

SLEDOVÁNÍ ČINNOSTI LEDVIN

(osmoregulace a exkrece)

Teoretický úvod

Osmoregulační a exkreční pochody, které probíhají u savců a člověka ve vylučovací soustavě v ledvině, slouží k udržování stálého vnitřního prostředí v organismu.

Činnost ledvin je zaměřena na to, aby byl zachován stálý objem, pH a stálé iontové složení tělních tekutin. Obecně lze říci, že osmoregulační pochody upravují v organismu především obsah solí a exkreční pochody snižují koncentrace látek, které jsou odpadním produktem metabolismu a to zejména metabolismu bílkovin. U savců je produktem metabolismu bílkovin močovina vytvářena v játrech. Exkreční pochody také odstraňují z těla pro metabolismus a organismus cizorodé látky (jako jsou např. léčiva a různé chemické látky přijaté do těla potravou).

Na zajištění stálého vnitřního prostředí organismu se kromě vylučovací soustavy podílejí také jiné orgány, které primárně slouží k zajišťování jiných funkcí. Například plíce odstraňují z těla CO₂ a tím přispívají k udržování stálého pH. Kůže transportuje z těla potními žlázami močovinu, sole, H₂O a některé metabolity jako např. kyselinu mléčnou.

Kromě vylučovací funkce produkují ledviny hormon *erythropoetin*, který stimuluje tvorbu *erytrocytů v kostní dřeni*. Ledviny aktivují vitamin D tak, že jej přeměňují na *kalcitriol*, který podporuje vstřebávání Ca⁺² a fosfátů ve střevě a v ledvině. Prostřednictvím *reninangiotensinového systému* ledviny řídí nejen *glomerulární filtraci*, ale také zvyšují systémový krevní tlak.

Anatomická stavba vylučovací soustavy a její cévní zásobení

Ledviny jsou párový orgán. Nacházejí se v dorzální části tělní dutiny, kde jsou uloženy podél páteře. Na podélném řezu ledvinou je anatomicky rozlišitelná tmavší kůra a světlejší dřev. V dřev jsou viditelné světlé, vazivové *ledvinové pyramidy*, tvořené svazky sběracích kanálků. Pyramidy ústí do *ledvinné pánvičky*, odkud se moč odvádí *močovodem* do *močového měchýře* (obr. 2).

Ledviny jsou metabolicky velmi aktivní orgány, proto jsou hojně zásobeny krví. (V klidu protéká ledvinou asi 1,2 litru krve za minutu, což představuje 25% minutového objemu srdečního). Přívod krve do ledvin zajišťuje *arterie renalis*, která odstupuje od břišní aorty a postupně se v ledvině větví na arterioly, které se dále v ledvině rozvětvují až na 2 speciálně organizované typy kapilárního řečiště. V ledvině jsou tato kapilární řečiště označována jako *vysokotlaké kapilární řečiště* a *nízkotlaké kapilární řečiště*. *Vysokotlaké kapilární řečiště* tvoří *glomeruly*, které jsou uloženy v *Bowmanových váčcích*. *Nízkotlaké* cévní řečiště, tvoří síť kapilár, které se nacházejí v okolí nefronových tubulů v dřev ledviny, tyto kapiláry se nazývají *peritubulární kapiláry*. *Nízkotlaké*, peritubulární kapiláry zajišťují kromě výživy ledvinové tkáně také zpětnou resorpci H₂O, iontů a živin, které se resorbovali z tubulů nefronů, zpět do krevního řečiště (obr.3)

Základní funkční jednotkou v ledvině je **nefron**. U člověka obsahuje 1 ledvina asi 1 milion nefronů (obr.3). Každý nefron se skládá z části cévní- glomerulu a z části tubulární. Glomeruly jsou uloženy v kůře ledvin, tubulární část nefronů a sběrné kanálky jsou uloženy hlouběji v dřeni ledviny. Nefrony začínají jako váčky, tzv. *Bowmanovy váčky*, do kterých jsou zanořeny kapiláry tvořící *glomerulus*. Kapiláry jsou v glomerulu uspořádány jako smyčky, kterými protéká krev. Do glomerulu (obr.4) je přiváděna krev *přívodnou arterioulou*, která se nazývá *vas afferens*. Z kapilár tvořících glomerul je krev odváděna *vas efferens*. Tyto odvodné tepénky se rozvětvují na druhotnou síť kapilár, které jako tzv. *peritubulární kapiláry* obklopují tubulární části nefronu.

