

**Kolektiv**

**Lékařská chemie, biochemie a  
molekulární biologie  
Praktická cvičení II**

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

**Ústav biochemie a experimentální onkologie  
Vedoucí ústavu: Prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc**

## **Autorský kolektiv:**

**RNDr. Eva Bubnová, CSc.**

**RNDr. Alena Buděšínská, CSc.**

**MUDr. Petr Bušek, Ph.D.**

**Doc. MUDr. Jaromír Křemen, CSc.**

**Doc. MUDr. Evžen Křepela, CSc.**

**Doc. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.**

**RNDr. Jana Soukupová, Ph.D.**

**MUDr. Jana Stříbrná, CSc.**

**Mgr. Lucie Stollinová Šromová, Ph.D.**

**Doc. MUDr. Michal Zikán, Ph.D.**

## Obsah

Kyselina močová .....	4
Rozpustnost kyseliny močové a jejich solí .....	5
Stanovení kyseliny močové v séru a v moči .....	6
Glykemie .....	8
Glukosový toleranční test, denní ztráty glukosy močí .....	9
Glykovaný hemoglobin .....	12
Monitorování glykemie pomocí glukometru GLUCOTREND® ROCHE .....	14
Xenobiochemie .....	16
Důkaz ethanolu ve vydechovaném vzduchu .....	17
1.1. Detekce ethanolu ve vydechovaném vzduchu .....	18
1.2. Výpočty koncentrace alkoholu v krvi .....	18
Identifikace cizorodých látek (xenobiotik) a jejich metabolitů v moči .....	19
2.1. Identifikace kyselých látek (amobarbital, fenobarbital, pentobarbital) .....	19
2.2. Identifikace bazických látek (chlorpromazin, levopromazin, prochlorperazin, thioridazin, chlorprothixen, kodein) .....	19
Stanovení koncentrace dusitanů ve vodě .....	21
Markery svalové tkáňě .....	23
Stanovení katalytické aktivity kreatinkinasy (CK) .....	27
Stanovení katalytické aktivity AST .....	29
Stanovení katalytické aktivity laktátdehydrogenasy (LD) .....	30
Stanovení AST (GOT) a CK pomocí přístroje REFLOTROK®, Roche .....	31
Clearance .....	32
Stanovení koncentrace kreatininu v séru a moči .....	35
Výpočet clearance .....	36

# Kyselina močová

**Klíčová slova:** degradace purinových nukleotidů, kyselina močová, alantoin.

## Reagencie:

1. koncentrovaný roztok amoniaku
2. kyselina močová
3. roztok hydroxidu sodného 2 mol/l **!ŽÍRAVINA!**
4. roztok hydroxidu lithného 0,5 mol/l
5. roztok chloridu amonného 1 mol/l
6. zředěná kyselina chlorovodíková 1:1
7. vzorek krevního séra
8. vzorek moče
9. souprava Kyselina močová (Biosystems):
  - a) pracovní roztok: fosfát 100 mmol/l, detergent 1,5 g/l, dichlorfenolsulfonát 4 mmol/l, urikasa >0,12 U/ml, ascorbát oxidasa >50 U/ml, peroxidasa >1U/mol, 4-aminoantipyrin 0,5 mmol/l, pH 7,8
  - b) standard

## **Rozpustnost kyseliny močové a jejich solí**

Kyselina močová (2,6,8-trihydroxypurin), hlavní produkt degradace purinových bází u primátů, je vylučována močí. Purinové jádro zůstává tedy během degradačního procesu intaktní.

Kyselina močová je látka nepatrně rozpustná ve vodě (25 mg/l při 18° C). Vůči bázím projevuje vlastnosti slabé dvojsytné kyseliny s hodnotami  $pK_A = 5,4$  a  $10,3$  při 25° C. Rozpustnost kyseliny močové se asi dvacetkrát zvýší v alkalických roztocích, v důsledku tvorby alkalických solí - urátů (viz Vlastnosti a reakce funkčních skupin biochemicky významných organických sloučenin, úloha 3.1.). Nejvíce rozpustný je urát lithný. Na rozdíl od běžných amonných solí je naopak urát amonný velmi málo rozpustný.

### **Pracovní postup:**

- Do tří zkumavek dejte vždy velmi malé množství kyseliny močové a 1 ml vody, protřepejte. Většina látky zůstane nerozpuštěna.
- Do první zkumavky přidejte 1 ml roztoku hydroxidu sodného.
- Do druhé zkumavky přidejte 1 ml koncentrovaného vodného roztoku amoniaku.
- Do třetí zkumavky přidejte 1 ml roztoku hydroxidu lithného.
- Porovnejte rozpustnost vznikajících solí.
- Obsah zkumavky s urátem lithným rozdělte na dvě části.
- K první části přikapávejte roztok chloridu amonného a pozorujte vylučování málo rozpustného urátu amonného.
- Druhý díl urátu lithného pomalu okyselujte přikapáváním zředěné kyseliny chlorovodíkové a pozorujte srážení kyseliny močové.

### **Poznámky:**

## Stanovení kyseliny močové v séru a v moči

Zvýšená koncentrace kyseliny močové v krvi (hyperurikémie) může být důsledkem její zvýšené tvorby (včetně zvýšeného přísunu potravou), zvýšeného rozpadu buněk (maligní procesy, leukémie) nebo jejího sníženého vylučování ledvinami. Hyperurikémie může vést k ukládání málo rozpustných krystalů kyseliny močové do tkání a kloubů (dna). Kyselina močová a její soli jsou také často součástí močových sedimentů a konkrementů.

Kyselina močová se oxiduje kyslíkem za katalýzy enzymem urikasou na peroxid vodíku a allantoin. Vzniklý peroxid vodíku se stanovuje oxidační kopulací s dichlorfenolsulfonátem a 4-aminoantipyrinem katalyzovanou enzymem peroxidasou.

Pro stanovení koncentrace kyseliny močové v séru a moči obdržíte vzorek séra a moče pacienta označeného číslem a M- muž nebo Ž – žena:

S = sérum

U = moč (připojen údaj o diuréze)

### Pracovní postup:

**!POZOR! VZOREK MOČE ZŘEĎTE PŘED STANOVENÍM 10x. VÝSLEDEK PAK VYNÁSOBTE 10x!**

- Do očíslovaných zkumavek napipetujte reagentie dle tabulky 1.
- Vzorky a standard zpracujte v tripletu, slepou zkoušku pouze jednou.

Tabulka 1.

reagentie(ml)	vzorek <sub>S</sub>	vzorek <sub>U</sub>	standard	slepý vzorek
sérum	0.05	–	–	–
moč zředěná 10x!	–	0.05	–	–
standardní roztok	–	–	0.05	–
destilovaná voda	–	–	–	0.05
pracovní roztok	1.0	1.0	1.0	1.0

- Všechny zkumavky nechte stát 10 min při pokojové teplotě ve tmě (laboratorní stůl).
- Do 60 min změřte absorbance vzorků a standardu proti slepé zkoušce při vlnové délce 500 nm.
- Naměřené hodnoty zapište do tabulky č.2.

**Tabulka 2.**

<b>vzorek č.:</b>	<b>absorbance</b>			<b>průměr</b>	<b>c (μmol/l)</b>
standad					
sérum					
moč					

**VYHODNOCENÍ:****Tabulka 3.**

<b>vzorek č.</b>	<b>REFERENČNÍ HODNOTY</b>	<b>NAMĚŘENÉ HODNOTY</b>
urikémie (μmol/l)	muži: 200 – 420 ženy: 140 – 340	
množství vyloučené moči (mmol/24 hod)	4,2	

**Poznámky:**

# Glykemie

**Klíčová slova:** glykemie, glukosový toleranční test, glykemická křivka, glukosurie, glukosaoxidasa (GOD - EC 1.1.3.4), peroxidasa (POD - EC 1.11.1.7), glykace proteinů, HbA<sub>1C</sub> glykovaný hemoglobin, afinitní chromatografie.

## Reagencie:

1. vzorky séra S1, S2, S3
2. vzorek moče U
3. standardní roztok glukosy  $c = 10 \text{ mmol/l}$
4. souprava Glukosa GOD-PAP, (BioSystems):  
enzymové činidlo:  
fosfátový pufr  $140 \text{ mmol/l}$ , pH 8  
glukosaoxidasa (GOD)  $166 \mu\text{kat/l}$   
peroxidasa (PAP)  $16 \mu\text{kat/l}$   
3-methylfenol (chromogen)  $10 \text{ mmol/l}$   
4-aminoantipyrin (chromogen)  $1 \text{ mmol/l}$



## Glukosový toleranční test, denní ztráty glukosy močí

Koncentrace glukosy v krvi se nazývá glykemie, nověji glukosemie. Její hodnota je výsledkem působení řady regulačních faktorů, mezi nimiž hrají dominantní roli insulin a kontra-insulinární hormony – glukagon, katecholaminy, glukokortikoidy a somatotropní hormon. Hlavním orgánem, který zajišťuje homeostázu glukosy jsou játra. U zdravého člověka je glykemie nalačno udržována v poměrně úzkém rozmezí (asi 4 – 6 mmol/l) a po jídle nepřevyšuje ve venosní plazmě 11 mmol/l. Netrvá-li toto zvýšení déle než 60 min po příjmu potravy je považováno za fyziologické.

Porucha mechanismů podílejících se na udržování euglykemie se může projevit ve smyslu trvalého zvýšení koncentrace glukosy (**hyperglykemie**) nebo naopak jejího snížení (hypoglykemie). V obou případech jde o stavy ohrožující pacienta jednak chronicky, jednak akutně. Dlouhodobá hyperglykemie u dekompenzovaného diabetika je spojena s řadou orgánových komplikací. Těžší hyperglykemie, stejně jako hypoglykemie, mohou vyústit až do bezvědomí a bez včasné odborné pomoci ohrožují pacienta na životě.

Nejčastější poruchou regulace metabolismu sacharidů je diabetes mellitus (DM, asi 7 – 8 % populace v ČR). Toto onemocnění je způsobeno absolutním nebo relativním nedostatkem insulinu. Dominujícím laboratorním nálezem u neléčeného diabetika je chronická hyperglykemie doprovázená v případě výrazné hyperglykémie charakteristickými známkami DM (polyurie, polydipsie, hubnutí, únava).

