

**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.**

**Doc.MUDr. Petr Bušek, Ph.D.**

**Doc. MUDr. Jaromír Křemen, CSc.**

**Doc. MUDr. Evžen Křepela, CSc.**

**Prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.**

**RNDr. Jana Soukupová, Ph.D.**

**MUDr. Jana Stříbrná, CSc.**

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

**Prof. 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
Detekce ethanolu ve vydechovaném vzduchu .....	18
Výpočty koncentrace alkoholu v krvi .....	18
Identifikace cizorodých látek (xenobiotik) a jejich metabolitů v moči .....	19
Identifikace kyselých látek (amobarbital, fenobarbital, pentobarbital) .....	19
Identifikace bazických látek (chlorpromazin, levopromazin, prochlorperazin, thioridazin, chlorprothixen, kodein) .....	19
Kyselé látky .....	20
Bazické látky .....	20
Stanovení koncentrace dusitanů ve vodě .....	21
Markery svalové tkáně .....	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 REFLOTRON®, Roche .....	32
Základní screening patologických součástí moče .....	33
Clearance .....	44
Stanovení koncentrace kreatininu v séru a moči .....	47
Výpočet clearance .....	48

# 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 alantoin. 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.

reagencie(ml)	vzoreks	vzoreku	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 (do laboratorního stolu).
- 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 ( <u>mmol/24 hod</u> )	4,2	
diuréza		

***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)  $166 \text{ } \mu\text{kat/l}$   
peroxidasa (PAP)  $16 \text{ } \mu\text{kat/l}$   
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 kontrainsulinární 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

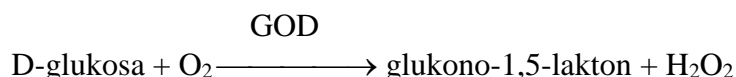
Při nálezu hraničních hodnot glykemie nebo rozporu mezi náhodnou glykemií a glykemií nalačno je indikován zátěžový test tzv. orální glukosový toleranční test (**oGTT**). Test je založen na sledování reakce organismu po perorálním podání definovaného množství glukosy (75 g ve 200-250 ml vody). Hodnotí 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 glukosaoxidasové -peroxidasové 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 moči 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)	Vzoreks	vzoreku	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

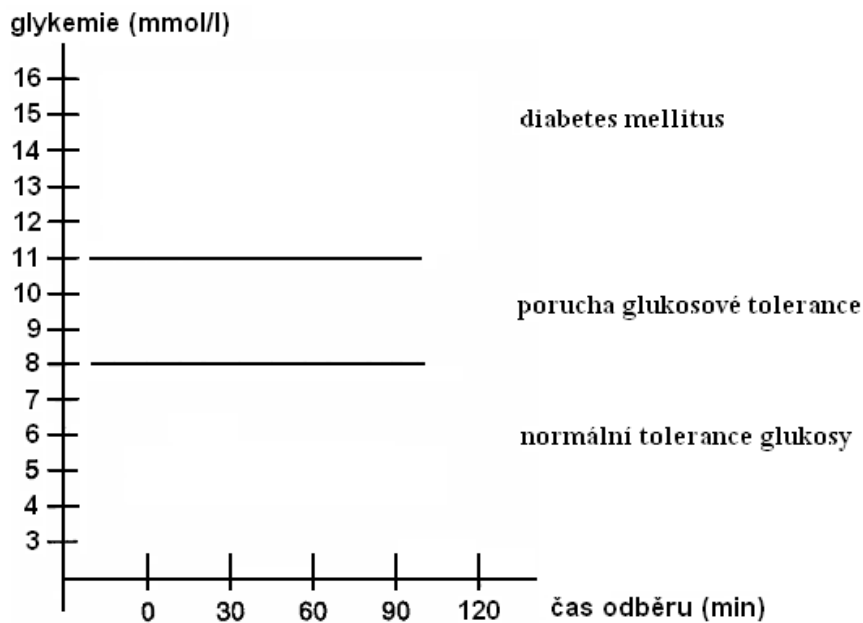
- Všechny zkumavky **dobře protřepejte** a nechte 30 min inkubovat při pokojové teplotě v **temnu** (v laboratorním stole).
- Změřte absorbance vzorků i standardního roztoku proti slepému vzorku do 30 min po ukončení inkubace při vlnové délce 500 nm. Naměřené hodnoty запиšte do tabulky 2.
- Z průměru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