Bowmanovy váčky přecházejí do tubulárního systému nefronu. Počáteční část tubulu se několikrát stáčí a nazývá se proto *proximální vinutý kanálek*. Následující část tubulu má tvar písmene U a nazývá se *Henleova klička*. Henleova klička sestupuje do dřene ledviny. Rozeznáváme její tenkostěnnou část sestupnou a silnostěnnou vzestupnou. Vzestupná část Henleovy kličky přechází v *distální vinutý kanálek*, který se nachází opět v kůře ledviny. Několik distálních kanálků ústí do jednoho *sběrného kanálku*, který sestupuje do dřene ledviny. Sběrné kanálky se spojují v ledvinné pyramidy, které jako tzv. papily ústí do *ledvinové pánvičky*.

Činnost ledviny

Činností ledviny vzniká moč. Tvorba moči v ledvině je založena na 3 základních dějích, které probíhají v určitých částech nefronu.

Jsou to: *glomerulární filtrace, tubulární resorpce a tubulární sekrece (obr.5)*.

Glomerulární filtrace

Filtrace krevní plazmy probíhá v glomerulu a její velikost závisí na průtoku krve a krevním laku v glomerulu (tlak krve v glomerulu je 2 krát vyšší než v jiných kapilárách a činí asi 45 –50 mmHg). Ledvinami člověka proteče 1 500 litrů krve denně. Z toho se 150 litrů tekutiny v glomerulech profiltruje. Objem moče za 24 hod je však pouze 1,5 litrů tzn., že 99% profiltrované tekutiny z krevní plazmy se vrací zpět do krevního oběhu. Objem plazmy, který činí přibližně 3 litry, se tak denně v ledvinách přefiltruje asi 50 až 60 krát.

Tlak krve v glomerulech, na kterém závisí filtrace se mění změnou průsvitu arterioly. Přívodné tepénky (*vas afferens*) jsou širší než odvodné (*vas efferens*) a toto uspořádání zajišťuje vyšší tlak v glomerulu potřebný pro filtraci krevní plazmy.

Průsvit arterioly upravují také svou činností vegetativní nervy a vlastní autoregulační mechanismus ledviny, který funguje jako tzv. *renin angiotensinový systém*. Renin vzniká v buňkách *juxtaglomerulárního aparátu*, v místě ústí *vas afferens* do glomerulu (obr.3). Renin odštěpí část aminokyselin z proteinu *angiotensinogenu*, který vzniká v játrech. Takto vznikne hormon *angiotensin I*. Odštěpením dalších 2 aminokyselin z angiotensinu I tzv.konvertujícím enzymem vzniká *angiotensin II*. Angiotensiny I a II mají silné vasokonstrikční účinky zejména na efferentní arterioly. Zvyšují tak krevní tlak a tím i filtraci v glomerulu (obr.5).

(Krevní tlak v glomerulu zvyšují také hormony kůry i dřene nadledvin, antidiuretický hormon ADH. Opačný účinek mají dopamin, bradykinin a atrium natriuretický faktor ANF ze srdečních síní.Tyto látky snižují tlak,snížují vstřebávání sodíku a zvyšují diurézu.

Činnost proximálního tubulu

V proximálním tubulu nefronu se z glomerulárního filtrátu vstřebává všechna glukóza, aminokyseliny a ionty Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- a fosfátové anionty. Pasivně se za ionty vstřebává H_2O . Z proximálního tubulu odchází do *Henleovy kličky isoosmotická tekutina* s extracelulární tekutinou.

Činnost Henleovy kličky

Zjednodušeně lze shrnout, že v sestupném tenkostěnném raménku i ve vzestupném, silnostěnném raménku Henleovy kličky se intenzivně transportují ionty Na^+ (a Cl^-) do dřeně ledviny. Okolní dřeň se stává silně hypertonická. Zejména na vrcholu kličky. (Pasivně za ionty přechází z tenkostěnného raménka do dřeně i voda). Silnostěnná část vzestupného raménka je nepropustná pro H_2O . Proto je tekutina ve vzestupném raménku a na konci Henleovy kličky vzhledem ke krvi hypotonická.