Pro diagnózu diabetu svědčí:

- a) přítomnost klinické symptomatologie provázené náhodnou glykemií vyšší než 11,1 mmol/l a následně glykemií v žilní plazmě nalačno vyšší než 7,0 mmol/l
- b) při nepřítomnosti klinických projevů nález glykemie v žilní plazmě nalačno vyšší než 7,0 mmol/l po osmihodinovém lačnění.
- c) nález glykemie za 2 hodiny při oGTT (orální glukosový toleranční test) vyšší než 11,1 mmol/l

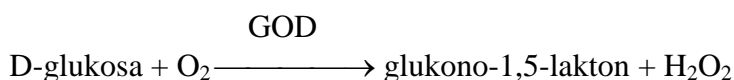
Při nálezu hraničních hodnot glykemie nebo rozporu mezi náhodnou glykemií a glykemií nalačno je indikován zátěžový test tzv. orální glukosový toleranční test (**oGTT**). Test je založen na sledování reakce organismu po perorálním podání definovaného množství glukosy (75 g ve 200-250 ml vody). Hodnotí se, zda je organismus schopen v daném časovém úseku udržovat glykemie ve fyziologickém rozmezí.

V moči se glukosa fyziologicky vyskytuje jen v nepatrném množství, neboť je zpětně resorbována a běžnými metodami není prokazatelná. Teprve při překročení renálního prahu pro glukosu (1,6 – 1,8 g/l, resp. 9 – 10 mmol/l po dobu 15 min.) se objevuje **glykosurie**. Jako fyziologickou lze označit přechodnou alimentární glykosurii po požití velkého množství koncentrovaných sacharidů. **Ztráta**, též **odpad glukosy** (množství glukosy v gramech vyloučené močí za 24 hod.) se dříve používala k monitorování kompenzace diabetu.

Odběr krve pro stanovení glykemie se nejčastěji provádí nalačno. Je-li indikován oGTT, stanovují se glykemie nalačno, za 60 a 120 min po zátěži. Odebírá se kapilární (ev. venosní) krev, koncentrace glukosy se stanovuje v plné krvi, v plazmě nebo v séru. V plazmě a séru jsou koncentrace glukosy o 10 – 15 % vyšší než hodnoty naměřené v plné krvi a při hodnocení glykemie je třeba na toto brát zřetel.

Z naměřených hodnot glykemie v jednotlivých odběrech získáme **glykemickou křivku**. Z jejího průběhu je možno usuzovat, zda vyšetřovaný organismus reaguje na glukosovou zátěž adekvátně či nikoliv. K nejčastěji diagnostikovaným odchylkám patří diabetes mellitus a porušená glukosová tolerance.

Ke stanovení koncentrace glukosy se využívá spřažené glukosaoxidase -peroxidase reakce. Enzym glukosaoxidasa (GOD) katalyzuje oxidaci glukosy kyslíkem za vzniku kyseliny glukonové (přecházející na vnitřní ester glukonolakton) a peroxidu vodíku:



Nízká koncentrace glukosy v reakční směsi ( $10^{-4}$  mol/l) ve srovnání s hodnotou  $K_m$  glukosy pro GOD ( $3,3 \cdot 10^{-2}$  mol/l) způsobuje, že reakce probíhá podle kinetiky 1. řádu. Rychlost reakce je tedy přímo úměrná koncentraci glukosy. Nevratný průběh této reakce umožňuje oxidaci celého množství glukosy.

Vzniklý peroxid vodíku se stanovuje pomocí spřažené oxidace chromogenu, která je katalyzována enzymem peroxidasou (viz Biologické oxidace, úloha 3). Koncentrace vzniklého barviva, určená fotometricky, je úměrná koncentraci glukosy.

Pro sestavení glykemické křivky obdržíte tři vzorky od pacienta označeného číslem:

- S1 = sérum nalačno
- S2 = sérum 1 hod po Glc zátěži
- S3 = sérum 2 hod po Glc zátěži

Pro výpočet denní ztráty glukosy močí stanovíte koncentraci glukosy ve vzorku moči z 24 hod sběru s údajem o diuréze, označený U.

**POZOR! MOČ ZŘEĎTE 10 x. VÝSLEDEK VYNÁSOBTE ŘEDĚNÍM.** Každý vzorek séra, moče a standard zpracujte v tripletu, slepý vzorek pouze jednou.

### Pracovní postup:

- Do očíslovaných zkumavek napipetujte inkubační směs podle tabulky 1.

**Tabulka 1.**

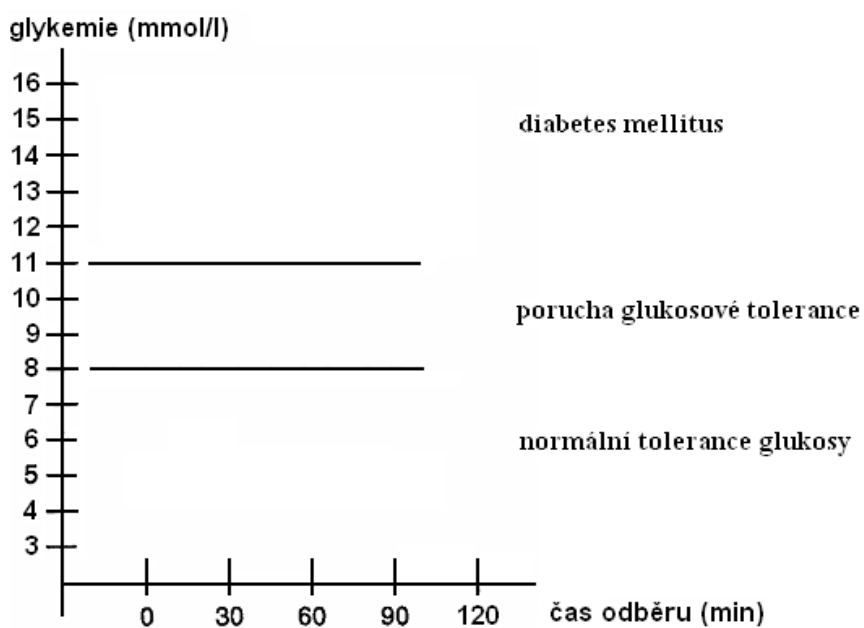
reagencie (ml)	Vzorek <sub>S</sub>	vzorek <sub>U</sub>	standard	slepý vzorek
sérum	0,01	–	–	–
zředěná moč	–	0,01	–	–
standardní roztok glukosy	–	–	0,01	–
destilovaná voda	–	–	–	0,01
enzymové činidlo	1,5	1,5	1,5	1,5

- Všechny zkumavky **dobře protřepejte** a nechte 30 min inkubovat při pokojové teplotě v **temnu** (v laboratorním stole).
- Změřte absorbance vzorků i standardního roztoku proti slepému vzorku do 30 min po ukončení inkubace při vlnové délce 500 nm. Naměřené hodnoty запиšte do tabulky 2.
- Z průměru naměřených hodnot absorbance vzorků a standardu a z koncentrace standardního roztoku glukosy vypočítejte koncentrace glukosy v séru a v moči.
- Výsledky запиšte do tabulky 2.

**Tabulka 2.**

vzorek č.:	absorbance			průměr	c (mmol/l)
standard					10
S1					
S2					
S3					
U					

- Ze získaných hodnot nakreslete glykemickou křivku. Určete, o který typ poruchy se může jednat v případě sledovaného pacienta:



- Vypočítejte denní ztráty glukosy močí (g/24 hod) z hodnoty koncentrace glukosy v moči (g/l) a diurézy (udána u vzorku moče).
- Výsledky запиšte do tabulky 3.

**Tabulka 3.**

c Glc v moči (g/l)	diuréza (l/24 hod)	denní ztráty (g/24 hod)

*Poznámky:*

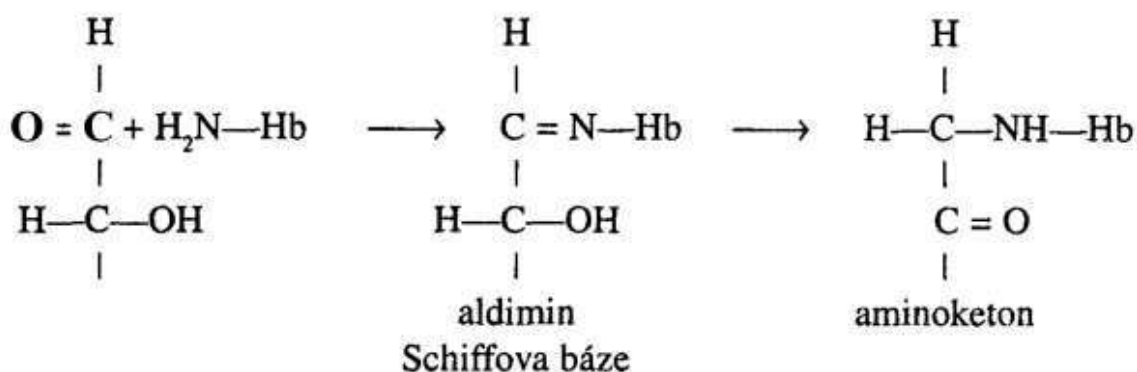
**VYHODNOCENÍ:**

REFERENČNÍ HODNOTY	glykémie (mmol/l)		
	nalačno	po 1 hod	po 2 hod
Normální tolerance Glc	< 6	≤ 11	< 6
Porušená glykémie na lačno/hraniční glykémie na lačno (IFG, impaired fasting glucose)	5,6-6,9		< 11.1
Porušená glukózová tolerance (IGT, impaired glucose tolerance)	< 7		7,8 – 11
Gestational diabetes mellitus	≥ 5.1 / 5.6	≥ 10	≥ 8.5 / 7.7
Diabetes mellitus	≥ 7		≥ 11.1

Viz Doporučený postup péče o nemocné s prediabetem 2012, Standards of Medical Care in Diabetes 2014, ADA, <http://www.diab.cz/standardy>

## Glykovaný hemoglobin

Jedním z vhodných parametrů pro sledování pacientů s diabetes mellitus je glykovaný hemoglobin, který vzniká glykací bílkovinných řetězců hemoglobinu. Obecně se jedná o neenzymovou reakci mezi aldehydovou skupinou glukosy (ev. i jiného monosacharidu) a volné aminoskupiny bílkoviny. Tou může být nejen hemoglobin, ale i jakýkoliv jiný protein v plazmě nebo tkáních. V případě hemoglobinu monosacharid reaguje s N-terminálním valinem globinového řetězce nebo s ε-aminoskupinou lysinu v jeho řetězcích. Reakce probíhá ve dvou krocích. Nejdříve vzniká labilní aldimin (Schiffova báze), který se přesmykem stabilizuje na aminoketon (viz Reakce funkčních skupin biochemicky významných organických sloučenin, úloha 4.):



Nejreaktivnějším místem pro glykaci hemoglobinu je N-terminální valin β-řetězce (asi 60 % vázané glukosy), tato majoritní komponenta je označována HbA<sub>1c</sub>. Zbývajících 40 % glukosy se váže na dalších 44 glykačních míst. Celkový glykovaný hemoglobin Glyc-Hb je tedy směsí několika frakcí, které se liší jak místem, v němž proběhla glykace, tak druhem navázaného sacharidu.

