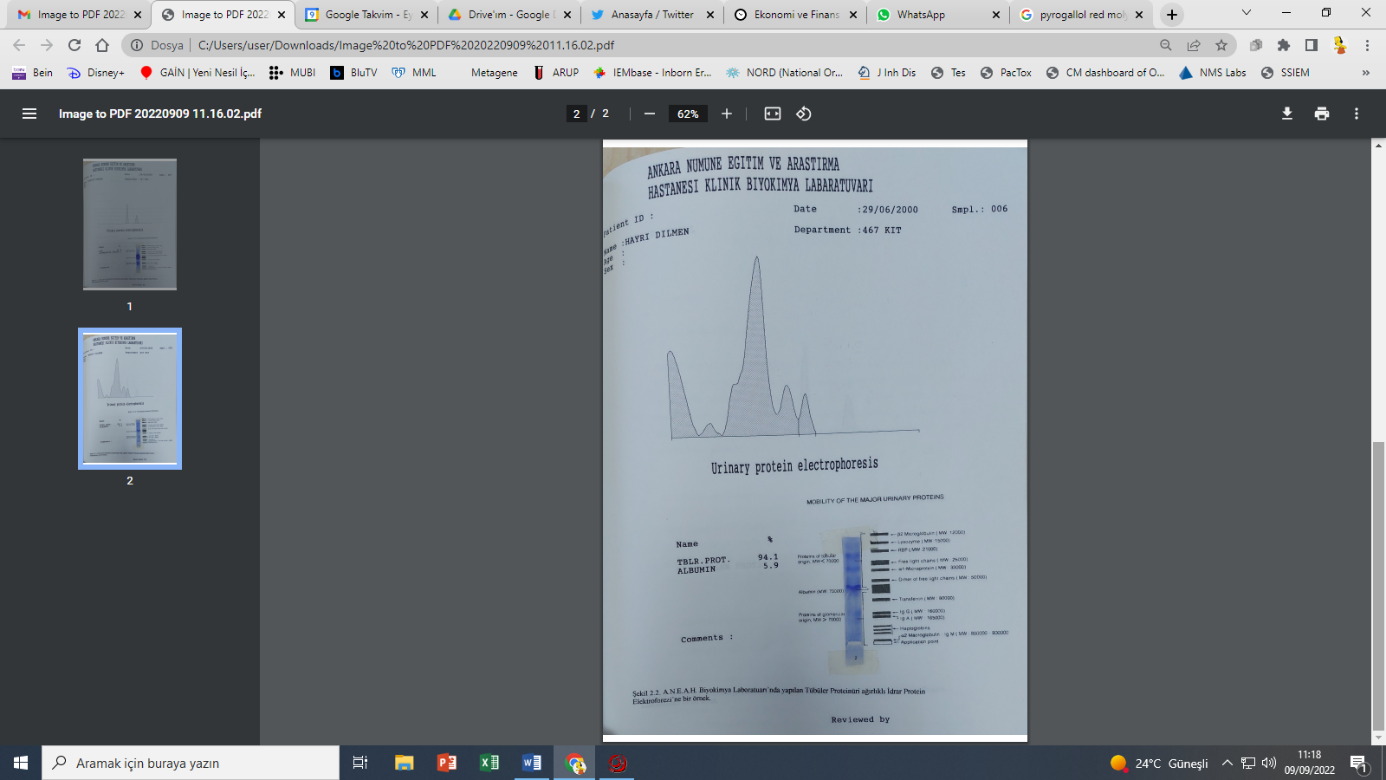
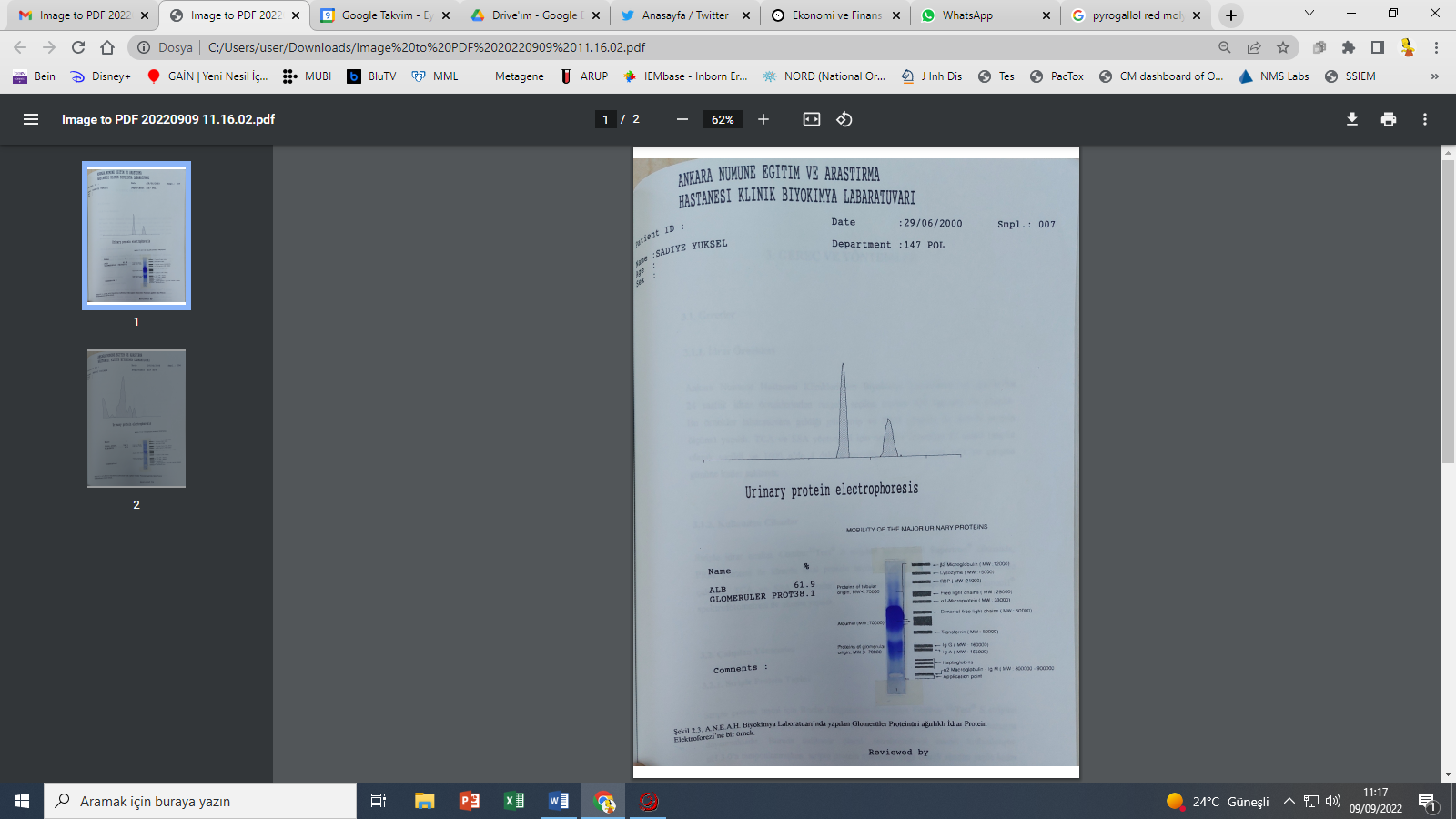
1. Kağır, agaroz ya da poliakrilamid jelde konvansiyonel elektroforez: Proteinler net elektriksel yüklerine göre ayrılırlar. Glomerüler proteinürilerde albümin, transferrin (beta1) ve gama globülinler görülürken, tübüler proteinürilerde karakteristik olarak beta2 mobilitesi (beta2-m) ve alfa2 bölgesinde çift bant (RBP) görülür (Şekil 2.2. ve 2.3.) (1).
2. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi: Proteinleri molekül ağırlığı veya peptit bağı uzunluğuna göre ayırır. Bu yöntemde öncelikle proteinlerin elektriksel yükü nötralize edilir. Daha sonra proteinler poliakrilamid jelde boyutlarına göre göç ederler (1).
3. İzoelektrik odaklanma: Proteinler elektriksel bir alana konur ve her protein pH farkına göre kendi izoelektrik noktasına doğru migrasyona uğrar (1).
4. İki boyutlu elektroforez: Elektroforez tekniklerinden herhangi ikisinin beraber kullanılmasıdır. En iyi sonuç, izoelektrik odaklama + sodyum dodesil sülfat elektroforezi ile elde edilir. Bu yöntemle idrarda 250’nin üzerinde protein çeşidi olduğu gösterilmiş fakat bunların çoğu henüz tanımlanmamıştır (1).