Činnost Henleovy kličky slouží k vytvoření hypertonického prostředí v okolí sběrných kanálků v dřeni ledviny. Vytvoření hypertonického prostředí pak přispívá k zahušťování moče, neboť voda ze sběrných kanálků snadno pasivně přechází do hypertonického prostředí v dřeni ledviny.

Činnost distálního tubulu a sběrného kanálku

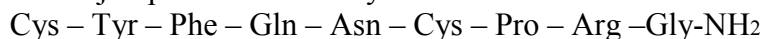
V distálním tubulu se vstřebávají ionty, zejména sodné. (V ledvině se zpětně resorbuje 99% Na^+ iontů z tubulů do dřeně. Ionty K^+ se v takové míře neresorbují a organismus je ztrácí močí). Množství resorbovaných iontů z tubulů zpět do ledviny a organismu závisí kromě osmolarity filtrátu hlavně na působení *mineralokortikoidních hormonů kůry nadledvin*. Na vstřebávání iontů z tekutiny v distálním tubulu má z kortikosteroidních hormonů největší účinek hormon *aldosteron* (obr.6). *Kortikosteroidní hormony kůry nadledvin jsou pro život nezbytné. Jejich nedostatek vede ke ztrátám a nedostatku sodíku a nadbytku draslíku v organismu. Důsledkem vylučování vysokého množství sodíku dochází také k nadměrné diuréze. Ztráty vody pak způsobují pokles objemu krve v organismu. Tento stav vede až k selhání krevního oběhu a smrti jedince.*

(Propustnost distálního tubulu pro močovinu je malá a proto se močovina v distálním tubulu koncentruje).

Ke snížení objemu tekutiny (moče) na konci distálního tubulu a hlavně ve sběracích kanálkách dochází působením *antidiuretického hormonu ADH nebo-li argininu-vasopresinu*.

Kontrola hospodaření vodou v ledvině

Klíčový hormon regulující hospodaření vodou u savců a člověka je *antidiuretický hormon ADH*, označovaný také jako *arginin-vasopresin (AVP)*. ADH je polypeptid skládající se z 9 aminokyselin následující primární struktury:



Jeho syntéza probíhá v neuronech *paraventrikulárního a supraoptického jádra* v hypothalamu, odkud se axonálním transportem dostává do zadního laloku hypofýzy (do *neurohypofýzy*). Z neurohypofýzy je ADH uvolňován do krve. Hlavním místem jeho působení v ledvině jsou sběrací kanálky, které se jeho působením stávají propustné pro H_2O . Voda ze sběracích kanálků odchází do hypertonické dřeně ledviny. Moč se zahušťuje a stává se hypertonickou proti krevní plazmě. Objem moče se tak podstatně zmenšuje a nedochází ke ztrátám vody z organismu. Celkový objem moče (diureza) činí u člověka 1,5 litrů za 24 hodin. Z vývojového hlediska je zajímavé, že humorální, látkové řízení hospodaření vodou je obdobné u všech živočišných tříd.

Na molekulární úrovni působí ADH (nebo-li AVP) na specifické membránové receptory, označované jako V₂ receptory. Receptory V₂ se nachází v plazmatických membránách epiteliálních buněk sběracích kanálků. Přenos signálu po navázání hormonu AVP na V₂ receptory do buňky zprostředkuje jako druhý posel cAMP. Konečným výsledkem působení AVP na molekulární úrovni je vytvoření selektivních kanálků pro molekuly H₂O v membránách buněk sběracích kanálků. (Tvorby kanálků se účastní specifické proteiny *akvaporiny a synaptobrevin – like II protein*)

Vrozená genetická porucha tvorby ADH (nebo-li AVP) hormonu v hypothalamických jádrech a nebo genetická porucha struktury V₂ receptoru (obr.)se projevuje onemocněním nazývaným diabetes insipidus (úplavice močová). Při této chorobě postižená osoba nebo zvíře trpí nadměrnou diurézou (u takto nemocného člověka bývá diuréza až 10 krát zvýšená a činí denně okolo 15 litrů). Nadměrné ztráty tekutin musí organismus kompenzovat nadměrným pitím.

Vylučování iontů ledvinou (zejména H⁺ , bikarbonátových a fosfátových iontů) má také význam pro udržování stálé acidobazické rovnováhy (pH) v organismu. (Význam činnosti ledvin pro udržování stálé acidobazické rovnováhy (pH) v tělních tekutinách si prostudujte v doporučených učebních textech pro přednášku z fyziologie živočichů).