Podíl HbA<sub>1c</sub> je úměrný koncentraci glukosy v krvi, u zdravého člověka se pohybuje v závislosti na použité metodice v rozmezí 20-44mmol/mol (IFCC), u pacientů s diabetes mellitus jsou hodnoty zvýšené v závislosti na hodnotách glykemie. Hodnota HbA<sub>1c</sub> poskytuje

nepřímou informací o průměrné hladině glykemie v časovém období 4 – 6 týdnů (biologický poločas přežívání erytrocytů) před odběrem krve. Je tedy objektivnějším kritériem pro hodnocení kompenzace diabetiků než hodnota glykemie.

Glykace hemoglobinu vede samozřejmě ke změně struktury a tedy i vlastností původní molekuly. Bylo zjištěno, že Glyc-Hb má vyšší afinitu ke kyslíku než neglykovaný hemoglobin, protože glukosa se váže na stejné místo jako hlavní allosterický regulátor 2,3-BPG. Z toho důvodu se zhoršuje uvolňování kyslíku z Glyc-Hb.

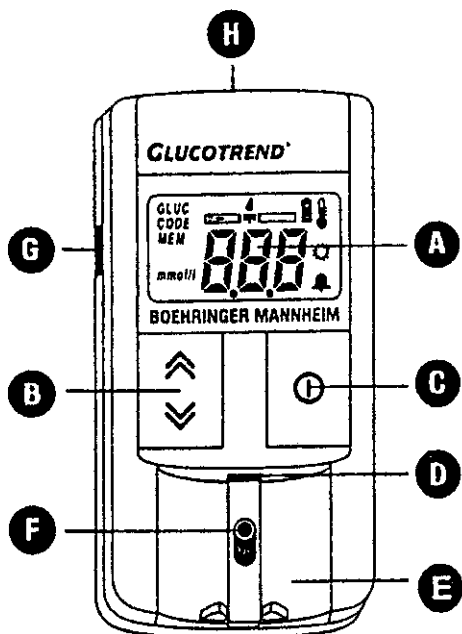
Podobně jako hemoglobin jsou glykované i ostatní proteiny. Glykace je jednou z nejdůležitějších posttranslačních modifikací proteinů nejen v plazmě, ale i ve tkáních. Tato spontánní reakce souvisí s poškozováním tkání některých orgánů a projevy komplikací u pacientů s diabetem.

Pro stanovení glykovaného hemoglobinu HbA<sub>1c</sub> lze využít principu ionexové chromatografie, při které jsou molekuly separovány podle náboje. Stacionární fází je makromolekulární matrice (iontoměnič, ionex) obsahující kyselé nebo bazické funkční skupiny. Pro zachycení HbA<sub>1c</sub> frakce slouží iontoměniče s kyselou funkční skupinou (sulfo-kyselina, karboxylová kyselina) nesoucí záporný náboj – **katexy**. Ion obsažený v ionexu je vyměněn za ion obsažený v mobilní fázi nebo ve vzorku a na principu soutěžení ionexu o tyto ionty dochází k separaci. Ionty ze vzorku jsou obvykle ionexem pevně připoutány a uvolní se elucí roztokem o vyšší iontové síle než bylo použito u roztoku pro nanesení vzorku. Vytěsnění navázané frakce je založeno na faktu, že síla elektrostatické vazby mezi iontem a ionexem klesá s velikostí iontu. Malé ionty (např. Na<sup>+</sup> nebo Cl<sup>-</sup>) v dostatečné koncentraci jsou proto schopny vytěsnit ionty větší.


<b>REFERENČNÍ HODNOTY</b>	<b>IFCC Hb<sub>A1c</sub> (mmol/mol)</b>	<b>NPSG Hb<sub>A1c</sub> (%)</b>
Fyziologické hodnoty	20-44	< 6,1
Prediabetes	39-47	5,7–6,4
Diabetes mellitus	> 48-53	> (5,7)-6,5

Viz Standards of Medical Care in Diabetes 2014, ADA, <http://www.diab.cz/standardy>

## Monitorování glykemie pomocí glukometru GLUCOTREND® ROCHE



### Popis

- A Displej**  
Jsou znázorněny všechny prvky displeje
- B Výkyvné tlačítko**  
Toto tlačítko má více funkcí
- C Tlačítko **  
Toto tlačítko použijete k zapnutí a vypnutí přístroje
- D Vkládací štěrbinu**  
Sem vkládáte testovací proužek
- E Vodicí lišta testovacího proužku**  
Vodicí lišta testovacího proužku může být vyjmuta pro čištění
- F Měřicí okénko**
- G Štěrbinu pro kódovací čip**
- H Kryt prostoru pro baterie**  
Kryt odsuňte tlakem palce ve směru šipky



testovací proužek *GLUCOTREND® Glucose*

**Obr. 1.** Glukometr GLUCOTREND® a testovací proužek

GLUCOTREND® je přístroj pro rychlé měření koncentrace glukosy v čerstvé kapilární krvi pomocí reflexní fotometrie. Reflexní fotometr kvantitativně vyhodnocuje enzymovou reakci probíhající na testovací zóně testovacího proužku (obr. 1.). Vlákna testovací zóny proužku jsou impregnována činidly, k jejichž aktivaci stačí pouze voda obsažená v naneseném vzorku krve (princip "suché chemie").

Glukometr GLUCOTREND® umožňuje spolehlivě a velmi jednoduše měřit glykemii v rozmezí 0,6 – 33,3 mmol/l. Stačí kápnout jednu kapku kapilární krve na testovací proužek a ten vložit do přístroje. GLUCOTREND® automaticky stanoví optimální dobu měření a po 30 s zobrazí na displeji koncentraci glukosy v krvi. Vzhledem k jednoduchosti obsluhy a rychlosti stanovení je glukometr velice výhodný pro sledování glykemie u lůžka pacienta nebo pro domácí měření pacienty samými – self monitoring.

### **Pracovní postup:**

- Zapněte přístroj, na displejovém okénku se objeví Gluc a třímístné kódové číslo. Nad tímto číslem se krátce objeví nápis CODE a malý testovací proužek. Červený bod F se krátce objeví ve vedení testovacích proužků E.
- Srovnejte číslo kódu v okénku displeje nakódovaného glukometru s číslem kódu vytištěným na štítku tuby s testovacími proužky.
- Vyjměte testovací proužek z tuby a ihned ji uzavřete. Neuzavření tuby má za následek znehodnocení hygroskopického činidla v zátce. Testovací proužky jsou pak nepoužitelné.
- Uchopte proužek tak, že nápis **GLUKOTREND** je obrácen **nahoru** (viz. obr. 1). Vložte proužek do vkládací štěrbin D ve směru šipky, až zapadne s lehkým cvaknutím.
- Nápis CODE a třímístné číslo zmizí. V okénku displeje problikává testovací zóna na malém testovacím proužku a nad ní je zobrazena kapka krve. Červený bod na testovacím proužku stále bliká.
- Promasírujte lehce špičku prstu, abyste zvýšili prokrvení a tak usnadnili odběr. Nezapomeňte na dezinfekci!
- Použijte zařízení pro vpich do prstu (Softclix II a lanceta Softclix II).
- Vyjměte testovací proužek vodorovně mimo vodící lištu E. V displejovém okénku se krátce objeví malý testovací proužek a kapka krve. Hlášení **GLUC** se zastaví.
- Nechte vsáknout kapku krve do žluté zóny testovacího proužku. Krev neroztírejte ani nenanášejte další kapku.
- Proužek vložte (nápisem **GLUKOTREND** nahoru) do vkládací štěrbin D ve směru šipky až správně zaklapne. Ihned se ozve krátké zapípání a ikonka ukáže, že přístroj pracuje. Po 30 s se naměřená hodnota ukáže v okénku displeje.
- Přístroj vypněte, naměřená hodnota je automaticky uložena.

### ***Poznámky:***

# Xenobiochemie

**Klíčová slova:** cizorodé látky, smrtelná dávka toxické látky, alkoholdehydrogenasa, biotransformace cizorodých látek, dusičnany, dusitany, redukce, oxidace. nitrosaminy.