2.8.4. Kromatografik Yöntemler

İyon Exchange kromatografisi veya ters fazlı high performance liquid kromatografisi ile üriner proteinlerin profili çıkarılabilir. Bu yöntemlerin, immünokimyasal yöntemlerle korelasyonu iyidir. Üriner albümin atılımındaki çok düşük artışlar bile tespit edilebilir fakat tübüler proteinürinin erken tanısında uygun değildir (1).

2.8.5. İmmünokimyasal Yöntemler

İdrarda protein tayininde, radial immünodifüzyon, nefelometri, elektroimmunoassay, enzim like immüno sorbent assay, floroimmünoassay, particle counting immunoassay, latek immunoassay ve zone immünelektroforez gibi bir dizi immünokimyasal yöntem kullanılabilir. Bu yöntemler genellikle araştırma laboratuvarlarında kullanılır ve çok düşük miktardaki proteinler bile saptanabilir (1).



3. Gereç ve Yöntemler

3.1.11 İdrar Örnekleri

Ankara Numune Hastanesi Kliniklerinden Biyokimya Laboratuvarına gönderilen 24 saatlik idrar örneklerinden rastgele seçilen toplam 430 numune ile çalışıldı. Bu örnekler laboratuvara geldiği gün strip ve PRM yöntemi ile idrarda protein ölçümü yapıldı. TCA ve SSA yöntemleri için örnekler arasından 82 tanesi rastgele olarak seçildi ve 1600 g’de 4 dakika santrifüj edildikten sonra +4°C’de çalışma gününe kadar saklandı.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Striple idrar analizi, Combur10Test®S stripleri kullanılarak Supertron® cihazında, PRM yöntemi ile idrarda total protein tayini Olympus AU800® otoanalizöründe çalışıldı. TCA ve SSA yöntemleri ise manuel olarak çalışıldı ve NovaspecII® spektrofotometresi ile okuma yapıldı.

3.2. Çalışılan Yöntemler

3.2.1. Striple Protein Tayini

Striple protein tayini için Roche Diagnostics firmasının Combur10Test®S stripleri kullanıldı. Bu striplerin prensibi, bir pH indikatörünün protein hatasına dayanmaktadır. Burada indikatör olarak tetrabromfenol mavisi kullanılmıştır. pH 3,0’a tamponlanmışken, striple protein miktarına bağlı olarak sarıdan yeşile kadar renk değişimi olur. Bu renk değişimi, bir fotometre yardımı ile reflektometrik olarak ölçülür. Stripler, idrardaki protein miktarını beş ayrı ölçüm aralığında semikantitatif olarak göstermektedir: Negatif, +1 (25 mg/dL), +2 (75 mg/dL), +3 (150 mg/dL), +4 (500 mg/dL).

3.2.2. PRM Boya Bağlama Yöntemi

PRM yöntemi için Randox firmasının kolorimetrik test kiti kullanıldı. Kullanılan reaktifin içeriği:

* Pyrogallol kırmızısı 60 µmol/L
* Disodyummolibdat 40 µmol/L
* Süksinik asit 50 µmol/L
* Sodyumoksalat 1 mmol/L
* Sodyumbenzoat 3 mmol/L

PRM boya bağlama yönteminin Olympus AU800® otoanalizöründeki programı:

* Örnek volümü 10 µL
* Reaktif volümü 200 µL
* Dalga boyu 600 nm
* Metot End point
* Reaksiyon slope (+)
* Ölçüm noktası 0-16 sn
* Normal aralık 28-141 mg/dL
* Dinamik sınır (500)-(-500)
* Panik değer (500)-(-500)
* Reaktif OD aralığı 1.nokta Yüksek 2.0000

Düşük -2.0000

Son nokta Yüksek 2.0000

Düşük -2.0000

PRM yöntemi ile idrarda total protein tayini, proteinlerin geri dönüşümlü bir metal şelat boyası olan PRM kompleksine bağlanması prensibine dayanır. PRM kompleksi, proteinlerdeki amino asit yan zincirleri ile reaksiyona girer. Özellikle lizin, arjinin ve histidin ile güçlü bağlar kurarak parlak renkli ürünlerin oluşmasını sağlar. Oluşan protein-PRM kompleksi 600 nm’de spektrofotometrik olarak okunur. Bu reaksiyon 25-37°C arasında stabildir.

Protein + PR-molibdat kompleksi Protein-PR-molibdat kompleksi

(maksimum absorbans 467 nm) (maksimum absorbans 604 nm)

Bu yöntem için kalibratör olarak Randox firmasının 100 mg/dL’lik protein kalibratörü kullanıldı. Kontrol ve presizyon çalışmalarında ise Randox firmasının 61 g/L’lik standardı dilüe edilerek hazırlanan 10 mg/dL, 80 mg/dL ve 200 mg/dL’lik standart solüsyonları kullanıldı. Linearite çalışması da aynı 61 g/L’lik protein standardı kullanılarak yapıldı.

3.2.3. TCA Presipitasyon Yöntemi

Proteinlerin konsantre asitlerle çöktürülmesi esasına dayanır. Proteinler pozitif yüklü olduklarından, izoelektrik noktalarına göre daha asit bir ortamda bulunduklarında, asitlerin negatif iyonları ile birleşerek tuzlar oluşturur. Bu protein tuzları çözünür olmadıklarından solüsyon içinde bulanıklık oluşturur ve bu bulanıklık da spektrofotometrik olarak ölçülür.

Kullanılan reaktifler:

Stok trikloroasetik asit, %100 (6,12 mol/L): Stok solüsyonu için 500 mg’lık bir TCA şişesine 175 mL deiyonize su konuldu. Aralıklarla çalkalanarak 1 gece TCA’nın çözünmesi beklendi. Daha sonra bu solüsyon deiyonize su ile dikkatlice karıştırılarak 500 mL’ye tamamlandı. Hazırlanan %100’lük TCA solüsyonu, oda ısısında ve koyu renk bir şişede saklandı.

Çalışma solüsyonu, %3 (184 mmol/L): Çalışma solüsyonu için %100’lük stok TCA’dan 30 mL alındı ve deiyonize su ile 1000 mL’ye tamamlandı. Dikkatlice karıştırıldıktan sonra oda ısısında ve koyu renk bir şişede saklandı.