Praktická část

Sledování činnosti ledvin, úkoly a cíle práce praktického cvičení

1. stanovte diurézu u potkana za 24 hodin

2. sledujte vylučovací činnost ledviny, kvantitativně stanovte obsah močoviny v plazmě a moči potkana

3. stanovte hodnoty glomerulární filtrace u potkana z clearance kreatininu

1) Stanovení diurézy u potkana za 24hod

- pokusné zvíře o známé hmotnosti umístěte do metabolické komory a za 24 hodin změřte objem produkované moče.
- do protokolu zaznamenejte také množství tekutiny, které pokusné zvíře za 24 hodin vypilo

2) Stanovení močoviny

Stanovení močoviny v moči a v krevní plazmě potkana se provádí kolorimetricky, enzymatickým testem. Princip stanovení je založen na štěpení močoviny působením enzymu ureázy na amoniak a oxid uhličitý. Reakcí amoniaku s 3-metyl-6-isopropylfenolem a alkalickým chlornanem vzniká barevný indofenol (Berthelotova reakce), který kolorimetricky stanovujete při vlnové délce 650 nm. Při dodržení podmínek reakce je vzniklé zbarvení přímo úměrné koncentraci sledované látky.

Potřeby: metabolická komora, sada pipet a mikropipet, spektrofotometr, odměrný válec, stojánek a zkumavky, špičky k pipetám, kádinky, stříčka s destilovanou H₂O.

Reagencie: Roztok fosforečnanového pufru pH 6,8 mmol/l + enzym ureáza + nitroprussid sodný 3mmol/l + 3-metyl-6-isopropylfenol 2mmol/l, NaOCl 15 mmol/l

Standardy močoviny: 15 mmol/l (45 mg do 50 ml)

Pracovní postup

Před stanovením se moč zředí destilovanou vodou v poměru 1: 99 (100 krát). Naředěné vzorky moče se zpracují podle následujícího schématu.

Do 10 ml nebo 5 ml skleněných zkumavek pipetujte:

	Zk.č.1,2,3 moč	Zk.č.4,5,6 plazma	Zk.č.7,8,9 standard	Zk.č.10,11,12 blank
činidlo (enzym + pufr + nitroprussid sodný + metyl-isopropylfenol)	750 µl	750 µl	750 µl	750µl
vzorek (ředěná moč a plazma)	5 µl	5µl	---	---
destilovaná voda	---	---	---	5 µl
standard močoviny	---	---	5 µl	---

Zkumavky nechte 15 minut inkubovat. Po uplynutí inkubace přidejte do každé zkumavky 250 µl oxidačního roztoku (NaOCl + NaOH).

Změřte na spektrokolorimetru absorbanci při vlnové délce 650 nm proti vodě. Barevný komplex je stálý do 60 min.

Pro přesnější stanovení pracujte v tripletech. Naměřené a vypočtené průměrné hodnoty uveďte do protokolů.

Výpočet koncentrace močoviny ve sledovaných vzorcích :

$$\text{Močovina mmol/l} = a \cdot A_1 / A_2$$

A₁ absorbance vzorku, A₂ absorbance standardu, a = konc. močoviny ve standardu

3-1) Stanovení glomerulární filtrace (GRF) z clearance kreatininu

Glomerulární filtrace se určí tak, že se do krve vpraví infuzí indikátorová látka a stanovuje se kolik indikátorové látky se objeví za určitý časový úsek v moči. Přitom musí platit, že všechny indikátor přechází z krve pouze do definitivní moče, neboli jeho vyloučené množství se rovná jeho filtrovanému množství.

K tomu, aby byla splněna podmínka, že množství vyloučeného indikátoru je stejné jako jeho množství filtrované, musí indikátor splňovat tyto následující podmínky:

- dostává se do tubulů pouze filtrace v glomerulech
- nesmí být v tubulech resorbován
- nesmí být do tubulů secernován
- nesmí být v ledvině metabolisován
- neovlivňuje činnost ledviny

Vhodné látky, které splňují tyto podmínky jsou např. některé sacharidy (inulin, manitol). Rovněž v krvi stále přítomný kreatinin může do jisté míry být vhodnou látkou pro stanovení GRF.

Měření GRF budete provádět nepřímou, sledováním odstraňování určité látky (kreatininu) z krve. Pro její stanovení a výpočet se užívá anglický výraz clearance (vyčištění).