## Reagencie:

1. digitální Alkohol tester, JETT 6
2. roztok amobarbitalu v ethanolu 2 g/l
3. roztok fenobarbitalu v ethanolu 2 g/l
4. roztok pentobarbitalu v ethanolu 2 g/l
5. kyselý extrakt vzorku moče
6. mobilní fáze pro chromatografii kyselých látek (25 ml chloroformu, 25 ml acetonu, 2 ml amoniaku)
7. roztok síranu rtuťnatého v kyselině sírové (k suspensi 5 g žlutého oxidu rtuťnatého ve 100 ml vody postupně přidávat 20 ml koncentrované kyseliny sírové, po ochlazení doplnit vodou na 250 ml) **!JED!**
8. roztok chlorpromazinu v ethanolu 2 g/l
9. roztok levopromazinu v ethanolu 2 g/l
10. roztok prochlorperazinu v ethanolu 2 g/l
11. roztok thioridazinu v ethanolu 2 g/l
12. roztok chlorprothixenu v ethanolu 2 g/l
13. roztok kodeinu v ethanolu 2 g/l
14. bazický extrakt vzorku moče
15. mobilní fáze pro chromatografii bazických látek (36 ml ethylacetátu, 2 ml ethanolu, 2 ml amoniaku)
16. směs ethanol: koncentrovaná kyselina sírová 1:1 **!ŽÍRAVINA!**
17. tři vzorky vody
18. roztok kyseliny sulfanilové 20 mmol/l v roztoku hydrogensíranu draselného 0,2 mol/l
19. činidlo: roztok N-(1-naftyl)-ethylendiaminhydrochloridu 0,04 g/100 ml
20. roztok hydroxidu sodného 300 g/l **!ŽÍRAVINA!**
21. roztok salicylanu sodného 10 g/l
22. zředěná kyselina sírová 1:10 **!ŽÍRAVINA!**



Xenobiochemie se zabývá metabolismem cizorodých látek. V prostředí, ve kterém žijeme, přicházíme do neustálého kontaktu s množstvím látek, které mohou na náš organismus působit škodlivě a které mohou být příčinou vzniku některých onemocnění, nebo závažných intoxikací. Organismus je pro tyto případy vybaven enzymatickým aparátem, který umožňuje deaktivaci, ale někdy i aktivaci a vyloučení těchto látek.

Metabolismus cizorodých látek se skládá ze dvou fází, **I. biotransformační**, jejímž cílem je specifické snížení negativního účinku daného xenobiotika a **II. konjugační**, kdy je transformovaná cizorodá látka konjugována s endogenním substrátem a v této formě vyloučena močí nebo stolicí v závislosti na polaritě molekuly.

V naprosté většině případů jsou za metabolismus xenobiotik v I. fázi zodpovědné enzymy z rodiny cytochromu P<sub>450</sub>. Aktivita těchto enzymů je nejvyšší v játrech a je pozitivně ovlivňována (indukována) koncentrací cizorodých látek. Znalost mechanismů detoxikace cizorodých látek je velmi důležitá zejména pro farmakologii, toxikologii, ale i terapii některých chorob, např. akutních porfyrií.

### **Důkaz ethanolu ve vydechovaném vzduchu**

Ethanol je řazen mezi cizorodé látky, ale jeho požívání je natolik rozšířené, že se, de facto, stal v současné společnosti součástí výživy jako **poživatina** se všemi z toho vyplývajícími důsledky. Hlavní farmaceutický význam ethanolu je dán jeho použitím jako rozpouštědla velkého počtu organických látek, z přímého využití lze zmínit používání 60% roztoku ethanolu k desinfekčním a antiseptickým účelům.

Požitý ethanol se snadno resorbuje již v žaludku, 2 – 10 % se ho vylučuje plicemi a ledvinami, zbytek je přeměněn v játrech. Největší podíl ethanolu je metabolizován v cytoplasmě jaterních buněk dvoustupňovou dehydrogenací, katalyzovanou alkoholdehydrogenasou.

K orientačnímu průkazu ethanolu ve vydechovaném vzduchu jsou používány detekční trubičky obsahující žlutý dichroman draselný v kyselině sírové. Podle intenzity zeleného zabarvení vyredukované chromité soli, lze odhadnout koncentraci alkoholu v krvi (viz Reakce funkčních skupin biochemicky významných organických sloučenin, úloha I.).

Na stejném principu je založeno stanovení ethanolu Widmarkovou metodou, která však není specifická (stanoví se i všechny ostatní těkavé látky v krvi, oxidovatelné za daných podmínek). Pro specifické stanovení ethanolu v krvi se využívá plynová chromatografie nebo oxidace alkoholu katalyzovaná alkoholdehydrogenasou. Při orientačním průkazu ethanolu se v současné době detekční trubičky nahrazují spektrofotometry. Absorpce infračerveného záření v charakteristické oblasti parami ethanolu specificky udává jeho množství ve vydechovaném vzduchu. Z tohoto množství se vypočítá koncentrace ethanolu v krvi v g/l (‰).

### **Značení piva**

Způsob značení piva určuje vyhláška č. 335/1997 Sb.. Uvádí se název druhu a skupiny (např. pivo ležák), obsah alkoholu v %, zda jde o světlé či tmavé pivo a některé další údaje. Kromě toho se nepovinně uvádí údaj o extraktu obsahu původní mladiny. Vyhlášení neodpovídá značení piva ve stupních (např. 10° nebo 12° pivo) a v současnosti je nezákonné. Místo stupňů je nutno správně uvádět tzv. extrakt původní mladiny (EPM) a to v hmotnostních procentech (např. 12% pivo – nelze plést s procenty alkoholu, která se u běžných piv pohybují mezi 4 – 5 %).

## 1.1. Detekce ethanolu ve vydechovaném vzduchu

### Pracovní postup:

- Bezprostředně po požití 1 piva proveďte dechovou zkoušku pomocí alkohol testeru.
- Zkoušku opakujte po 30 a 60 min.
- Výsledky zapište do tabulky 1., k vyhodnocení použijte znamének + a –.

**Tabulka 1**

čas (min)	0	30	60
pivo .....%			
koncentrace EtOH (g/l)			

## 1.2. Výpočty koncentrace alkoholu v krvi

Koncentraci ethanolu v krvi lze vypočítat podle vztahu:

$$c \text{ (g/l)} = \frac{\text{množství požitého čistého alkoholu (g)}}{0,7 \cdot \text{tělesná hmotnost (kg)}}$$

Koncentrace ethanolu v krvi klesá zpravidla průměrně o 0.25 g/l za hodinu. V rychlosti detoxikace hraje roli mnoho faktorů, např. věk, pohlaví, fyzická kondice, stav nalačno, tolerance atd. Obsah ethanolu v běžných nápojích:

pivo 10%	30 g/l
pivo 11%	35 g/l
pivo 12%	40 g/l
víno	120 g/l
lihoviny	400 g/l

### Příklady:

- Vypočítejte, jaká bude koncentrace ethanolu v krvi vyšetřované osoby ihned po požití 1 piva a dále po 30 a 60 min. Výsledky zapište do tabulky 1.
- Vypočítejte, za kolik hodin klesne koncentrace alkoholu v krvi na hodnotu 0,1 g/l, jestliže muž o hmotnosti 80 kg vypil v krátké době šest 12% piv a dvě malé odlivky rumu (malá odlivka = 0,02 l):

(15,5 hod)

- Vypočítejte, jaký objem lihoviny by teoreticky stačil k dosažení smrtelné koncentrace ethanolu v krvi (4 g/l) pro osobu o tělesné hmotnosti 70 kg:

(490 ml)

### Poznámky:

## **Identifikace cizorodých látek (xenobiotik) a jejich metabolitů v moči**

Cizorodé látky, které se dostávají do lidského organismu (potravinářská barviva a stabilizační látky, léčiva) jsou vylučovány ledvinami buď v původní formě, nebo transformované na metabolity. Hlavním orgánem, v němž se uskutečňuje metabolismus cizorodých látek, jsou játra.

Xenobiotika se dokazují ve vzorcích nativní moči nebo podle povahy analyzovaných látek v jejím kyselém či bazickém extraktu (extrakci často předchází hydrolýza případných konjugátů).

Pro důkaz jednotlivých látek se využívá např. tenkovrstevná chromatografie (TLC), která je rychlá a ekonomicky výhodná (viz Aminokyseliny, úloha 1.1. V současné době k těmto klasickým metodám přistupuje i využití automatických přístrojů.

### **2.1. Identifikace kyselých látek (amobarbital, fenobarbital, pentobarbital)**

Barbituráty se řadí podle svého účinku mezi hypnotika a sedativa. Ve směsi s dalšími léčivy se používají jako analgetika a antiepileptika.

#### **Pracovní postup:**

- Na silufolové desce lehce vyznačte obyčejnou tužkou start (asi 2 cm od spodního okraje desky) a čtyři body, na které opatrně naneste mikropipetkami standardní roztoky barbiturátů a ethanolový roztok kyselého extraktu moče (nepoškodit tenkou vrstvu!).
- Desku vložte do chromatografické vany s připravenou mobilní fází pro chromatografii kyselých látek. Start musí být nad hladinou kapaliny.
- Vanu dobře přikryjte skleněným víkem.
- Když čelo rozpouštědla dosáhne do vzdálenosti 1 – 2 cm od horního okraje desky, chromatogram vyndejte z vany.
- Čelo rozpouštědla označte tužkou a chromatogram nechte na vzduchu uschnout.
- Suchý chromatogram opatrně detekujte postříkáním roztokem síranu rtuťnatého (v digestoři). Barbituráty vytvoří bílé skvrny, vystupující nad povrch tenké vrstvy.
- Pomocí vypočítaných hodnot  $R_f$  standardů i vzorku identifikujte jednotlivé barbituráty.
- Výsledky zapište do tabulky 2.

### **2.2. Identifikace bazických látek (chlorpromazin, levopromazin, prochlorperazin, thioridazin, chlorprothixen, kodein)**

Prvních pět látek jsou léčiva patřící do skupiny neuroleptik (psychofarmaka). Kodein je methylderivátem alkaloidu morfinu. Užívá se jako antitusikum a jako součást velmi účinných analgetik. Není většinou návykový, ale je zneužíván k přípravě heroínu. Ten již nemá jakékoliv terapeutické použití, zato je však silně návykový.

**Pracovní postup:**

- Analogickým postupem jako v úloze 2., proved'te chromatografii standardů a vzorku bazického extraktu moče stejného čísla jako v úloze 2.1.
- K vyvíjení chromatogramu použijte mobilní fázi pro bazické látky.
- Usušený chromatogram rovnoměrně postříkejte směsí ethanolu a kyseliny sírové. Ihned po detekci se objeví barevné skvrny.
- Podle hodnot  $R_f$  a zbarvení jednotlivých skvrn identifikujte léčiva ve vzorku.
- Výsledky zapište do tabulky 2.