Serum fizyolojik (SF) solüsyonu, %0,9 (154 mmol/L): 9 g NaCl bir miktar deiyonize suda çözüldü ve 1000 mL’ye tamamlandı. SF solüsyonu da oda ısısında saklandı.

Yapılışı: Çalışma sırasında örnek ve reaktiflerin oda ısısında olmasına dikkat edildi. Striple daha önce +3 veya daha fazla protein saptanan idrarlar SF ile ½ oranında dilüe edildi. Her örnek için bir kör ve bir test küveti kullanıldı ve öncelikle her ikisine de 0,5 mL idrar kondu. Daha sonra köre 2 mL SF ve test küvetine 2 mL %3’lük TCA eklendi. Bu küvetler hafifçe tersyüz edilerek karıştırıldı. 10 dakikalık bir inkübasyonu takiben 2 dakika içinde spektrofotometre ile 450 nm’de köre karşı okuma yapıldı. Kalibrasyon için Randox firmasının 100 mg/dL’lik protein kalibratörü kullanıldı ve iki nokta kalibrasyonu yapıldı. Çalışma sonunda örneklerden elde edilen absorbanslardan kalibrasyon eğrisine göre konsantrasyonlar hesaplandı. Dilüe edilen örneklerde sonuç dilüsyon faktörleri ile çarpıldı (15).

Kontrol ve presizyon çalışmalarında ise Randox firmasının 61 g/L’lik protein standardı dilüe edilerek hazırlanan 10 mg/dL, 80 mg/dL ve 200 mg/dL’lik standart solüsyonları kullanıldı. Linearite çalışması da aynı 61 g/L’lik protein standardı kullanılarak yapıldı.

3.2.4. SSA Presipitasyon Yöntemi

Prensibi TCA yöntemi ile tamamen aynıdır ve konsantre asitlerle proteinlerin çöktürülmesi esasına dayanır. Burada sadece presipitasyon için kullanılan asit farklıdır.

Kullanılan reaktifler:

SSA solüsyonu, %3 (118 mmol/L): 30 g SSA, 1000 mL deiyonize su içinde karıştırılarak çözülmesi sağlandı. Hazırlanan %3’lük SSA solüsyonu oda ısısında ve koyu renk bir şişede saklandı.

Serum fizyolojik (SF) solüsyonu, %0,9 (154 mmol/L): 9 g NaCl bir miktar deiyonize suda çözüldü ve 1000 mL’ye tamamlandı. SF solüsyonu da oda ısısında saklandı.

Yapılışı: Çalışma sırasında örnek ve reaktiflerin oda ısısında olmasına dikkat edildi. Striple daha önce +3 veya daha fazla protein saptanan idrarlar SF ile ½ oranında dilüe edildi. Her örnek için bir kör ve bir test küveti kullanıldı ve öncelikle her ikisine de 0,5 mL idrar kondu. Daha sonra köre 2 mL SF ve test küvetine 2 mL %3’lük SSA eklendi. Bu küvetler hafifçe tersyüz edilerek karıştırıldı. 6 dakikalık bir inkübasyonu takiben 2 dakika içinde spektrofotometre ile 620 nm’de köre karşı okuma yapıldı. Kalibrasyon için Randox firmasının 100 mg/dL’lik protein kalibratörü kullanıldı ve iki nokta kalibrasyonu yapıldı. Çalışma sonunda örneklerden elde edilen absorbanslardan kalibrasyon eğrisine göre konsantrasyonlar hesaplandı. Dilüe edilen örneklerde sonuç dilüsyon faktörleri ile çarpıldı (15).

Kontrol ve presizyon çalışmalarında ise Randox firmasının 61 g/L’lik protein standardı dilüe edilerek hazırlanan 10 mg/dL, 80 mg/dL ve 200 mg/dL’lik standart solüsyonları kullanıldı. Linearite çalışması da aynı 61 g/L’lik protein standardı kullanılarak yapıldı.

3.3. Kullanılan İstatiksel Yöntemler

Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde “SPSS for Windows 8.0” istatistik programı kullanıldı. Yöntemlerin arasındaki ilişkinin ortaya konulabilmesi için Pearson korelasyon analizi kullanıldı.

4. Bulgular

İdrarda total protein tayininde strip yöntemi ile PRM yönteminin karşılaştırılması tablo 4.1’de ve strip yönteminin tanısal değeri tablo 4.2’de gösterilmiştir.

İdrarda total protein tayininde PRM, TCA ve SSA yöntemleri ile elde edilen sonuçların ortalama değerleri ve minimum-maksimum değer aralıkları tablo 4.3’de gösterilmiştir.

Karşılaştırılan yöntemlerin gün içi ve günler arası presizyon değerleri tablo 4.4, tablo 4.5 ve tablo 4.6’da gösterilmiştir.

Çalışan üç yöntemin linearite üst sınırları tablo 4.7’de gösterilmiştir.

PRM, TCA ve SSA yöntemlerinin birbirleri arasında yapılan Pearson korelasyon analizine ait r ve p değerleri tablo 4.8’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. İdrarda total protein tayininde strip yöntemi ile PRM yönteminin karşılaştırılması

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| PRM (mg/dL) | n | Negatif | +1  (25 mg/dL) | +2  (75 mg/dL) | +3  (150 mg/dL) | +4  (500 mg/dL) |
| <10 | 188 | 168 | 20 |  |  |  |
| 10-24,9 | 84 | 32 | 52 |  |  |  |
| 25-74,9 | 68 | 3 | 22 | 35 | 7 | 1 |
| 75-149,9 | 32 |  | 2 | 6 | 19 | 5 |
| >150 | 58 |  |  |  | 11 | 47 |
| Toplam | 430 | 203 | 96 | 41 | 37 | 53 |

Tablo 4.2. İdrarda total protein ölçümünde strip yönteminin tanısal değeri

|  | Sensitivite (%) | Spesifite (%) | Pozitif Prediktif Değer (%) | Negatif Prediktif Değer (%) | Etkinlik (%) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Strip yöntemi | 85,5 | 89,4 | 91,2 | 82,8 | 87,2 |

Tablo 4.3. İdrarda total protein tayininde PRM, TCA ve SSA yöntemleri ile elde edilen sonuçların ortalama değerleri ve minimum-maksimum değer aralıkları

|  | n | Ortalama | MinimumMaksimum (mg/dL) |
| --- | --- | --- | --- |
| PRM | 82 | 58,74 | 1-224 |
| TCA | 82 | 56,57 | 2-220 |
| SSA | 82 | 63,65 | 2-240 |

Tablo 4.4. İdrarda total protein tayininde PRM, TCA ve SSA yöntemlerinin gün içi presizyon değerleri

|  | PRM (mg/dL) |  |  | TCA (mg/dL) |  | SSA (mg/dL) |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 10 | 80 | 200 | 10 | 80 | 10 | 80 |
| n | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Ortalama | 10,05 | 79,45 | 197,6 | 10,10 | 79,95 | 10,55 | 83,80 |
| SD | 0,604 | 1,637 | 1,698 | 1,252 | 3,486 | 1,050 | 3,747 |
| CV (%) | 6,01 | 2,06 | 0,85 | 12,40 | 4,36 | 9,95 | 4,47 |