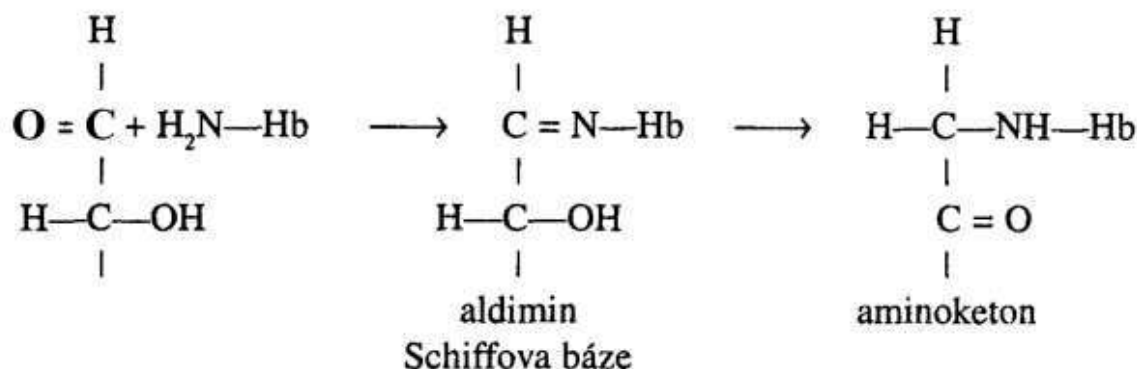
REFERENČNÍ HODNOTY	glykemie (mmol/l)		
	nalačno	po 1 hod	po 2 hod
Normální tolerance Glc	< 6	≤ 11	< 6

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 informaci 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.

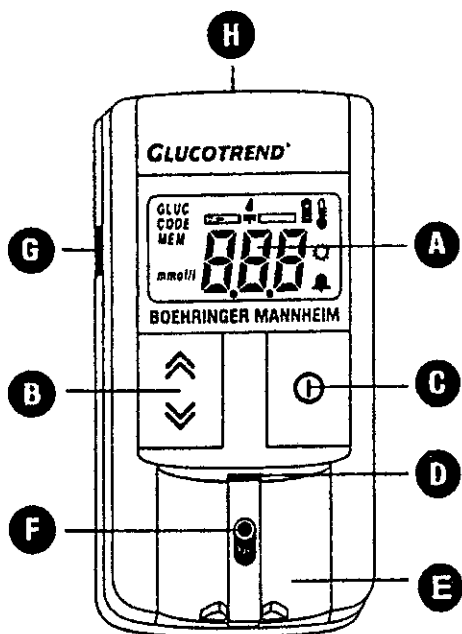
Podobně jako hemoglobin jsou glykované i ostatní proteiny. Glykace je jednou z nejdůležitějších posttranslačních modifikací proteinů nejen v plazmě, ale i ve tkáních. Tato spontánní reakce souvisí s poškozováním tkání některých orgánů a projevy komplikací u pacientů s diabetem.

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.


REFERENČNÍ HODNOTY	IFCC HbA <sub>1c</sub> (mmol/mol)	NPSG HbA <sub>1c</sub> (%)
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 štěrba**  
Sem vkládáte testovací proužek
- E Vodicí lišta testovacího proužku**  
Vodicí lišta testovacího proužku může být vyjmuta pro čištění
- F Měřicí okénko**
- G Štěrba 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.
- Srovnajte 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



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 plícemi 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 1.).

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. Vyhláše 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 %).

## 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.

**Tabulka 1**

čas (min)	0	30	60
Výsledek měření			
koncentrace EtOH (g/l) - vypočtená hodnota			

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

### Poznámky:

## ÚLOHA 2 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. tenkovrstvá chromatografie (TLC), která je rychlá a ekonomicky výhodná. 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 postřikem roztoku 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 2.1., proveďte 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

### ÚLOHA 3 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 0,5 mg/l (pro kojence do 6 měsíců pouze 0,1 mg/l)

Podstatou stanovení dusitanů ve vodě je diazotace kyseliny sulfanilové přítomnými dusitany a následující kopulace vzniklé diazoniové soli s N-(1naftyl)-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 4.
- Z kalibračního grafu odečtěte odpovídající hmotnostní koncentraci dusitanů v jednotlivých vzorcích vody.
- Výsledky запиšte do tabulky 4.

**Tabulka 3.**

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

**Tabulka 4.**

	Pitná voda	Balená voda	Studniční voda
absorbance			
koncentrace dusitanů			

**Poznámky:**

# Markery svalové tkáně

**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)-pentafofát 102 mmol/l, glukosa-6-fosfát-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 příčně pruhaného 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.