**Tabulka 2.**

vzorek moče č.:

kyselé látky	bazické látky

## Stanovení koncentrace dusitanů ve vodě

V životním prostředí dochází k hromadění dusičnanů při intenzivní zemědělské produkci (umělá dusíková hnojiva). Dusičnany jsou většinou redukovány na dusitany mikroorganismy přítomnými ve vodě, půdě i ústní dutině. Dusičnany, které nejsou v organismu přeměněny bakteriální flórou na dusitany, se vstřebávají, nepronikají však do buněk a jsou vylučovány močí.

Dusitany se používají ve velké míře i při výrobě uzenin. Jsou pro lidský organismus toxické. Jednou z příčin jejich toxicity je oxidace  $\text{Fe}^{2+}$  hemoglobinu na  $\text{Fe}^{3+}$  za vzniku nefunkčního hemoglobinu (viz Tetrapyrroly): Při chronickém přívodu dusitanů spočívá riziko v tvorbě nitrosaminů, které mají především účinky hepatotoxické a již ve velmi malých dávkách jsou mutagenní a karcinogenní.

Nejvyšší přípustná koncentrace podle státní normy je pro dusičnany 50 mg/l (pro kojence do 6 měsíců pouze 15 mg/l) a pro dusitany pouze 0,1 mg/l.

Podstatou stanovení dusitanů ve vodě je diazotace kyseliny sulfanilové přítomnými dusitany a následující kopulace vzniklé diazoniové soli s N-(1-naftyl)-ethylendiaminem za vzniku červeného azobarviva. Intenzita zbarvení, stanovovaná fotometricky při 550 nm, je přímo úměrná koncentraci dusitanů.

Analogický test se využívá pro nepřímý průkaz bakteriurie. Čím více bakterií je v moči, tím více dusitanů vznikne redukcí dusičnanů přítomných v moči. Pro správnost vyšetření je třeba zajistit dostatečný přívod dusičnanů potravou a dostatečně dlouhé setrvání moče v močovém měchýři (4 – 6 hod).

### Pracovní postup:

- Koncentraci dusitanů stanovte v běžné pitné vodě z vodovodní sítě, v balené pitné vodě a ve vodě studniční.
- Do čtyř zkumavek napipetujte reagentie podle tabulky 3, jako slepý vzorek použijte destilovanou vodu.
- Potom napipetujte do každé zkumavky 2 ml destilované vody (konečný objem 5 ml) a změřte absorbance vzorků při 550 nm proti slepému vzorku.
- Naměřené hodnoty absorbancí запиšte do tabulky 5.
- Z kalibračního grafu odečtěte odpovídající hmotnostní koncentraci dusitanů v jednotlivých vzorcích vody.
- Výsledky запиšte do tabulky 5.

**Tabulka 3.**

<b>reagencie (ml)</b>	<b>pitná voda</b>	<b>balená voda</b>	<b>studniční voda</b>	<b>slepý vzorek</b>
vzorek vody	2,5	2,5	2,5	2,5
kyselina sulfanilová	0,25	0,2 5	0.25	0.25
promíchat, nechat stát 10 min				
čínidlo	0,25	0,25	0,25	0,25
promíchat, nechat stát 20 min				

***Poznámky:***

## Markery svalové tkáňě

**Klíčová slova:** aktivita enzymů, cytoplazmatické enzymy, mitochondriální enzymy, laktátdehydrogenasa (LD – EC 1.1.1.27.), alaninaminotransferasa (ALT – EC 2.6.1.2.), aspartátaminotransferasa (AST – EC 2.6.1.1.), kreatinkinasa (CK – EC 2.7.3.2.), kreatin, myoglobin, troponin, izoenzymy, elektroforéza.

### Reagencie

1. vzorek séra
2. souprava Kreatinkinasa (Biosystems):  
pracovní roztok<sub>CK</sub>: (směs činidla A a činidla B 4:1)
  - a) činidlo<sub>CKA</sub>: (imidazol 125mmol/l, EDTA 2 mmol/l, octan hořečnatý 25mmol/l, D-glukosa 25 mmol/l, N-acetylcystein 25 mmol/l, hexokinasa 6,000 U/l, NADP 24 mmol/l, pH 6 7).
  - b) činidlo<sub>CKB</sub>: (kreatinfosfát 250 mmol/l, ADP 15 mmol/l, AMP 25 mmol/l, P1,P5-di(adenosin-5)-pentafošfát 102 mmol/l, glukosa-6-fošfát-dehydrogenasa 8,000 U/l)
3. souprava Aspartátaminotransferasa (Biosystems):  
pracovní roztok<sub>AST</sub>: (směs činidla A a činidla B 4:1)
  - a) činidlo<sub>AST A</sub>: (Tris 121 mmol/l, L-aspartát 362 mmol/l, malátdehydrogenasa > 460 U/l, laktát dehydrogenasa > 660 U/l, hydroxid sodný 255 mmol/l, pH 7,8
  - b) činidlo<sub>AST B</sub>: (NADH 13 mmol/l, 2-oxoglutarát 75 mmol/l hydroxid sodný 148 mmol/l, azid sodný 9,5 g/l )
4. souprava Laktátdehydrogenasa (Biosystems):  
pracovní roztok<sub>LDH</sub>: (směs činidla A a činidla B 4:1)
  - a) činidlo<sub>LDH A</sub>(N-metyl-D-glukamin 0,406 mol/l, laktát 62,5 mmol/l, pH 9,4)
  - b) činidlo<sub>LDH B</sub>:(NAD<sup>+</sup> 50 mmol/l )

Stanovení aktivity některých enzymů v séru je pomocným vodítkem při diagnostice bolesti na hrudi, jejíž příčinou může být řada onemocnění: infarkt myokardu, plicní embolie, angína pectoris. Rychlost rozpoznání příčiny vyvolávající bolest je zejména v případě akutního infarktu myokardu (AIM) rozhodující pro úspěšnou terapii.

V důsledku zvýšené propustnosti membrán buněk srdečního svalu poškozených ischemií, jsou do krevního oběhu uvolňovány některé cytoplazmatické enzymy: kreatinkinasa, aspartátaminotransferasa, izoenzym LD1 laktátdehydrogenasy a BB-izoenzym glykogenfosforylasy B.

V současné době k uvedeným enzymovým markerům přistupuje i stanovení myoglobinu, troponinu I a troponinu T (komponenty troponinového regulačního systému, který se nachází v kontraktálním aparátu příčné pruhovaného svalu). Myoglobin je rychlým markerem, signalizujícím poškození myokardu, protože se při poruše integrity sarkolemy vyplavuje do krve. Zvýšení koncentrace myoglobinu nastupuje již za 2 hod od prvních příznaků. Maxima, tj. až 30 násobného zvýšení koncentrace myoglobinu proti normě, dosahuje již po 4 – 6 hod, což je přibližně o 8 – 10 hod dříve, než je tomu u izoenzymu CK-MB kreatinkinasy, který je jedním z nejčasnějších enzymových markerů poškození myokardu.

Podle nejnovějších kritérií WHO je troponin-T nebo I uznáván jako hlavní biochemický marker AIM, myoglobin je považován za nejčasnější marker.

V diagnostice onemocnění svalové tkáně (myokardu nebo kosterního svalstva) se kromě klinického vyšetření a pomocných metodik (EKG – myokard; EMG, svalová biopsie, molekulárně genetické vyšetření – kosterní svalstvo), významně uplatňuje laboratorní vyšetření biochemických markerů svalového poškození. Mezi základní markery svalového poškození patří: myoglobin, laktátdehydrogenasa (LD), kreatininkinasa (CK) zvláště izoenzymy CK-MB, aspartátaminotransferasa (AST), troponin T či I.

### **Laboratorní diagnostika infarktu myokardu**

Biochemická diagnostika bolestí na hrudi, která může být příznakem akutního infarktu myokardu (AIM), nestabilní anginy pectoris nebo plicní embolie, je založena na detekci intracelulárních cytoplazmatických nebo mitochondriálních bílkovin, které se dostávají do krevního řečiště. K jejich uvolnění z buňky dochází při ischemii, kdy se nejprve zvyšuje permeabilita plazmatické membrány a při pokračující ischemii dochází ke kompletní destrukci buňky.

Mezi klasické testy patří **stanovení aspartátaminotransferasy (AST)**. Jedná se o cytoplazmatický, ale i mitochondriální enzym, jehož aktivita začíná stoupat za 4 – 6 h po vzniku ischemie myokardu a maximum dosahuje za 1 – 2 dny, k normě se navrácí do 5 dnů. Zvýšení hladiny AST není specifické pro postižení myokardu, dochází k němu i při postižení jater, kosterního svalstva nebo při hemolýze. V některých případech (selhávání krevního oběhu, městnání krve v játrech) může dojít i k vzestupu ALT (alaninaminotransferasy), která je citlivým a poměrně specifickým markerem postižení hepatocytů.

**Kreatininkinasa (CK)** kopíruje průběh AST, aktivita stoupá ale o něco dříve. Její stanovení má význam v diagnostice AIM pouze při stanovení jejího izoenzymu CK-MB. Izoenzym CK-MB tvoří 3 % celkové CK v kosterním svalstvu, ale představuje 40 % aktivity CK v myokardu. Relativní nárůst podílu CK-MB na celkové hladině CK podporuje diagnózu AIM. Celková CK i její izoenzym CK-MB se stanovují na základně své enzymatické aktivity. Nově se stanovuje antigen CK-MB tzv. CK-MB mass pomocí specifické protilátky. Tento test je citlivější, protože je schopen detekovat i neaktivní, degradované formy CK-MB, je však ekonomicky nákladnější.