Tablo 4.5. İdrarda total protein tayininde PRM, TCA ve SSA yöntemlerinin günler arası presizyon değerleri

|  | PRM (mg/dL) |  |  | TCA (mg/dL) |  | SSA (mg/dL) |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 10 | 80 | 200 | 10 | 80 | 10 | 80 |
| n | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Ortalama | 10,25 | 79,40 | 197,05 | 9,95 | 79,30 | 10,70 | 84,15 |
| SD | 0,786 | 2,500 | 2,305 | 1,234 | 3,979 | 0,923 | 4,518 |
| CV (%) | 7,67 | 3,14 | 1,16 | 12,40 | 5,01 | 8,62 | 5,37 |

Tablo 4.6. Karşılaştırılan yöntemlerin gün içi ve günler arası presizyon değerleri

|  | Gün içi CV (%) |  |  | Günler arası CV (%) |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | PRM | TCA | SSA | PRM | TCA | SSA |
| 10 mg/dL | 6,01 | 12,40 | 9,95 | 7,67 | 12,40 | 8,62 |
| 80 mg/dL | 2,06 | 4,36 | 4,47 | 3,14 | 5,01 | 5,37 |
| 200 mg/dL | 0,85 |  |  | 1,16 |  |  |

Tablo 4.7. Yöntemlerin linearite üst sınırları

|  | Linearite üst sınırı (mg/dL) |
| --- | --- |
| PRM | 534 |
| TCA | 264 |
| SSA | 286 |

Tablo 4.8. Yöntemler arası korelasyon

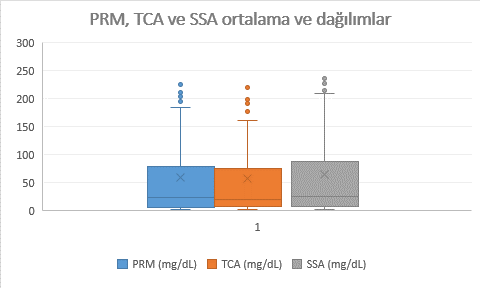
|  | n | r | P |
| --- | --- | --- | --- |
| PRM-TCA | 82 | 0,992 | <0,0005 |
| PRM-SSA | 82 | 0,993 | <0,0005 |
| TCA-SSA | 82 | 0,990 | <0,0005 |

Grafik 4.1. PRM ve TCA sonuçlarının serpme grafiği

Grafik 4.1. PRM ve SSA sonuçlarının serpme grafiği

Grafik 4.3. TCA ve SSA sonuçları ile PRM sonuçlarının karşılaştırılması

Grafik 4.4. Yöntemlerin protein aralıklarına göre ortalamaları



Tablo 4.9. Hasta sonuçları

| Hasta no | Strip (mg/dL) | PRM (mg/dL) | TCA (mg/dL) | SSA (mg/dL) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 25 | 44 | 40 | 50 |
| 2 | Negatif | 2 | 4 | 4 |
| 3 | 25 | 23 | 19 | 24 |
| 4 | 500 | 197 | 190 | 218 |
| 5 | 75 | 63 | 68 | 69 |
| 6 | Negatif | 29 | 16 | 24 |
| 7 | 25 | 29 | 24 | 30 |
| 8 | Negatif | 3 | 11 | 8 |
| 9 | 75 | 49 | 47 | 42 |
| 10 | 25 | 48 | 50 | 56 |
| 11 | 150 | 211 | 202 | 226 |
| 12 | 25 | 22 | 19 | 24 |
| 13 | Negatif | 2 | 8 | 6 |
| 14 | Negatif | 13 | 3 | 14 |
| 15 | Negatif | 4 | 7 | 4 |
| 16 | Negatif | 3 | 6 | 5 |
| 17 | Negatif | 2 | 10 | 4 |
| 18 | 75 | 72 | 77 | 88 |
| 19 | 25 | 26 | 18 | 28 |
| 20 | 500 | 194 | 182 | 214 |
| 21 | Negatif | 7 | 9 | 8 |
| 22 | Negatif | 5 | 10 | 4 |
| 23 | Negatif | 1 | 6 | 3 |
| 24 | 25 | 24 | 12 | 28 |
| 25 | 500 | 209 | 200 | 231 |
| 26 | 25 | 86 | 83 | 92 |
| 27 | Negatif | 7 | 7 | 9 |
| 28 | 150 | 182 | 176 | 199 |
| 29 | Negatif | 8 | 8 | 6 |
| 30 | 25 | 27 | 12 | 19 |
| 31 | 150 | 79 | 73 | 85 |
| 32 | Negatif | 21 | 11 | 26 |
| 33 | Negatif | 2 | 2 | 4 |
| 34 | Negatif | 9 | 10 | 13 |
| 35 | 25 | 38 | 43 | 41 |
| 36 | 75 | 39 | 41 | 46 |
| 37 | Negatif | 5 | 4 | 4 |
| 38 | Negatif | 3 | 4 | 6 |
| 39 | 75 | 36 | 34 | 30 |
| 40 | 25 | 51 | 48 | 45 |
| 41 | 25 | 1 | 3 | 3 |
| 42 | 500 | 206 | 220 | 219 |
| 43 | 500 | 203 | 196 | 227 |
| 44 | Negatif | 12 | 10 | 9 |
| 45 | Negatif | 4 | 6 | 7 |
| 46 | 500 | 217 | 200 | 240 |
| 47 | Negatif | 17 | 16 | 14 |
| 48 | 150 | 78 | 70 | 88 |
| 49 | Negatif | 3 | 4 | 2 |
| 50 | 500 | 210 | 198 | 236 |
| 51 | Negatif | 6 | 6 | 5 |
| 52 | Negatif | 2 | 3 | 3 |
| 53 | 25 | 40 | 32 | 46 |
| 54 | Negatif | 20 | 26 | 23 |
| 55 | Negatif | 4 | 7 | 5 |
| 56 | 150 | 183 | 160 | 200 |
| 57 | 150 | 162 | 158 | 182 |
| 58 | Negatif | 10 | 10 | 12 |
| 59 | 75 | 63 | 65 | 69 |
| 60 | 150 | 96 | 94 | 110 |
| 61 | 75 | 123 | 134 | 138 |
| 62 | Negatif | 7 | 9 | 10 |
| 63 | Negatif | 1 | 3 | 3 |
| 64 | 25 | 23 | 24 | 28 |
| 65 | 75 | 65 | 61 | 71 |
| 66 | 75 | 69 | 65 | 78 |
| 67 | Negatif | 4 | 4 | 5 |
| 68 | 25 | 60 | 62 | 69 |
| 69 | 500 | 212 | 192 | 200 |
| 70 | Negatif | 15 | 16 | 17 |
| 71 | 150 | 143 | 126 | 154 |
| 72 | Negatif | 6 | 6 | 7 |
| 73 | Negatif | 5 | 3 | 5 |
| 74 | 150 | 178 | 180 | 186 |
| 75 | 500 | 224 | 202 | 208 |
| 76 | Negatif | 4 | 3 | 6 |
| 77 | Negatif | 5 | 3 | 8 |
| 78 | 150 | 174 | 178 | 190 |
| 79 | Negatif | 8 | 10 | 11 |
| 80 | Negatif | 4 | 3 | 7 |
| 81 | Negatif | 7 | 6 | 8 |
| 82 | 150 | 68 | 71 | 74 |