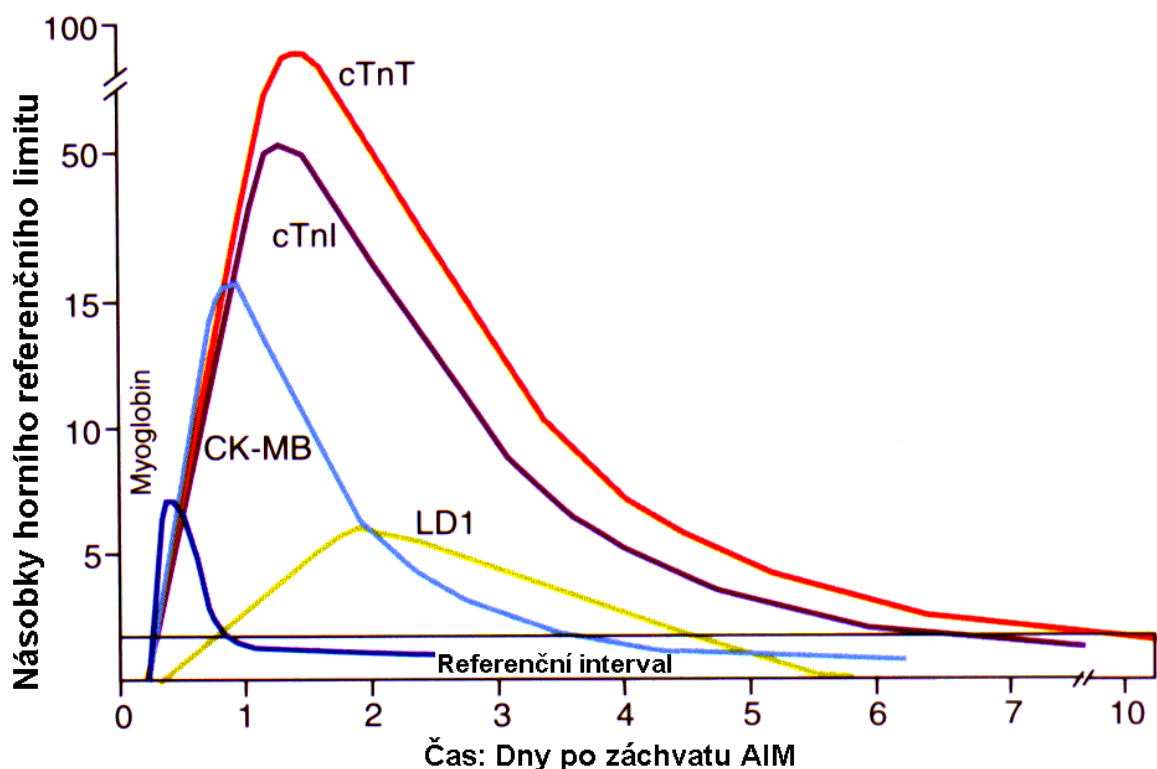
**Laktátdehydrogenasa (LD)** je nejméně specifickým markem poškození myokardu, větší specifičnost má stanovení jejích izoenzymů (při AIM je zvýšená aktivita izoenzymu H4, poměr LD1/LD2 se zvýší na hodnotu vyšší než 1). Aktivita po AIM stoupá poměrně pozdě, má však



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 nejspécifitější a nejcitlivější marker kardiálního poškození se pokládá stanovení **troponinu T (TnT)** nebo **I (TnI)**. Jsou součástí tzv. troponinového komplexu, který zabezpečuje posun aktinových a myosinových vláken a tím kontrakci svalů. 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.

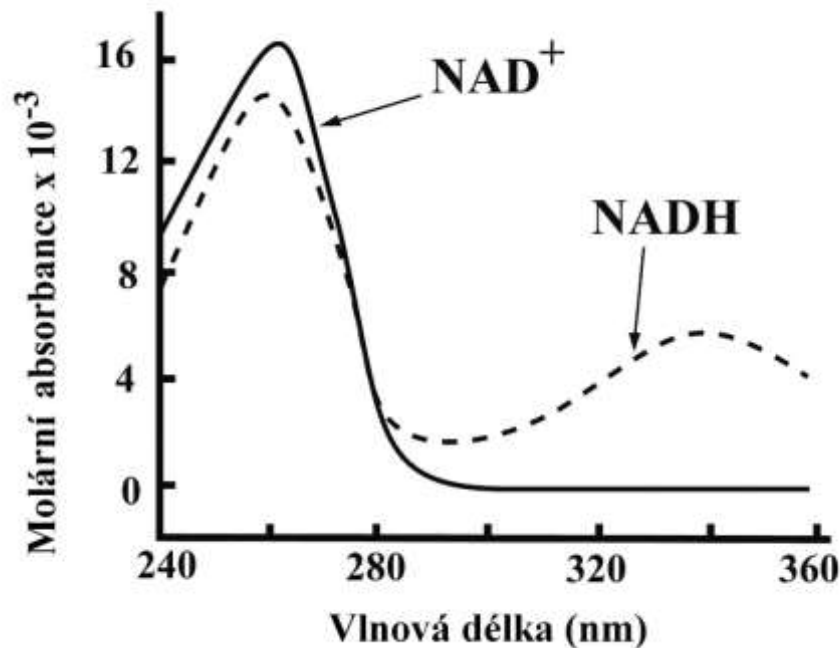
Mezi nové diagnostické testy, které zatím nejsou součástí klinické praxe, patří stanovení kardiospecifického izoenzymu glykogenfosforylasy BB, H-FABP (heart fatty acids binding protein) a albuminu s modifikovanou N terminální částí (tzv.: ischemia-modified albumin, IMA).