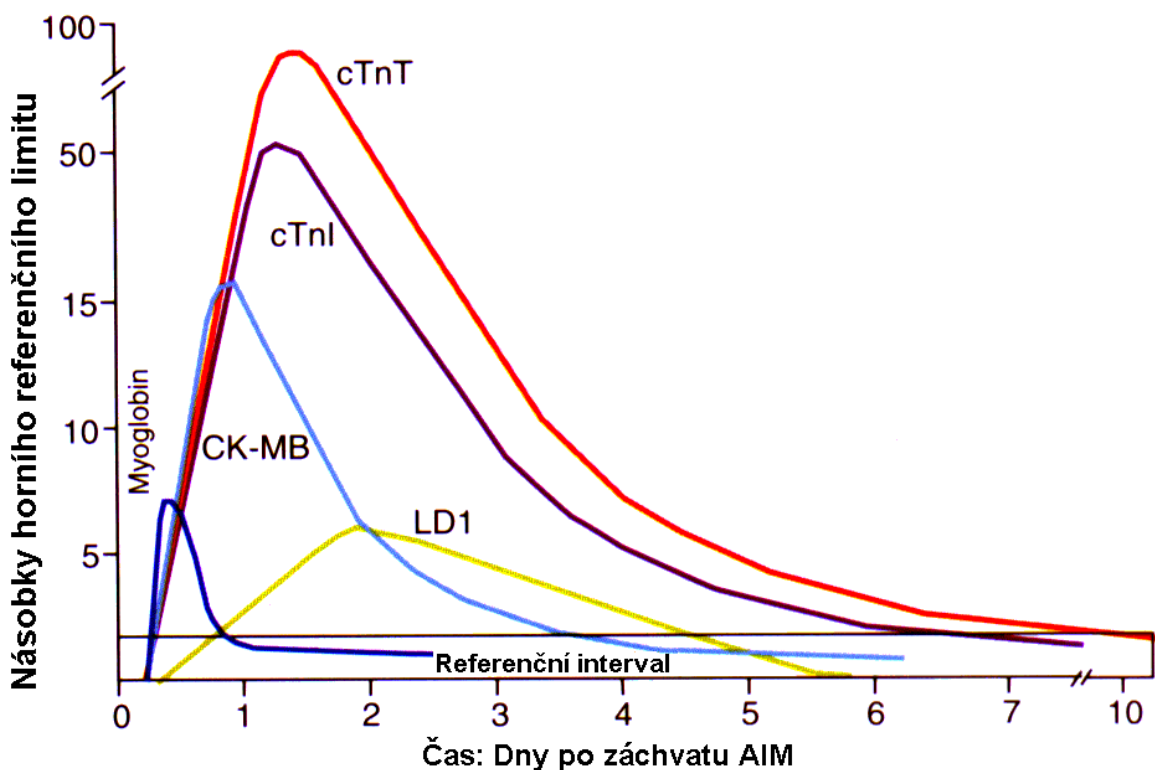
**Laktátdehydrogenasa (LD)** je nejméně specifickým markem poškození myokardu, větší specifičnost má stanovení jejích izoenzymů (při AIM je zvýšená aktivita izoenzymu H4,



poměr LD1/LD2 se zvýší na hodnotu vyšší než 1). Aktivita po AIM stoupá poměrně pozdě, má však význam pro diagnostiku infarktu, který proběhl před několika dny. Zvýšená aktivita LD v séru může být důsledkem hemolýzy (izoenzym LD1) a poškození jaterního parenchymu (izoenzym LD5).

K cenným markerům patří **myoglobin**, jehož hladina v séru stoupá za 0,5 – 2 h po vzniku AIM. Jedná se tedy o marker časný, avšak poměrně nespecifický. Hladina v séru může být zvýšena v důsledku poškození kosterního svalstva či snížených renálních funkcí.

Za nejspecifičtější a nejcitlivější marker kardiálního postižení se pokládá stanovení **troponinu T (TnT)** nebo **I (TnI)**. Jsou součástí tzv. troponinového komplexu, který zabezpečuje posun aktinových a myosinových vláken a tím kontrakci svalu. Primární struktura TnI a TnT myokardu je jiná než v kosterním svalstvu, proto k jejich zvýšení v krvi dochází specificky při poškození kardiomyocytů. Vzestup hladiny Tn nastává po 3 hodinách od začátku bolesti při AIM, maxima dosahuje kolem 4. dne, zvýšená hladina TnI přetrvává po proběhlém AIM 7 – 10 dní, v případě TnT ještě déle.



### UVOLNĚNÍ SRDEČNÍCH BIOMARKERŮ DO KRVE

**cTnT** = srdeční troponin T

**cTnI** = srdeční troponin I

**CK-MB** = srdeční kreatinkinasa

**LD1** = laktátdehydrogenasa izoenzym 1

**Obr.1.:** Kinetika změn koncentrací srdečních markerů v počátečních hodinách po AIM

Dle doporučení WHO se v běžné klinické praxi nejvíce používá v laboratorní diagnostice stanovení CK, CK-MB, CK-MB<sub>mass</sub>, troponin I a myoglobinu.

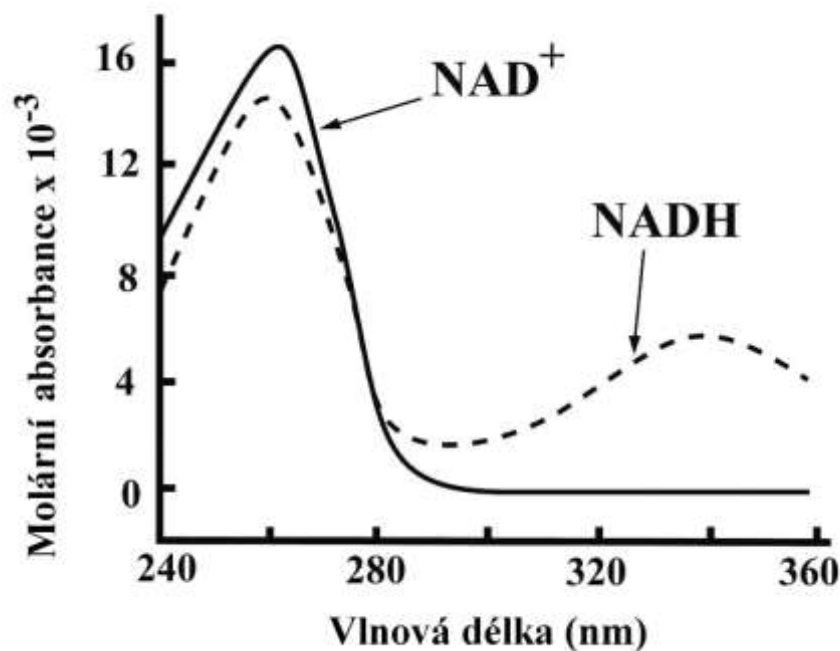
Mezi nové diagnostické testy, které zatím nejsou součástí klinické praxe, patří stanovení kardijspecifického izoenzymu glykogenfosforylasy BB, H-FABP (heart fatty acids binding protein) a albuminu s modifikovanou N terminální částí (tzv.: ischemia-modified albumin, IMA).

### Laboratorní diagnostika rhabdomyolýzy

Dalším z poměrně vážných stavů, které jsou spojené s poškozením svalové buňky, je rhabdomyolýza. Při ní dochází k rozpadu buněk příčně pruhovaného svalstva. V séru jsou detekované vysoké hladiny myoglobinu, celkové CK, AST, LD a aldolasy.

### Optický Warburgův test

Pro stanovení aktivity řady enzymů (LD, ALT, AST) se využívá tzv. Warburgův optický test. Principem tohoto stanovení je schopnost redukovaných forem koenzymů NADH a NADPH absorbovat záření vlnových délek 330 - 370 nm (v praxi měříme obvykle při 340 nm).

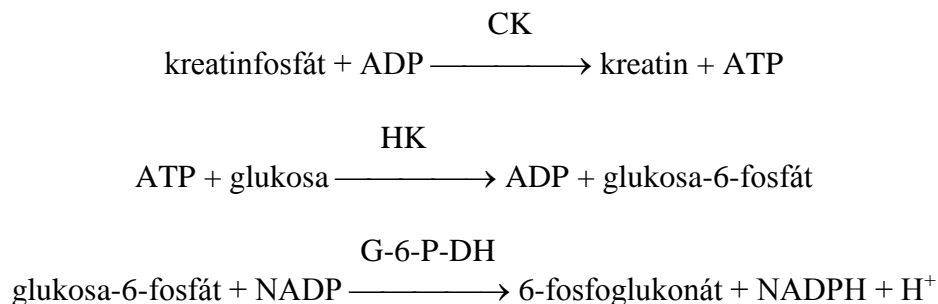


**Obr. 2.** Srovnání absorpčních spekter NAD a jeho redukované formy NADH

Změny absorbance v této oblasti spektra jsou přímo úměrné změně množství redukovaných/oxidovaných molekul koenzymu za jednotku času. Pro stanovení aktivity pomocí tohoto testu není nezbytné, aby některý z koenzymů byl substrátem daného enzymu (jako je tomu např. v případě LD). První reakcí, která je zároveň limitní reakcí, je reakce stanovovaného enzymu a poslední je reakce produkující/spotřebovávající NAD(P)H. Systému spřažených reakcí se využívá například pro stanovení katalytické aktivity CK, ALT, AST (viz návody).

### Stanovení katalytické aktivity kreatinkinasy (CK)

Kreatinkinasa (CK) katalyzuje v přítomnosti kreatinfosfátu, fosforylaci ADP za vzniku ATP a kreatinu. Katalytická aktivita se určuje jako míra vzniku NADPH, který se měří při 340 nm a je výsledkem sprzęžených reakcí hexokinasy (HK) a glukosa-6-fosfát-dehydrogenasy (G6P-OH)



### Pracovní postup:

- Pipetujte do označených zkumavek:

vzorek	50 $\mu$ l
pracovní roztok CK	1,0 ml

- Promíchejte a nasajte do kyvety fotometru a zapněte stopky.
- Po 3 minutách změřte počáteční absorbanci a pak ji odečítejte v minutových intervalech po dobu 3 minut.
- Vypočtete rozdíl mezi následnými absorbancemi a průměrnou nulovou absorbancí ( $\Delta A/\text{min}$ ).