Tablo 4.10. Presizyon sonuçları (mg/dL)

|  | Gün içi |  |  |  |  |  |  | Günler arası |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | PRM |  |  | TCA |  | SSA |  | PRM |  |  | TCA |  | SSA |  |
| Çalışma No | 10 | 80 | 200 | 10 | 80 | 10 | 80 | 10 | 80 | 200 | 10 | 80 | 10 | 80 |
| 1 | 10 | 82 | 196 | 9 | 78 | 11 | 85 | 11 | 82 | 195 | 9 | 85 | 11 | 85 |
| 2 | 10 | 78 | 199 | 11 | 82 | 12 | 83 | 10 | 77 | 197 | 11 | 84 | 12 | 84 |
| 3 | 9 | 77 | 200 | 9 | 76 | 9 | 87 | 9 | 76 | 199 | 10 | 83 | 11 | 88 |
| 4 | 9 | 77 | 200 | 11 | 76 | 9 | 85 | 9 | 80 | 196 | 8 | 78 | 11 | 86 |
| 5 | 10 | 81 | 197 | 8 | 86 | 10 | 82 | 10 | 83 | 195 | 12 | 80 | 10 | 85 |
| 6 | 10 | 80 | 199 | 11 | 77 | 11 | 75 | 10 | 81 | 199 | 11 | 78 | 10 | 74 |
| 7 | 11 | 79 | 201 | 10 | 79 | 12 | 84 | 10 | 81 | 201 | 11 | 76 | 10 | 84 |
| 8 | 10 | 77 | 196 | 10 | 86 | 11 | 80 | 11 | 78 | 199 | 10 | 77 | 11 | 84 |
| 9 | 10 | 81 | 197 | 8 | 84 | 11 | 85 | 11 | 76 | 196 | 10 | 81 | 9 | 86 |
| 10 | 11 | 80 | 196 | 10 | 81 | 10 | 86 | 9 | 82 | 194 | 12 | 79 | 11 | 86 |
| 11 | 10 | 80 | 199 | 11 | 75 | 10 | 83 | 10 | 77 | 197 | 8 | 84 | 12 | 83 |
| 12 | 10 | 80 | 198 | 11 | 83 | 9 | 86 | 10 | 80 | 195 | 8 | 76 | 12 | 91 |
| 13 | 10 | 78 | 196 | 12 | 76 | 11 | 85 | 10 | 75 | 201 | 10 | 75 | 11 | 83 |
| 14 | 10 | 82 | 198 | 9 | 78 | 12 | 86 | 10 | 81 | 200 | 9 | 84 | 10 | 88 |
| 15 | 9 | 81 | 196 | 11 | 80 | 12 | 84 | 77 | 83 | 194 | 9 | 80 | 10 | 83 |
| 16 | 11 | 80 | 195 | 10 | 85 | 11 | 82 | 77 | 80 | 196 | 10 | 73 | 9 | 85 |
| 17 | 10 | 80 | 196 | 8 | 82 | 9 | 86 | 10 | 77 | 198 | 11 | 82 | 11 | 86 |
| 18 | 10 | 79 | 197 | 12 | 78 | 10 | 85 | 12 | 79 | 198 | 9 | 79 | 11 | 76 |
| 19 | 10 | 80 | 199 | 10 | 78 | 11 | 83 | 10 | 82 | 198 | 11 | 85 | 12 | 79 |
| 20 | 11 | 77 | 197 | 11 | 79 | 10 | 84 | 11 | 78 | 195 | 10 | 77 | 10 | 87 |

5.Tartışma ve Sonuç

Proteinüri bazı durumlarda vücudun fizyolojik bir cevabı iken, bazı durumlarda ise patolojik bir bulgudur. Çeşitli böbrek hastalıklarının tanı ve takibinde kullanılan önemli parametrelerden birisidir. Ayrıca diabetik nefropati ve kardiovasküler hastalık mortalitesi için de iyi bir gösterge olduğundan, günümüzde idrarla atılan total protein miktarının kesin olarak ölçülmesi büyük önem taşımaktadır.

Uygulaması çok kolay ve ucuz bir yöntem olduğundan idrarda protein tayininde striplerin özel bir yeri vardır. Proteinüri taramasında en çok kullanılan metottur (1,6). Rutin idrar tetkiki sırasında striple proteinüri saptanması oldukça sık karşılaşılan bir bulgudur. Çeşitli çalışmalara göre normal popülasyondaki proteinüri insidansı %0,6 ile %10,7 arasında değişmektedir (8). Bu konuda Pugia ve arkadaşları tarafindan 6197 birey ile yapılan bir çalışmada kişilerin %3,0'ünde striple +1 (>30mg/dL) proteinüri saptanmıştır (41).

Asemptomatik erişkinlerde rutin idrar tetkikleri sırasında strip testleri ile bulunan proteinürinin prognostik önemi Framingham çalışmasında da araştırılmıştır. Bu çalışmada 5209 sağlıklı birey, 16 yıl boyunca izlenmiş ve çeşitli zamanlarda yapılan rutin idrar tetkiklerinde %0,3 ile %7,0 arasında proteinüri saptanmıştır. Çalışmanın sonunda proteinüri saptanan bireylerdeki morbidite ve mortalite riskinin genel sağlıklı popülasyona göre 2-5 kat arttığı görülmüştür. Framingham çalışmasına göre idrarda protein tayininde kullanılan testin sensitivitesi ne olursa olsun, proteinüri, sağlıklı insanlarda beklenmeyen bir durumdur. Rutin idrar tetkiki sırasında proteinüri saptanırsa, kişide ya hipertansiyon, diabetes mellitus, kardiovasküler veya renal bir hastalık vardır ya da ileride gelişecektir. Bu çalışmaya göre proteinüri tespit edildiğinde dikkatli olunmalı ve proteinüri sürekli ise ileri tetkik yapılmalıdır (14).

Proteinürinin tanısal ve prognostik olarak incelenmesinde en çok 24 saatlik idrar örnekleri kullanılır (14). Bu örneklerde striple protein tayininin doğruluğu oldukça zayıftır. Yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar çok fazladır (40).

Biz çalışmamızda, 24 saatlik idrar örneklerinde striple protein tayinin sensitivitesini %85,5 ve spesifitesini ise %89,4 olarak bulduk. Benzer bir çalışmada Higby ve arkadaşları tarafindan 690 gebe ile yapılmış ve bu çalışmada sensitivite %36, spesifite %97 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada sensitivite ile spesifite arasında oldukça büyük bir fark bulunmasının nedeni seçilen gruptaki pozitif sonuçların çok az olması olarak yorumlanmıştır (40). Diğer bir çalışma da Pugia ve arkadaşları tarafından 598 hasta ile yapılmıştır ve burada da sensitivite %95,1 ve spesifite %95,5 olarak saptanmıştır (41). Bizim bulduğumuz sonuçlar bu çalışmaların sonuçları ile uyumludur. Sonuç olarak stripler, idrarda protein tayininde tarama testi olarak oldukça başarılıdır. Bununla beraber, globulinlere sensitivitesinin düşük olması ve kantitatif sonuç vermemesi nedeniyle, striplerin sadece tarama amaçlı kullanılması ve proteinüri tespit edildiğinde önce testin tekrar edilmesi, ardından da kantitatif total protein tayini yapılması izlenecek uygun bir yoldur.