## 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).

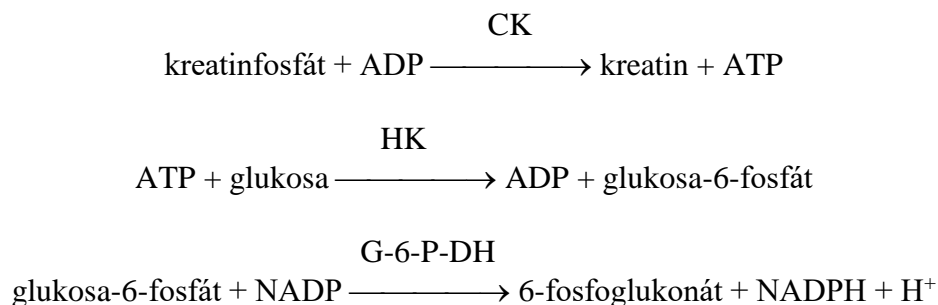


**Obr. 2.** Srovnání absorpčních spekter NAD a jeho redukované formy NADH

Změny absorpance 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 sprážených 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, čímž získáte minutové absorbance.
- Vypočítejte průměrnou minutovou absorbanci ( $\Delta A/\text{min}$ ).

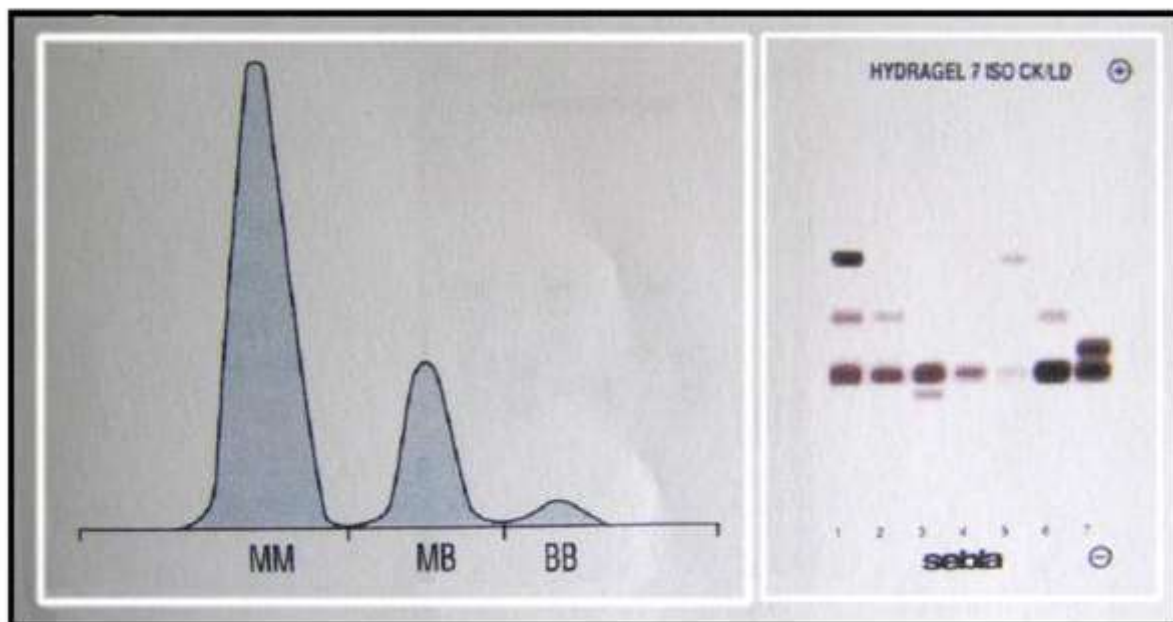
### Výpočet aktivity CK:

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

Molární absorbance ( $\epsilon$ ) NADPH při 340 nm je  $6\,300 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$ , 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

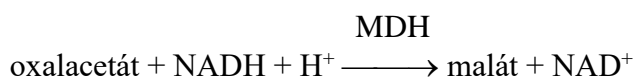
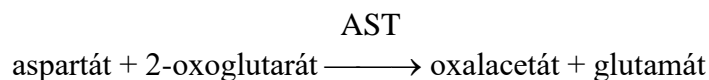
## HYDRAGEL ISO-CK K20



**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 spřažené reakce s malátdehydrogenasou (MDH). Úbytek NADH se měří fotometricky při 340 nm.



### Pracovní postup:

- Pipetujte do označených zkumavek

reakční teplota	25° C
pracovní roztok <sub>AST</sub>	1,0 ml
vzorek	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:

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

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

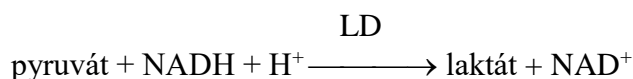
Molární absorpance ( $\epsilon$ ); NADH při 340 nm je  $6\,300 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$ , světelná dráha ( $l$ ) je 1 cm. celkový reakční objem ( $V_t$ ) je 1,1 při 25° C. Objem vzorku ( $V_s$ ) je 0,1 při 25° C, 1 U/l odpovídá 0,0166  $\mu\text{kat/l}$ . Následující rovnice je pro výpočet katalytické aktivity CK:

Faktory pro výpočet:

$$\begin{aligned} 25^\circ \text{ C } \Delta A/\text{min} \times 1746 &= \text{U/l} \\ \times 29,1 &= \mu\text{kat/l} \end{aligned}$$