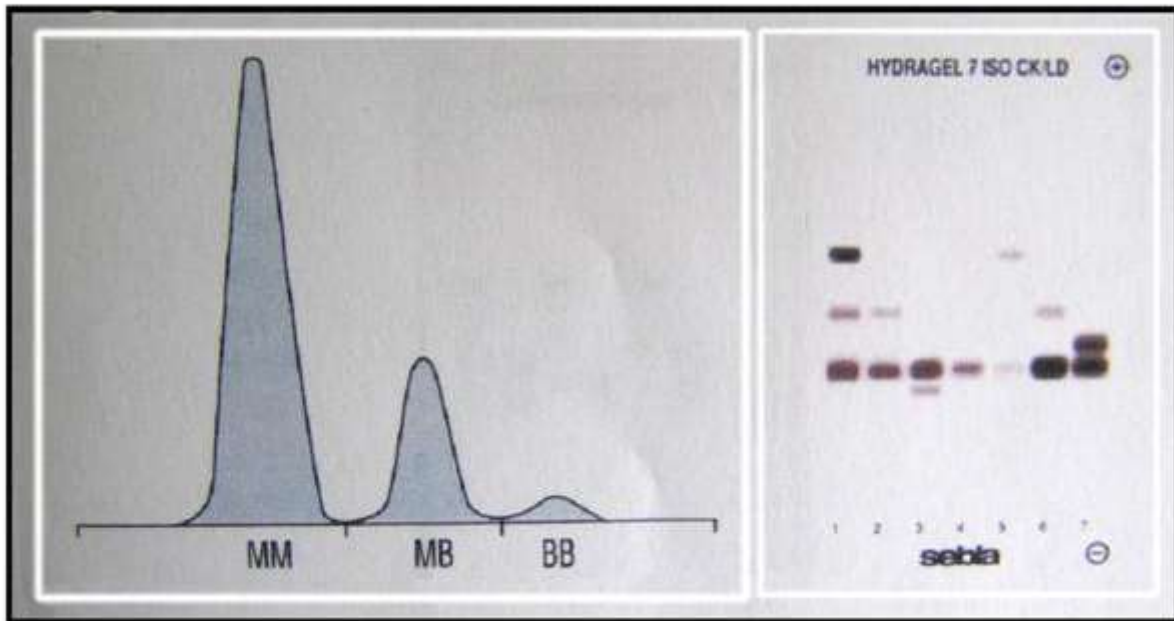
### Výpočet aktivity CK:

$$\Delta A/\text{min} \cdot \frac{V_t \cdot 10^6}{\epsilon \cdot l \cdot V_s} = \text{U/l}$$

Molární absorbance ( $\epsilon$ ) NADPH při 340 nm je 6 300, světelná cesta ( $l$ ) je 1 cm, celkový reakční objem ( $V_t$ ) je 1,05, objem vzorku ( $V_s$ ) je 0,05 a 1 U/l odpovídá 16,67 nkat/l. Následující rovnice je pro výpočet katalytické aktivity CK:

$\Delta A/\text{min}$	x 3333=U/l
	x 55561= nkat/l

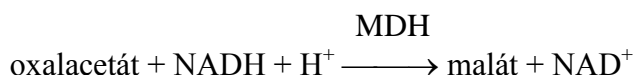
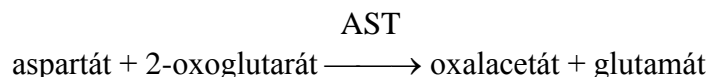
## HYDRAGEL ISO-CK K20



**Obr. 3.** Elektroforéza izoenzymů kreatinkinasy

## Stanovení katalytické aktivity AST

Aspartátaminotransferasa (AST neboli GOT) katalyzuje přenos aminoskupiny z aspartátu na 2-oxoglutarát za vzniku oxalacetátu a glutamátu. Katalytická aktivita se určuje jako míra úbytku NADH, k čemuž dochází vlivem sprážené reakce s malátdehydrogenasou (MDH). Úbytek NADH se měří fotometricky při 340 nm.



### Pracovní postup:

- Pipetujte do označených zkumavek

reakční teplota	37° C	25° C
pracovní roztok <sub>AST</sub>	1,0 ml	1,0 ml
vzorek	50 μl	100 μl

- Promíchejte, nasajte do kyvety fotometru a zapněte stopky.
- Po 1 minutě odečtěte počáteční absorbanci a pak ji odečítejte v minutových intervalech po dobu 3 min.
- Vypočtěte rozdíl mezi následnými absorbancemi a průměrnou minutovou absorbancí ( $\Delta A/\text{min}$ )

### Výpočet aktivity AST:

$$\Delta A/\text{min} \cdot \frac{V_t \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot l \cdot V_s} = \text{U/l}$$

$$\mu\text{kat/l} = 60 \text{ U/l}$$

Molární absorpance ( $\varepsilon$ ); NADH při 340 nm je 6 300, světelná dráha ( $l$ ) je 1 cm. celkový reakční objem ( $V_t$ ) je 1,05 při 37°C a 1,1 při 30° C. objem vzorku ( $V_s$ ) je 0,05 při 37° C a 0,1 při 30° C, 1 U/l odpovídá 0,0166  $\mu\text{kat/l}$ . Následující rovnice je pro výpočet katalytické aktivity CK:

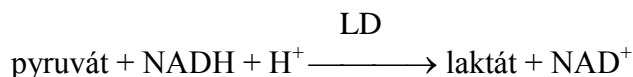
Faktory pro výpočet:

$$\begin{aligned} 37^\circ\text{C } \Delta A/\text{min} \times 3333 &= \text{U/l} \\ &\times 55,55 = \mu\text{kat/l} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 30^\circ\text{C } \Delta A/\text{min} \times 1746 &= \text{U/l} \\ &\times 29,1 = \mu\text{kat/l} \end{aligned}$$

## Stanovení katalytické aktivity laktátdehydrogenasy (LD)

Laktátdehydrogenáza (LD neboli LDH) katalyzuje redukci pyruvátu pomocí NADH za vzniku laktátu a  $\text{NAD}^+$ . Katalytická aktivita se určuje jako míra úbytku NADH, který se měří se při 340 nm.



### Pracovní postup:

- Pipetujte do označených zkumavek:

pracovní roztok <sub>LD</sub>	1,0 ml
vzorek	25 $\mu\text{l}$

- Promíchejte, nasajte do kyvety fotometru a zapněte stopky.
- Po 30 vteřinách inkubace odečtěte počáteční absorbanci a pak ji odečítejte v minutových intervalech po dobu 3 min.
- Vypočtěte rozdíl mezi následnými absorbancemi a průměrnou minutovou absorbanci ( $\Delta A/\text{min}$ ).

### Výpočet aktivity LD:

$$\Delta A/\text{min} \frac{V_t \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot l \cdot V_s} = \text{U/L}$$

$\Delta A/\text{min}$	x 6508 = U/L x 108 = $\mu\text{kat/L}$
-----------------------	---

### VYHODNOCENÍ:

marker	REFERENČNÍ HODNOTY	NAMĚŘENÉ HODNOTY
<b>CK</b>	muži 10 – 65 U/l ženy 7 – 55 U/l	0,167 – 1,084 $\mu\text{kat/l}$ 0,117 – 0,917 $\mu\text{kat/l}$
<b>AST</b>	< 29 U/l	< 0,48 $\mu\text{kat/l}$
<b>LD</b>	83 – 143 U/l	1,38 – 2,38 $\mu\text{kat/l}$

## Stanovení AST (GOT) a CK pomocí přístroje REFLOTTRON<sup>®</sup>, Roche

Stanovení koncentrace katalytické aktivity těchto enzymů je založeno na technice reflexní fotometrie, při níž se měří intenzita odraženého záření od homogenně zbarvené podložky. Reakce probíhají na pevném nosiči (reagenční zóna proužku), který obsahuje suchá činidla, aktivovatelná vodou obsaženou v naneseném vyšetřovaném vzorku. Reagencie potřebné pro reakci jsou nanesené až pod vrstvou skleněných vláken, na kterých se zachytí krvinky. Reflotron<sup>®</sup> může analyzovat plnou krev, plazmu nebo sérum.

Při stanovení postupujte podle návodu uvedeného v praktickém cvičení Stanovení celkového cholesterolu (TC), HDL cholesterolu (HDL-C) a triacylglycerolů (TAG), úloha 5.

### POZOR !

Přístroj Reflotron<sup>®</sup> udává výsledky v U/l. Získané údaje převed'te do jednotek  $\mu\text{kat/l}$  podle vztahu:

$$1 \text{ U} = 0,0166 \mu\text{kat}$$

### Pracovní postup:

- Stejným postupem jako v úloze 5.1. stanovte koncentraci katalytické aktivity uvedených enzymů v séru používaném v úlohách 1-3.
- Sérum nanášejte na příslušné reagenční proužky pipetou Reflotron (pevný objem 32  $\mu\text{l}$ ).
- Pipeta má tři zarážky. Při nasávání vzorku stiskněte píst k první zarážce a pomalu uvolňujte píst do základní polohy (vzorek musí být nabrán bez vzduchových bublin).
- Vzorek naneste na reagenční zónu proužku stisknutím pístu k druhé zarážce.
- Špičku odstraňte úplným stisknutím pístu pipety.

## Clearance

**Klíčová slova:** kreatin, kreatinin, cystatin C, glomerulární filtrace (GFR), tubulární sekrece, zpětná resorpce, clearance, exkrece,.

### Reagencie:

1. vzorek deproteinovaného séra S
2. vzorek moče U
3. standard K (kreatinin)
4. roztok kyseliny trichloroctové 1,22 mol/l **!ŽÍRAVINA!**
5. roztok kyseliny pikrové 0,04 mol/l
6. roztok hydroxidu sodného 0,75 mol/l



Ledviny jsou jedním ze základních orgánů, podílejících se na udržování homeostázy organismu. Vylučují koncové metabolity dusíkatých látek močovinu (viz. Dusíková bilance.) a kreatinin, dále kyselinu močovou, ionty, H<sup>+</sup>, atd.

Kreatinin je cyklický imid kyseliny N-metylguanidinoctové. Vzniká ve svalové tkáni neenzymaticky jako koncový produkt metabolismu kreatinu a kreatinfosfátu. Referenční rozmezí koncentrace kreatininu v plazmě (kreatininemie) je 70 – 125 μmol/l pro muže a 50 – 105 μmol/l pro ženy.