İdrarda total protein ölçümü, labaratuvar analizleri arasında doğruluk ve presizyon açısından en problemli olanlardan birisidir. Bugüne kadar idrarla atılan total protein miktarının kantitatif ölçümü için birçok yöntem geliştirilmiş fakat çeşitli nedenlerle tek bir metot standart yöntem olarak geniş bir kabul görmemiştir. Geliştirilen yöntemlerin presizyon, hassasiyet ve doğruluklarının karşılaştırıldığı birçok çalışma yapılmıştır (21,24,25,26,37,42,43)

McElderry ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, CBB, Ponceau S, BZC, TCA-biüret ve tannik asit presipitasyon yöntemleri doğruluk, presizyon, uygulama kolaylığı ve maliyet açısından karşılaştırılmıştır. Buradaki en kötü presizyon değerleri (%6-%19,5) türbidimetrik yöntemlerle elde edilmiş, diğer yöntemlerin doğruluk ve presizyonları birbirlerine yakın bulunmuştur. Sonuç olarak bu çalışmaya göre idrarda total protein tayininde tercih edilmesi gereken yöntemler Ponceau S ve CBB'dir (2).

İngiltere'de Chambers ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada 350 laboratuvara 15 ay boyunca örnekler gönderilmiş ve idrarda total protein tayini için kullanılan yöntemler karşılaştırılmıştır. Bu laboratuvarlardan %57'si türbidimetrik (TCA, SSA, BZC), %25'i boya bağlayıcı (CBB, Ponceau S) ve %15'i biüret yöntemini kullanmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre laboratuvarlar arası ortalamalar birbirine oldukça yakın olmasına rağmen bütün yöntemlerin presizyonları kötü bulunmuştur. SSA'nın presizyonunun çok kötü (%44) olması, sonuçlarında genel bir yükseklik olması ve yanlış pozitif sonuçların fazla olması nedeniyle kesinlikle kullanılmaması tavsiye edilmiş ve idrarda total protein ölçümü için daha spesifik yeni metotların geliştirilmesi gerektiği vurgulanmıştır (4).

Lorentz ve Weib ise yaptıkları çalışmada BZC, TCA, CBB, tannik asit presipitasyon ve biüret metodunu karşılaştırmışlardır. Bu çalışmaya göre doğruluk ve presizyonu en iyi olan biüret yöntemidir ve idrarda total protein ölçümünde tercih edilmelidir (42).

İdrarda total protein tayininde kullanılan yöntemlerin karşılaştırıldığı bir diğer çalışma da Dilena ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada SSA, TCA, CBB, Ponceau S ve biüret metodu, doğruluk, presizyon ve kullanım kolaylığı yönünden karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre biüret metodu referans metot olarak gösterilmiş, fakat klinikte uygulanmasının çok zor olduğu da belirtilmiştir. Bu çalışmada, kullanımı kolay ve presizyonu iyi olan Ponceau S yönteminin klinik laboratuvarlarda kullanılması tavsiye edilmiştir (25).

Diğer bir çalışmada Lim ve arkadaşları türbidimetrik yöntemlerle CBB'yi karşılaştırmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, düşük molekül ağırlıklı proteinler turbidimetrik metotlarda tam çökmediğinden sorun yaratır. Lim'e göre CBB yöntemi presipitasyon gerektirmediğinden, idrarda total protein tayininde seçilmesi gereken metottur (32).

Avusturalya'daki laboratuvarlarda kullanılan idrarda total protein tayin yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışma da Shephard ve Penberthy tarafından yapılmıştır. Bu çalışmaya göre SSA yönteminin presizyonu çok kötüdür ve sonuçlarında anlamlı bir pozitif yükseklik vardır. Bu nedenle Shephard'a göre klinik laboratuvarlarda idrarda total protein tayininde SSA yöntemi kesinlikle kullanılmamalıdır. TCA ve Ponceau S metodunun beraber kullanılması, karşılaştırılan yöntemler arasında en başarılı olandır (26).

Bütün bu çalışmaların sonucunda boya bağlama yöntemleri, doğrulukları, presizyonlarının iyi olması ve uygulama kolaylıkları nedeniyle, idrarda total protein tayininde ön plana çıkmıştır. 1983 yılında Fujita tarafindan bulunan bir boya bağlama metodu olan PRM'nin kullanımı günümüzde giderek yaygınlaşmaktadır.

Watanabe ve arkadaşları PRM metodunu otomatize etmiş ve TCA-biüret metodu ile karşılaştırmıştır. Bu çalışmaya göre PRM metodunun biüret metodu ile korelasyonu oldukça iyi ve presizyonu da gün içi ve günler arası %CV olarak sırası ile %3,3 ve %2,9 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada linearite sınırları 10-16000 mg/L olarak tespit edilmiştir (17).

PRM yöntemi ile türbidimetrik yöntemler ve CBB'nin karşılaştırıldığı bir diğer çalışma da Orsonneau ve arkadaşlan tarafından yapılmıştır. Bu çalışmaya göre, PRM yönteminin globulin ve hafif zincirlere sensitivitesi oldukça yüksektir. Ayrıca jel filtrasyon + modifiye biüret metodu ile korelasyonu da iyidir. Orsonneau'ya göre idrarda total protein tayininde PRM yöntemi, türbidimetrik metotlardan daha başarılıdır ve rutin kullanım için tavsiye edilmiştir (24).

Boisson ve arkadaşları tarafından Fransa'daki laboratuvarlar arasında yapılan bir çalışmada, idrarda tayini yapılan 13 madde arasında presizyonu en kötü olanın total protein olduğu görülmüştür. Bunun nedeni 1986 yılına kadar idrarda total protein tayininde SSA'nın çok kullanılması ve presizyonunun kötü olmasıdır. Bu çalışmaya göre 1989'dan sonra PRM ve CBB'nin kullanımının yaygınlaşması ile beraber, idrarda total protein tayininin laboratuvarlar arası presizyonu da iyileşmiştir. Boisson'a göre, idrarda total protein tayininde PRM veya CBB yöntemi tercih edilmelidir (43).

Biz çalışmamızda, idrarda total protein tayininde ülkemizde halen sıklıkla kullanılmakta olan türbidimetrik TCA ve SSA yöntemleri ile, dünyada kullanımı giderek yaygınlaşan boya bağlama yöntemlerinden PRM metodunu karşılaştırdık. 82 örnekteki ortalama total protein miktarı PRM yönteminde 58,74 mg/dl, TCA yönteminde 56,57 mg/dl ve SSA yönteminde 63,65 mg/dl olarak bulundu. SSA yöntemindeki ortalamanın yüksekliği, Chambers, McElderry ve Shephard'ın çalışmalarında elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir (2,4,26). Karşılaştırılan 3 yöntemin korelasyonları da diğer çalışmalarda olduğu gibi birbirleri ile uyumlu bulundu (p<0,0005) (2,25). Yapılan presizyon çalışmasında PRM, TCA ve SSA yöntemlerinin gün içi %CV değerleri sırasıyla, 10 mg/dL için %6,01, %12,40 ve %9,95, 80 mg/dL için %2,06, %4,34 ve %4,47, günler arası %CV değerleri ise 10mg/dL için %7,67, %12,40 ve %8,62, 80 mg/dL için %3,14, %5,01 ve %5,37 olarak bulundu. Çalışmamızdaki TCA ve SSA yöntemlerinin presizyon değerlerindeki yükseklik, bu güne kadar yapılan çalışmaların büyük bir kısmı ile uyumludur (2, 4, 25, 26, 32, 41,43). Ayrıca yaptığımız çalışmada belirlenen linearite ust sınırları da PRM yönteminde 534 mg/dL, TCA yönteminde 264 mg/dL ve SSA yönteminde 286 mg/dL olarak bulundu.