## 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:**

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

## **Stanovení AST (GOT) a CK pomocí přístroje REFLOTRO<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.

### **5.1. Stanovení ALT AST (GOT) a CK ve vlastní kapilární krvi**

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:

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

### **5.2. Stanovení AST (GOT) a CK v séru používaném v úlohách 1-3**

#### **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.



# Základní screening patologických součástí moče

(Informativní – slouží k semináři)

**Klíčová slova:** složení moče, sediment, hustota, osmolalita, pH, patologické součásti.

## Reagencie:

1. Sulkowitchovo činidlo (25 g kyseliny šťavelové, 25 g šťavelanu amonného, 50 ml koncentrované kyseliny octové v 1,5 l vody)
2. roztok kyseliny sulfosalicylové 0,8 mol/l
3. kyselina octová zředěná 1:1
4. krystalický chlorid sodný
5. roztok o-tolidinu (3,3'- dimethylbenzidinu) v ledové kyselině octové 0,01 mol/l **!JED!**
6. peroxid vodíku 1 mol/l
7. Heitz -Boyerovo činidlo (bezbarvý redukovaný fenolftalein v alkalickém prostředí)
8. Fehlingův roztok I (síran měďnatý 70 g/l)
9. Fehlingův roztok II (250 g hydroxidu sodného a 350 g viněnu sodnodraselného v 1 l vody)
10. Benedictovo činidlo (1 l činidla obsahuje 17,3 g síranu měďnatého, 100 g bezvodého uhličitanu sodného a 173 g citrátu sodného)
11. krystalický nitroprussid sodný
12. roztok hydroxidu sodného 2 mol/l **!ŽÍRAVINA!**
13. koncentrovaná kyselina octová **!ŽÍRAVINA!**
14. Lestradetovo činidlo (směs síranu amonného, bezvodého uhličitanu sodného a nitroprussidu sodného v poměru 200:200:1)
15. Lugolův roztok (roztok jodu 20 g/l v roztoku jodidu draselného 40 g/l)
16. roztok chloridu železitého 0,4 mol/l
17. jodová tinktura (roztok jodu v ethanolu 10 g/l)
18. koncentrovaná kyselina dusičná **!ŽÍRAVINA!**
19. Hammarstenovo činidlo: směs 1 obj. 25 %kys. dusičné a 19 obj. 25 % kys. chlorovodíkové. 1 obj. směsi kyselin se smíchá se 4 obj. ethanolu
20. Ehrlichovo činidlo (4-dimethylaminobenzaldehyd 10 g/l v kys. chlorovodíkové 200 g/l)
21. chloroform
22. nasycený roztok octanu sodného
23. koncentrovaná kyselina sírová **!ŽÍRAVINA!**
24. souprava Quik Read U-ALB, Orion diagnostica

Močí je z organismu vylučována naprostá většina cizorodých i endogenních látek, jejichž kvalitativní a kvantitativní stanovení je důležitým ukazatelem celkového stavu pacienta a jeho metabolismu. Vzhledem k snadné dostupnosti vzorku bez větších nároků na pacienta a vzhledem k množství informací, které lze z jejich rozboru získat je analýza moči jedním ze základních vyšetření, umožňujících stanovit diagnózu, sledovat průběh onemocnění a jeho léčbu.

Stejně jako u všech laboratorních vyšetření, je pro správnost výsledků kriticky důležitá kvalita vzorku. Ta může být nepříznivě ovlivněna způsobem odběru, intervalu sběru moče a dobou mezi odběrem a samotnou analýzou. Pro většinu případů se používá první ranní moč (koncentrovaná), která musí být zpracována do jedné hodiny od odběru.

Pro speciální vyšetření, kde jsou větší časové nároky, je nutno moč konzervovat, neboť je vyšší riziko bakteriální, případně plísňové kontaminace. Tato kontaminace může mít za následek např. úbytek glukosy, posun pH do alkalické oblasti vlivem uvolňovaného amoniaku, nebo rozklad žlučových kyselin.

Mezi základní vyšetření moči patří stanovení jejích fyzikálních a chemických vlastností a dále mikroskopické vyšetření močového sedimentu. Z fyzikálního hlediska je hodnocen objem, barva, zákal, hustota a pH moči. Základní látky, které se v moči stanovují chemickým vyšetřením, jsou glukosa, ketolátky, proteiny, hemoglobin, ionty a metabolické produkty degradace hemu. Mikroskopicky se v močovém sedimentu stanovuje množství, typ a morfologie buněk, válce a eventuálně močové konkrementy. Mezi speciální vyšetření moči patří detekce produktů vznikajících konkrétní metabolickou poruchou, například kyselina fenylpyrohroznová, nebo homocystein, případně se provádí speciální toxikologická analýza.

## Chemické vyšetření moče

V současné době se k důkazu příp. semikvantitativnímu stanovení součástí moče často používají diagnostické proužky, které podle svého složení mohou být monofunkční, polyfunkční a speciální. Vyšetření moče diagnostickými proužky je jednoduché, rychlé a lze ho provádět i u lůžka pacienta.