Kreatininemie je za fyziologických podmínek ovlivněna množstvím svalové hmoty. Proto se s nižšími hladinami setkáváme u dětí, osob s malým množstvím svalové hmoty, pacientů dlouhodobě připoutaných na lůžko (úbytek svalů z inaktivity) či u pacientů s myodystrofií. Zvýšenou hladinu kreatininu v séru pozorujeme při selhávání ledvin (renální insuficienci). Hladina kreatininu v krvi je jen podstatně méně ovlivněna jeho příjmem v potravě a tělesnou námahou.

Většina kreatininu se do moči dostává glomerulární filtrací (90 %), pouze minoritní podíl tubulární sekrecí (10 %). Za patologických okolností se na vzestupu kreatininemie podílí významně i porucha tubulární sekrece. Koncentrace kreatininu v definitivní moči je přibližně 100x vyšší než jeho koncentrace v plazmě. Celkové množství vyloučené za 24 hod se za normálních podmínek pohybuje mezi 9 – 16 mmol (tj. 1 – 1,8 g).

Důležitou roli v diagnostice poruch ledvinných funkcí má posouzení glomerulární filtrace, nejčastěji pomocí tzv. *clearance endogenního kreatininu*. **Clearance nějaké látky představuje teoretický objem krevní plazmy zcela očištěné ledvinami od této látky za jednotku času** (sekundu). V případě látky vylučované pouze glomerulární filtrací odráží clearance *rychlost glomerulární filtrace (GFR)*. Optimální indikátorovou látkou pro monitorování glomerulární filtrace je ta, která se do moči dostává výhradně glomerulární filtrací a není dále v tubulech ani resorbována ani secernována. Tyto podmínky splňuje inulin, zásobní sacharid rostlin. Jeho nevýhodou je především obtížné zajištění stabilní koncentrace v plazmě (nevyskytuje se přirozeně v lidském organismu, musel by být podáván intravenózně). Jeho využití je tedy spíše pro vědecké účely.

Pro výpočet clearance je potřeba znát koncentraci indikátorové látky v plazmě a moči, dále objem moči za definovaný časový interval (nejčastěji 24 hod).

$$GFR = \frac{U \cdot V}{P}$$

U – koncentrace látky v moči  
 P – koncentrace látky v plazmě  
 V – diuréza za 24 h [ml/s] (objem definitivní moči v ml / 86400 s)

V praxi lze použít odhadu clearance kreatininu dle *vzorce Cockcroftova a Gaulta*. Zohledňuje fakt, že vlastní koncentrace kreatininu závisí na svalové hmotě, pohlaví a věku pacienta, není nutný sběr moči. Pro ženy se vypočtená hodnota musí vynásobit koeficientem 0,85.

$$Cl_{kr} = \frac{(140 - \text{věk[roky]}) \cdot t.hm. [kg]}{44,5 \cdot S_{kr} [\mu\text{mol/l}]}$$

Cl<sub>kr</sub> – clearance kreatininu  
 S<sub>kr</sub> – sérová koncentrace kreatininu

V klinické praxi se hodnoty kreatininemie a clearance kreatininu využívá k monitorování renálních funkcí – zejména hloubky chronické renální insuficience. Normální Cl<sub>kr</sub> se pohybuje v rozmezí 1,3 – 2,8 ml/s/1,73 m<sup>2</sup> tj. hodnoty připadající na ideální povrch těla, tyto hodnoty se musí korigovat u pacientů s abnormálním povrchem těla (obezita). Při poklesu clearance pod 0,5 ml/s/1,73 m<sup>2</sup> mluvíme o renální nedostatečnosti při poklesu pod 0,15 ml/s/1,73 m<sup>2</sup> o renálním selhání.

Vhodnější biomarker funkce ledvin je **cystatin C**. Je to malý neglykosylovaný bazický protein (13,3 kD), patřící mezi inhibitory superrodiny cysteinových proteas. Cystatin C je produkován prakticky všemi jadernými buňkami a je přítomen ve všech vyšetřovaných tělesných tekutinách. Úroveň produkce je konstantní a není ovlivněna zánětlivými procesy, pohlavím, věkem a svalovou hmotností. V normální ledvině je cystatin C téměř volně filtrován glomerulární membránou a potom téměř úplně reabsorbován a degradován buňkami proximálního tubulu. Plazmatická koncentrace cystatinu C je tedy výhradně určena rychlostí glomerulární filtrace (GFR), což činí cystatin C výborným indikátorem GFR. Změny jeho sérové hladiny odhalí postižení ledvin dříve (v iniciální fázi), než je možné prokázat kreatininovou clearancí. Pro vyšetření stačí jen změřit jeho hladinu v séru, oproti kreatininu odpadá sběr moči za 24 hodin. Koncentrace cystatinu v séru je mírou glomerulární filtrace, jeho koncentrace v moči je mírou poškození buněk proximálních tubulů.

## REFERENČNÍ HODNOTY

<b>věk (roky)</b>	<b>cystatin C (mg/l)</b>
3 – 50	0,63 – 1,33
> 50	0.74 – 1.55

### Zvýšená hladina v krvi

- snížení glomerulární filtrace
- u některých nádorů (melanom, kolorektální karcinom)

### Zvýšená hladina v krvi i moči

- urémie (poškození glomerulů i tubulů)

## Stanovení koncentrace kreatininu v séru a moči

Stanovení je založeno na Jaffého reakci v deproteinovaném séru. Při reakci kreatininu s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí vzniká červenooranžově zbarvený produkt, jehož koncentrace se stanovuje fotometricky.

Pro stanovení koncentrace kreatininu v séru a moči obdržíte vzorek deproteinovaného séra a moče pacienta označeného číslem:

S = deproteinované sérum

U = moč

**POZOR! VZOREK MOČE ZŘEĎTE PŘED STANOVENÍM 50x. VÝSLEDEK JE TŘEBA VYNÁSOBIT 50x !**

### Pracovní postup:

- Sérum, zředěnou moč i standard zpracujte vždy v tripletu, slepý vzorek pouze jednou
- Do očíslovaných zkumavek napipetujte reagentie podle tabulky 1.

**Tabulka 1.**

reagencie (ml)	vzorek <sub>s</sub>	vzorek <sub>v</sub>	standard	slepý vzorek
deproteinované sérum	0,25	–	–	
moč zředěná 50x	–	0,25	–	–
standardní roztok K	–	–	0,25	–
destilovaná voda	0,50	0,50	0,50	0,75
kyselina trichloroctová	0,25	0,25	0,25	0,25
promíchat, nechat stát 5 min při laboratorní teplotě				
kyselina pikrová	0,50	0,50	0,50	0,50
hydroxid sodný	0,50	0,50	0,50	0,50

- Obsah zkumavek dobře promíchejte.
- **Přesně po 20 min** změřte absorbanci vzorků i standardu proti slepému vzorku při 505 nm.
- Naměřené hodnoty запиšte do tabulky 2.
- Vypočítejte průměrné hodnoty absorbance a запиšte je do tabulky 2.
- Z průměrných hodnot absorbance vzorků a standardu vypočítejte koncentraci kreatininu v séru  $c_P$  ( $\mu\text{mol/l}$ ) a v moči  $c_U$  ( $\text{mmol/l}$ ).
- **Vypočítanou koncentraci v moči vynásobte ředěním (50x).**
- Výsledky запиšte do tabulky 2.

**Tabulka 2.**

vzorek č.:	absorbance			průměr	koncentrace
standard K					
S					μmol/l
U					mmol/l

**Výpočet clearance**

Látkové množství kreatininu  $\underline{n}$ , které za sekundu přejde do glomerulárního filtrátu, se rovná součinu jeho koncentrace ve filtrátu a objemu filtrátu vytvořeného za sekundu. Protože kreatinin je nízkomolekulární látka, je jeho koncentrace ve filtrátu stejná jako v plazmě ( $c_P$ ). Objem vytvořeného filtrátu musí být stejný jako objem plazmy, která by se filtrací kreatininu zcela zbavila ( $V_P$ ), tedy

$$\underline{n} = c_P \cdot V_P.$$

Totéž látkové množství kreatininu  $\underline{n}$  z glomerulárního filtrátu se pak za každou sekundu vylučuje definitivní močí. Je tedy současně rovno součinu koncentrace kreatininu v definitivní moči ( $c_U$ ) a objemu moče vyloučeného za sekundu ( $V_U$ ). Platí tedy  $\underline{n} = c_U \cdot V_U$ . Pro výpočet kreatininové clearance GFR vyplývá následující vztah:

$$V_P \text{ (ml/s)} = \text{GFR} = \frac{c_U \cdot V_U}{C_P}$$

Hodnota GFR se obvykle ještě koriguje na standardní tělesný povrch 1,73 m<sup>2</sup>. Přitom se vychází z předpokladu, že plocha filtračního média v glomerulech je úměrná tělesnému povrchu. Tělesný povrch  $\underline{A}$  pacienta se vypočítá ze vztahu:

$$A = 0,167 \cdot \sqrt{m \cdot l}$$

0,167 je empirický faktor,  $\underline{m}$  hmotnost pacienta v kg a  $\underline{l}$  jeho výška v m. Pro výpočet korigované GFR<sub>kor</sub> platí:

$$\text{GFR}_{\text{kor}} \text{ (ml/s)} = \frac{c_U \cdot V_U \cdot 1,73}{c_P \cdot A}$$

Pro výpočet clearance je tedy třeba znát kreatininemii (mmo/l), kreatininurii (mmol/l), diurézu pro výpočet objemu moče za sekundu (ml/s), tělesnou výšku a hmotnost pacienta.

**Tabulka 3.**

<b>pacient</b>	<b>A muž</b>	<b>B žena</b>	<b>C muž</b>	<b>D žena</b>	<b>E muž</b>	<b>F žena</b>
diuréza* (ml/24 hod)						
hmotnost (kg)	82	58	95	58	90	70
výška (cm)	170	170	190	165	180	160

\* bude zadána

**Pracovní postup:**

- Z hodnot naměřených v úloze 1.1. vypočítejte kreatininovou clearance a exkreci kreatininu močí u zadaného pacienta:

$$\text{GFR}_{\text{kor}} = \dots\dots\dots \text{ ml/s}$$

$$\text{exkrece} = \dots\dots\dots \text{ mmol/24hod}$$

**Poznámky:**