Biz bu çalışmada, idrarda total protein ölçümünde PRM boya bağlama yönteminin sensitivite ve spesifitesinin, türbidimetrik TCA ve SSA yöntemlerine göre çok yüksek olduğunu tespit ettik. Hastanemiz gibi hasta adedinin çok yüksek olduğu birimlerde bir günde 600-700 kadar idrar analizi yapılmaktadır. Bu idrarların içinden ortalama 60-70 kadarının kantitaif protein miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu kadar yüksek miktardaki örneğin manuel olarak yapımı zor ve zaman alıcıdır. Biz bu çalışma ile, sensitivite, spesifite ve otomatize edilebilirliği yönünden PRM boya bağlama yönteminin, türbidimetrik TCA ve SSA yöntemlerine göre üstün ve uygulanabilir olduğunu tespit ettik.

ÖZET

Pyrogallol Red Molibdat Boya Bağlama Yöntemiyle İdrarda Total Protein Ölçümü ve Diğer Yöntemlerle Karşılaştırılması

Organizmanın en önemli yapı taşlarından biri olan proteinlerin idrarda normalden fazla bulunması bazı durumlarda vücudun fizyolojik bir cevabı iken, bazı durumlarda ise patolojik bir bulgudur. Proteinüri sadece çeşitli böbrek hastalıklarının tanı ve takibinde kullanılan önemli bir parametre olmakla kalmaz, aynı zamanda diabetik nefropati ve kardiyovasküler hastalık mortalitesi için de iyi bir göstergedir. Günümüzde idrarla atılan total protein miktarının kesin olarak ölçülmesi büyük önem taşımaktadır fakat idrarda total protein ölçümü, laboratuvar analizleri arasında doğruluk ve presizyon açısından en problemli olanlardan birisidir. Bu nedenle birçok yöntem geliştirilmiş ama tek bir metot standart bir yöntem olarak geniş bir kabul görmemiştir.

Biz çalışmamızda, 24 saatlik idrar örneklerindeki protein miktarının ölçümünde öncelikle strip yönteminin tanısal değerini bulmaya, daha sonra da pyrogallol red-molibdat, trikloroasetik asit ve sulfosalisilik asit yöntemlerini kullanarak, idrarda kantitatif total protein tayininde en uygun olanı belirlemeye çalıştık. Idrarda protein miktarının ölçümünde strip yönteminin sensitivitesini %85,5 ve spesifitesini %89,4 olarak bulduk PRM, TCA ve SSA yöntemlerindeki sonuçların ortalamalarını karşılaştırdığımızda, SSA yönteminde diğerlerine göre bir yükseklik olduğunu gördük. Presizyon çalışmasında ise PRM yöntemi, turbidimetrik TCA ve SSA yöntemlerinden daha iyi sonuçlar verdi ve aynı yöntemin linearite üst sınırı da diğerlerinden yüksek bulundu.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre idrarda protein tayininde strip yöntemi tarama testi olarak uygun bir yöntemdir ve striple protein tespit edilen örneklerde kantitatif total protein tayini yapılmalıdır. Ayrıca bizim sonuçlarımıza göre idrarda total protein ölçümünde PRM boya bağlama yöntemi, turbidimetrik TCA ve SSA yöntemlerine göre sensitivite, spesifite ve otomatize edilebilirliği açısından daha iyi bir yöntemdir.

SUMMARY

Determining Total Urinary Protein With Pyrogallol Red Molybdate Dye-Binding Method and Comparision With Other Methods

Occurance of proteins which are one of the most important elements of organism, higher than the normal amount is the physiological answer of the body in some cases, and the pathological diagnosis in other cases. Proteinuria is not only an important. parameter used in the diagnosis of the kidney diseases, but it is also a reliable indication for the mortalities happened due to diabetic nephropathy and cardiovascular diseases. Nowadays, definite determination of the total protein content discarded with urine is very important. But, among the laboratory analysis, measurement of the total protein is one of the important one in respect of accuracy and presicion. Therefore, although many methods have been developed up to now. non of them were accepted extensively as a unique standart method

In this study, first, we tried to find out the diagnosical worth of the strip method on the measurement of protein contents of the 24 hour urine samples. In addition, using pyrogallol red molybdate, trichloroacetic acid and sulfosalicylic acid methods, we tried to find out the most suitable method for the determination of quantitative total protein amount in urine. In the measurement of protein content, the sensitivity and specificity of the strip method were found %85,5 and %89,4 respectively. When the means of the results of PRM, TCA and SSA methods were compared, it was found out that the results of SSA method were higher. In case of presicion study, PRM method gave better results comparing with the results of TCA and SSA methods and upper linearity limit of that method was higher comparing with the others.

According to the results, as a screening throughly, strip method is a suitable method for the determination of protein content of urine, and the samples on which protein content measurement were carried out, should also be used for the determination of the quantitative total protein. In addition, according to the obtained results for the measurement of total protein in urine, PRM dye-binding method is better than turbidimetric TCA and SSA methods in respect of sensitivity, specificity and the suitability for automatisation.

KAYNAKLAR

1. Bernard, A., Lauwerys, R. R. Proteinuria: Changes and mechanisms in toxic nephropathies. Toxicology. 1991;21(5):373-405

2. McElderry, L. A., Tarbit, I. F., Cassells-Smith, A. J. Six methods for urinary protein compared. Clinical Chemistry. 1982;28(2):356-360.

3. Anderson, S. C, Cockayne, S. Clinical Chemistry Concepts and Applications. 1993:376-377.

4. Chambers, R. E., Bullock, D. G., Whicher, J. T. External quality assessment of total urinary protein estimation in the United Kingdom. Annals of Clinical Biochemistry. 1991;28:467-473.

5. Keane, W. F. Proteinuria: Its clinical importance and role in progressive renal disease. American Journal of Kidney Diseases 2000;35(4); suppl 1:97-105.

6. Glassock, R. J., Massry, S. G. Textbook of Nephrology. Third Edition 600-604.

7. Burtis, C. A., Ashwood, E. R. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Third Edition:512-514.

8. Bishop, M. L., Duben-Engelkirk, J. L., Fody, E. P. Clinical Chemistry. Third Edition: 195-197

9. Peterson, J. C., Adler, S., Burkart, J. M. Greene, T., Hebert, L. A, Hunsicker, L. G, King, A. J., Klahr, S., Massry, S. G., Seifter, J. L. Blood pressure control, protinuria, and the progression of renal disease. Annals of Internal Medicine. 1995;123(10):754-762

10. Bernard, D. B., Salant, D. J., Jacobson, H. R., Striker, G. E., Klahr, S. The Principles and Practice of Nephrology. Second Edition: 110-121. 11. D'Amico, G. The clinical role of proteinuria American Journal of Kidney Diseases. 1991;17(5); suppl 1:48-52.

12. Gwinner, W., Frei, U., Matthies, C., Koch, K. M. Stolte, H. Glomerular barrier function for serum proteins in experimental heart failure. Kidney, Proteins and Drugs. 1990;83:144-150.

13. Cupisti, A., Morelli, E., Ciardella, F., Schipani, G., Guidi, Barsotti, G. Dietary proteins affect proteinuria in primary membranous glomerulonephritis with nephrotic syndrome and normal renal function. Kidney, Proteins and Drugs 1990;83:166-169.