Chemické principy, na kterých je založena funkce indikačních zón proužků, vycházejí z klasické chemické analýzy moče. Na stejných principech jsou založeny i automatické analyzátory, využívané v klinickobiochemických laboratořích pro kvantitativní stanovení.

### 1.1 pH

pH čerstvé moče se pohybuje v rozmezí 5 – 7, hodnota pH je ovlivněna potravou. Patologické hodnoty jsou především důsledkem poruch acidobazické rovnováhy organismu. Hodnota pH se zjišťuje indikátorovými papírky nebo pH-metrem.

### 1.2. Vápenaté ionty

Vápenaté ionty jsou fyziologickou součástí moče. Zvýšený příjem vápníku potravou i porucha zpětné resorpce  $\text{Ca}^{2+}$  se projevuje zvýšenou koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$  v moči. Zkouška je založena na reakci vápenatých iontů s oxalátovými ionty (viz Reakce biochemicky významných funkčních skupin organických sloučenin, úloha 3.2.).

#### Pracovní postup:

- K 1 ml moče přidejte 1 ml Sulkowitchova činidla a promíchejte.
- Po 2 min vyhodnoťte vznik zákalu nebo sraženiny, použijte stupnici:
  - + malý zákal (normální nález)
  - ++ větší zákal a sraženina
  - +++ značný zákal a sraženina
  - ++++ hustý zákal a sraženina
- Zapište chemickou reakci iontovou rovnicí:

### 1.3. Bílkoviny

V moči zdravého člověka jsou bílkoviny přítomny jen ve stopovém množství, které nepřesahuje 0,15 g/24 hod (fyziologická proteinurie). Koncentrace vylučovaných proteinů močí je závislá na poloze těla i na tělesné námaze. Proto je nutné vyšetřovat první ranní moč, aby se zachytila noční proteinurie.

Za patologickou proteinurií se považuje trvalé vylučování více než 100 mg bílkoviny do moče za 24 hod. Při velkých ztrátách plazmatických bílkovin močí dochází k poklesu onkotického tlaku krevní plazmy, a tím i k možnému úniku tekutiny do intersticia. Při plasmocytomu, kdy dochází k atypické syntéze imunoglobulinů se objevuje v moči Bence-Jonesova bílkovina tzv. paraprotein. Jsou to lehké řetězce imunoglobulinů, které snadno přecházejí do moče. Pro tuto bílkovinu je charakteristický vznik zákalu již při teplotě 50 – 60° C a jeho rozpuštění při zahřívání na vyšší teplotu.

Důkaz bílkovin v moči je založen na denaturačních reakcích. Zkoušky pro důkaz přítomnosti bílkovin se provádějí v přefiltrované moči.

Vyšetřování mikroalbuminurie je diagnostická metoda sloužící jako klinicky významný indikátor zhoršující se funkce ledvin (viz úloha 1.3.3.). Zvláště významné je toto vyšetření u nemocných s diabetem (I. i II. typu) a nemocných s hypertenzí. Nefropatie patří k nejčastějším a nejzávažnějším komplikacím diabetu. Je rovněž známo, že nemocní s mikroalbuminurií mají vyšší výskyt kardiovaskulárních příhod a časnou mortalitu. Nález mikroalbuminurie upozorňuje klinika na nezbytnost léčebného postupu, protože časná léčebná intervence může progresi nefropatie zastavit nebo zvrátit. Pokles mikroalbuminurie je navíc projevem pozitivní reakce na zvolený terapeutický postup.

Mikroalbuminurie je definována jako mírný vzestup exkrece albuminu do moči, který není prokazatelný indikátorovými proužky ke stanovení proteinurie. Exkrece albuminu do moči je mírou glomerulární integrity i tubulární reabsorpce.

#### 1.3.1. Důkaz kyselinou sulfosalicylovou (nejcitlivější a nejpoužívanější zkouška)

##### Pracovní postup:

- K 1 ml moče přidejte několik kapek roztoku kyseliny sulfosalicylové.
- Vyhodnoťte vznik opalescence nebo zákalu, případně sraženiny. Podle intenzity reakce lze zkoušku hodnotit i semikvantitativně. Použijte stupnici:

0 opalescence	do 0,1 g/l
+ průhledný zákal	0,1 – 0,25 g/l
++ neprůhledný zákal	0,25 – 2,0 g/l
+++ vločky	0,25 – 4,0 g/l
++++ tvarohovitá sraženina	nad 4,0 g/l

#### 1.3.2. Důkaz varem

##### Pracovní postup:

- Do zkumavky odlijte asi 2 ml moče.
- Pokud je pH vyšší, okyselte moč zředěnou kyselinou octovou na pH 4 – 4,5. Pokud je pH nižší, přidejte malé množství krystalického chloridu sodného, který umožní vysrážení bílkoviny i při tomto nižším pH (viz Bílkoviny I, úloha 5.4.).
- Z tohoto upraveného vzorku odeberte 1 ml.
- Povařte ve vroucí vodní lázni a výsledek porovnejte s vyhodnocením v úloze 1.3.1.