Pro výpočet clearance je nutno stanovit:

V_u produkci moče za určitou časovou jednotku

P_i koncentraci indikátoru v plazmě

U_i koncentraci indikátoru v moči

Pro výpočet clearance platí:

$$GRF \cdot P_i = V_u \cdot U_i$$

$$GRF = U_i \cdot V_u / P_i$$

Teoreticky u člověka platí:

$$V_u = 4 \text{ ml / min}$$

$$P_i = 2 \text{ mg / ml}$$

$$U_i = 60 \text{ mg / ml}$$

$$GRF = 60 \cdot 4 / 2 = 120 \text{ ml / min}$$

GRF = 7,2 l / hod 170 až 180 l / 24 hod se přefiltruje za jeden den

Při objemu krevní plazmy 3,5 l a objemu extracelulární tekutiny 14 l se směnitelná voda přefiltruje u člověka asi 13 krát a krevní plazma přibližně 40 až 50 krát.

3-2) Stanovení kreatininu

Kolorimetrické stanovení kreatininu v krevní plazmě (krevním séru) nebo v moči Jaffého reakcí .

Bílkoviny přítomné ve vzorcích se vysráží trichloroctovou kyselinou. Kreatinin přítomný ve vzorcích reaguje s přidaným roztokem kyseliny pikrové (kys. pikrová = trinitrofenol) a vytvoří s ní oranžově červený barevný komplex. Množství vytvořeného barevného komplexu je úměrné koncentraci kreatininu v analyzovaných vzorcích a kvantitativně se stanoví kolorimetricky.

Reagencie: Nasycený roztok kyseliny pikrové (asi 1,2 % při laboratorní teplotě), 7% roztok trichloroctové kyseliny (TCA), standardní roztok kreatininu (2mg/l 00ml)

Pracovní postup:

Vzorek analyzované moči se před stanovením zředí destilovanou vodou. Při normální produkci moče použijte zředění 1 : 49 (50 krát). Krevní plazmu použijte neředěnou. Vzorky biologického materiálu, standard kreatininu i blanku (slepý vzorek) zpracujete podle následující tabulky:

Do centrifugačních umělohmotných mikrozkušavek o objemu 1500 µl napipetujte:

!!!!TADY PRACUJEME V SINGLETU!!!!

	Moč	Plazma	Standard	Blank
objem vzorku	400 µl	400 µl	---	---
standard kreatininu	---	---	400 µl	---
H ₂ O	---	---	---	400 µl
TCA	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl

Zkušavky na automatické míchačce promíchejte a zcentrifugujte sraženinu. Použijte vysokoobrátkovou centrifugu a vzorky centrifugujte 2 min při 4 až 5 tisících otáčkách/min.

Do předem označených zkušavek pipetujte supernatant vzorků podle následující tabulky:

Důležité upozornění. Protože jde o kolorimetrické stanovení pracujte v **TRIPLETECH**. Tzn. každý vzorek připravíte 3x (3 zkušavky budou vždy stejně obsahovat standard, další 3 blank a další 3 vzorky biologického materiálu, tzn. moč a plazma).

	Zk.č. 1,2,3	Zk.č. 4,5,6	Zk.č. 7,8,9	Zk.č. 10,11,12
	Plazma	Moč	Standard	Blank
Supernatant	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl
Kyselina pikrová	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl
NaOH	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Po promíchání nechat 15 až 20 min stát. Vzniklý barevný komplex proměřit na spektrofotometru při vlnové délce 500 nm, proti vodě.

Výpočet koncentrace kreatininu (mg/ml plazmy)

$$C_s \times E_v / E_s$$

C_s = koncentrace standardu

E_v = absorbance vzorku

E_s = absorbance standardu

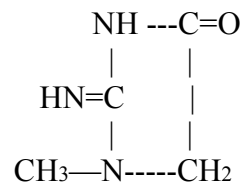
Normální hodnoty kreatininu v lidském séru se pohybují

u mužů v rozmezí 0,9 až 1,4 mg kreatininu /100 ml

u žen v rozmezí 0,8 až 1,2 mg kreatininu /100 ml

Průměrné množství vyloučeného kreatininu do moče u lidí činí za 24 hod 1,0 až 1,9 .

vzorec kreatininu:



Molekulová hmotnost kreatininu 113,1 g/mol