14. Kannel, W. B., Stampfer, M. J., Castelli, W. P., Verter, J. The prognostic significance of proteinuria: The Framingham Study. American Heart Journal. 1984;108(5):1347-1351.

15. Baver, J.D., Ackermann. P. G., Toro, G. Clinical Laboratory Methods. Eight Edition: 1319-1325

16. Adler, S. G., Glassock, R. J., Massry, S. G. Textbook of Nephrology. Third Edition:1768-1770.

17. Watanabe, N., Kamei, S., Ohkubo, A., Yamanaka, M., Ohsawa, S., Makino, K, Tokuda, K. Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. Clinical Chemistry. 1986,32(8) 1551-1554.

18. Lynch, K. M., Sellers, T. S., Gossett, K. A. Evaluation of an automated pyrogallol red-molybdate method for the measurement of urinary protein in rats. European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry. 1996;34:569-571.

19. Edwars, J. J., Tollaksen, S. L., Anderson, N. G. Proteins of human urine. III Identification and two-dimensional electrophoretic map positions of some major urinary proteins. Clinical Chemistry. 1982;28(4):941-948.

20. Cheung, C. K., Mak, Y. T., Swaminathan, R. Automated trichloroacetic acid precipitation method for urine total protein. Annals of Clinical Biochemistry. 1987,24:140-144.

21. Nishi, H. H., Elin, R. J. Three turbidimetric methods for determining total protein compared. Clinical Chemistry. 1985;31(8):1377-1380.

22. Eckfeldt, J. H., Kershaw, M. J., Dahl, I. I. Direct analysis for urinary protein with biuret reagent, with use of urine ultrafiltrate blanking: Comparison with a manuel biuret method involving trichloroacetic acid precipitation. Clinical Chemistry. 1984;30(3):443-446.

23. Shahangian, S., Brown, P. L., Ash, K. O. Turbidimetric measurement of total urinary proteins: A revised method. American Journal of Clinical Pathology. 1984;81:651-654.

24. Orsonneau, J., Douet, P., Massoubre, C., Lustenberger, P., Bernard, S. An improved pyrogallol red-molybdate method for determining total urinary protein Clinical Chemistry. 1989;35(11):2233-2236. 25. Dilena, B. A., Penberthy, L. A., Fraser, C. G. Six methods for determining urinary protein compared. Clinical Chemistry. 1983;29(3):553-557.

26. Shephard, M. D., Penberty, L. A. Performance of quantitative urine analysis in Australasia critically assessed. Clinical Chemistry. 1987;33(6):792-795

27. Crofton, P. M. Positive and negative interference in the benzethonium chloride method for urine protein. Annals Clinical Biochemistry. 1989:26:104-105

28. Beilby, J. P., O'Leary, B. A. a-acid glycoprotein decreases recovery of total protein in urine when trichloroacetic acid is used to precipitate the proteins. Clinical Chemistry. 1990,36(3):565-567

29 Sykes, E., Gibson, M., Dmuchowski, C. Homogentisic acid interference in the measurement of urinary protein using benzethonium chloride. Annals of Clinical Biochemistry. 1996;33:86-88

30. Shojaee, N., Patton, W. F., Lim, M. J., Shepro, D. Pyrogallol red-molybdate: A reversible, metal chelate stain for detection of proteins immobilized on membrane supports. Electrophoresis. 1996;17:687-693.

31. Shiba, K. S., Kanamori, K., Harada, T., Nakao, M., Nakajima, K., Kodaira, T., Nakagawa, H. A cause of discrepancy between values for urinary protein as assayed by the coomassie brilliant blue G-250 method and the sulfosalicylic acid method. Clinical Chemistry 1985;31(7):1215-1218.

32, Lim, C. W., Chisnall, W. N., Stokes, Y. M., Debnam, P. M., Crooke, M. J. Effects of low and high relative molecular protein mass on four methods for total protein determination in urine. Pathology. 1990;22:89-92.

33. Yosselson-Superstine, S., Sinai, Y. Drug interference with urine protein determination. Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry. 1986;24(1): 103-106.

34. Lievens, M. M., Celis, P. J. Drug interference in turbidimetry and colorimetry of proteins in urine. Clinical Chemistry 1982,28(11) 2328.

35. Mashige, F., Ohkubo, A. Determination of proteins in urine by high performance liquid chromatography with spectrophotometric detection using a pyrogallol red-molybdate complex. Journal of Chromatography 1991;565:173-181.

36. Van Ingen, H. E. Automated analysis for urinary protein by pyrogallol red molybdate metod. Clinical Chemistry. 1990;36(4):702.

37. Marshall, T., Williams, K. M. Total protein determination in urine: Elimination of a differential response between the coomassie blue and pyrogallol red protein dye-binding assays. Clinical Chemistry. 2000;46(3):392-398

38. Matsushita, M., Ironi, T., Komoda, T., Sakagishi, Y. Determination of proteins by a reverse biuret method combined with the copper-bathocuproine chelate reaction. Clinica Chimica Acta. 1993;216:103-111. 39. Alam, A. A model of formulation of protein assay. Analytical Biochemistry 1992;203:121-126.

40. Higby, K., Suiter, C. R., Khodr, T. S. A comparison between two screening methods for detection of microproteinuria. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 1995,173 1111-4

41. Pugia, M. J., Lott, J. A., Kajima, J., Saambe, T., Sasaki, M., Kuromoto, K., Nakamura, R., Fusegawa, H., Ohta, Y. Screening school children for albuminuria, proteinuria and occult blood with dipsticks. Clinical Chemistry of Laboratory Medicine. 1999;37(2):149-157.

42, Lorentz, V. K., Weis, T. Proteinbestimmung im urin-Eine kritische übersicht. Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry. 1986;24:309-323.

43. Boisson, R. C., Eynard, J. C., Crozier, M., Grafmeyer, D. C. French experience of quality assessment of quantitative urinary analysis. Clinical Chimica Acta. 2000 Jul 1:297(1-2):285-295.

**Quantitative measurement of urinary proteins in 2018: advantages, disadvantages, limits**

[**https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30543186/**](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30543186/)

## Similar articles

* [Urinary proteins: up-to-date reference methods for urinary protein analysis.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30543188/)

Boutten A, Delatour V; groupe de travail SFBC, SFNDT, SNP.Ann Biol Clin (Paris). 2018 Dec 1;76(6):638-642. doi: 10.1684/abc.2018.1391.PMID: 30543188 English.

* [Urinary albumin measurement methods.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30543187/)

Benz-de Bretagne I, Roger C, Carlier MC; groupe de travail SFBC, SFNDT, SNP.Ann Biol Clin (Paris). 2018 Dec 1;76(6):633-637. doi: 10.1684/abc.2018.1390.PMID: 30543187 English.

* [A diagnostic programme for quantitative analysis of proteinuria.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2607321/)

Hofmann W, Guder WG.J Clin Chem Clin Biochem. 1989 Sep;27(9):589-600. doi: 10.1515/cclm.1989.27.9.589.PMID: 2607321

* [[Pyrogallic method for the determination of protein in urine (literature survey)].](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15584391/)

Kim IuV, Shibanov AN.Klin Lab Diagn. 2004 Oct;(10):3-7.PMID: 15584391 Review. Russian. No abstract available.

* [[Pyrogallol red technique is an alternative to routine urinary protein-determining methods].](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17682474/)

Pupkova VI, Prasolova LM.Klin Lab Diagn. 2007 Jun;(6):17-21.PMID: 17682474 Review. Russian.