### 1.3.3. Stanovení albuminu v moči - mikroalbuminurie

Stanovení je založeno na měření komplexu antigenu a protilátky pomocí imunoturbidimetrie (Bílkoviny II, úloha 4.).

### 1.4. Krev a krevní barvivo

Za patologických okolností se může v moči vyskytovat krev (hematurie) nebo hemoglobin bez přítomnosti erythrocytů (hemoglobinurie). Příčiny hematurie jsou různé, např. krvácení z močového měchýře a ledvin následkem poranění nebo onemocnění ledvin a močových cest. K hemoglobinurii dochází také při vysoké koncentraci hemoglobinu v plazmě, např. při vyčerpané vazebné kapacitě haptoglobinu nebo u těžkých hemolytických anemií. Vzácněji se může v moči vyskytovat myoglobin (myoglobinurie) např. u těžkých popálenin, těsně po infarktu myokardu nebo při zhmoždění svalů při sportu. Rozlišení hematurie a hemoglobinurie umožní mikroskopické vyšetření močového sedimentu.

Důkaz hemoglobinu se provádí vždy, je-li v moči přítomna bílkovina. V případě pozitivního testu na krevní barvivo je nutné provést mikroskopické vyšetření močového sedimentu.

Zkoušky používané k důkazu krve a krevního barviva jsou založeny na peroxidasové a pseudoperoxidasové reakci (viz Biologické oxidace , úloha 3.). Zkoušky jsou pozitivní i v přítomnosti leukocytů v moči. Jejich peroxidasovou aktivitu lze odstranit povařením moče.

#### 1.4.1. Důkaz Heitz - Boyerovým činidlem (velmi citlivá zkouška)

##### Pracovní postup:

- K 1 ml moče přidejte 1 ml Heitz-Boyerova činidla a promíchejte.
- Opatrně po stěně zkumavky přidávejte "pasteurkou" roztok peroxidu vodíku (asi 0,5 ml).
- V případě pozitivní reakce vznikne na styčné ploše červenofialový prstenec.

#### 1.4.2. Důkaz o-tolidinem

##### Pracovní postup:

- K 1 ml moče přidejte 4 kapky roztoku o-tolidinu a 0,5 ml roztoku peroxidu vodíku.
- V případě pozitivní reakce vznikne modré až modrozelené zbarvení.

### 1.5. Sacharidy

Normální moč obsahuje pouze stopová množství sacharidů. Nejčastěji se vyšetřuje přítomnost glukosy, méně často fruktosy, galaktosy, laktosy, pentos apod.

Fyziologická koncentrace glukosy v moči může být přechodně zvýšená po požití velkého množství stravy bohaté na sacharidy, jestliže její koncentrace v krvi překročí reabsorpční schopnost ledvinových tubulů (alimentární glykosurie).

Za patologických okolností se glukosa vylučuje ve zvýšeném množství do moče u diabetické glykosurie, dále v případech, kdy je ledvinový práh pro glukosu snížen pod 9 mmol/l (renální glykosurie) např. u těhotných žen a u onemocnění ledvin. U renální glykosurie není zvýšená koncentrace glukosy v krvi.

Glykosurie se také objevuje u vystupňovaných stresových stavů v důsledku působení adrenalinu a glukokortikoidů na glykemii.

Glukosa v moči se dokazuje buď nespecifickými zkouškami založenými na redukčních vlastnostech glukosy nebo specifickou glukosoxidázovou reakcí (semikvantitativní stanovení diagnostickými proužky a kvantitativní stanovení).

Při důkazu glukosy redukčními zkouškami nesmí moč obsahovat bílkoviny, které se musí odstranit vysrážením a filtrací (deproteinovaná moč). Falešně pozitivní reakci způsobuje např. přítomnost kyseliny močové, homogentisové nebo askorbové v moči při nedodržení reakčních podmínek.

### **1.5.1. Důkaz Fehlingovou zkouškou**

#### **Pracovní postup:**

- *Ve zkumavce smíchejte Fehlingův roztok I a II v poměru 1:1, promíchejte, celkový objem činidla asi 1 ml.*
- *Ke vzniklému modrému roztoku přidejte 1 ml deproteinované moče, dobře promíchejte a zahřívajte ve vroucí vodní lázni.*
- *V pozitivním případě se po krátkém povaření vyloučí červená sraženina oxidu měďného.*

### **1.5.2. Důkaz Benedictovou zkouškou (viz Sacharidy I, úloha 2.1.2.)**

#### **Pracovní postup:**

- *K 1 ml Benedictova činidla přidejte asi 3 kapky deproteinované moče a dobře promíchejte.*
- *Obsah zkumavky zahřívajte ve vroucí vodní lázni asi 2 min.*
- *V pozitivním případě se vyloučí oxid měďný jako červená sraženina.*

#### **Poznámka:**

Oxido-redukční reakce mohou být falešně pozitivní, užívá-li pacient některé léky – např. nalidixovou kyselinu (Nalidixin, NegGram) používanou při infekci močových cest, probenecid při terapii dny a cefalosporinová antibiotika.

**Přítomnost kys. askorbové (vitamin C) způsobuje pozitivitu oxidoredukčních testů. Fehlingova zkouška (zbarvení dle množství kyseliny askorbové) je pozitivní již za studena. S Benedictovým činidlem vytváří za studena bílou sraženinu, která do 5 min. přechází přes žlutou barvu na oranžovou, nebo při slabém zahřátí, kdežto v případě Nylanderova činidla za studena nereaguje a po 2 min. povaření přechází ve slabě černě zbarvený čirý roztok.**

## **1.6. Ketolátky**

Ke skupině ketonových látek, dokazovaných v moči, patří kyselina acetoctová, z ní vznikající kyselina 3-hydroxymáselná a aceton.

Vzestup koncentrace ketolátek v krvi je provázen jejich vylučováním moči (ketonurie). Průkaz ketolátek v moči má význam hlavně pro včasné rozpoznání metabolické dekompenzace diabetiků (diabetická ketoacidosa), při hladovění, po těžké námaze a po požití většího množství tuků.

Důkaz kyseliny acetoctové a acetonu je založen na vzniku barevného komplexu reakcí s nitroprussidem sodným v alkalickém prostředí.

### **1.6.1. Důkaz Legalovou zkouškou**

#### **Pracovní postup:**

- Několik krystalků nitroprussidu sodného rozpustíte v 1 ml destilované vody (zbytek uchovat pro úlohu 1.9.).
- K 1 ml moče přidejte 2 kapky připraveného roztoku nitroprussidu sodného a 1 ml roztoku hydroxidu sodného.
- Červeně zbarvený roztok rozdělte do dvou zkumavek.
- Do jedné zkumavky přidejte několik kapek koncentrované kyseliny octové.
- V přítomnosti ketolátek se zbarvení prohloubí do červenofialova.
- V negativním případě se roztok odbarví (původní červené zbarvení roztoku způsobuje kreatinin vždy přítomný v moči).

### **1.6.2. Důkaz Lestradetovým činidlem**

#### **Pracovní postup:**

- Na porcelánovou odpařovací misku položte kolečko filtračního papíru a dejte na něj malé množství Lestradetova činidla.
- "Pasteurkou" kápněte malé množství moče na filtrační papír vedle činidla. Asi po 5 min se na styku vztlínající moče s činidlem objeví fialové zbarvení, které je důkazem ketolátek.

### **1.6.3. Důkaz acetonu jodoformovou reakcí**

#### **Pracovní postup:**

- Ve zkumavce smíchejte asi 0,5 ml moče s 1 ml roztoku hydroxidu sodného, přidejte přibližně 3 ml Lugolova roztoku.
- V přítomnosti acetonu se roztok zakalí vyloučeným jodoformem.

### **1.6.4. Důkaz kyseliny acetoctové**

#### **Pracovní postup:**

- K 1 ml moče přidejte několik kapek roztoku chloridu železitého a moč zfiltrujte.
- V přítomnosti kyseliny acetoctové má filtrát tmavě červenou barvu.
- V případě pochybnosti povařte nový vzorek moče. Kyselina acetoctová dekarboxyluje, vznikající aceton vytěká a zkouška je negativní.

## **1.7. Žlučová barviva**

Do skupiny žlučových barviv, která se dokazují v moči, patří bilirubin, urobilinogen, sterkobilinogen, jejich oxidační produkty urobilin a sterkobilin (viz Tetrapyrroly.).

Bilirubin se v játrech konjuguje s kyselinou glukuronovou a se žlučí odchází do duodena. Za patologických stavů např. při obstrukci žlučových cest (obstrukční ikterus) nebo při těžkém poškození jaterního parenchymu (hepatocelulární ikterus), stoupne koncentrace bilirubinu nad ledvinový práh (30 – 34  $\mu\text{mol/l}$  a konjugovaný bilirubin se vylučuje do moče (bilirubinurie). U hemolytických žloutenek se v krvi zvyšuje koncentrace nekonjugovaného bilirubinu, který ale do moče neproniká.

Urobilinogen a sterkobilinogen (tzv. Ehrlich pozitivní látky) se v moči vyskytují jen v malém množství. Při poškození jaterního parenchymu, (infekční žloutenka, cirhosa) nebo při nadměrné tvorbě bilirubinu (hemolytická žloutenka, hemolytická anemie) se jejich koncentrace v moči zvyšuje.

### **1.7.1. Důkaz konjugovaného bílirubinu**

Podstatou používaných reakcí je oxidace bilirubinmono- a diglukuronátů na zelené biliverdinglukuronáty. Moč je třeba vyšetřit co nejdříve, aby se předešlo samovolné oxidaci bilirubinu.

#### **1.7.1.1. Důkaz Rosinovou zkouškou - roztokem jodu**

##### **Pracovní postup:**

- 1 ml moče převrstvíte 1 ml jodové tinktury.
- V pozitivním případě se na styčné ploše vytvoří zelený prstenec biliverdinu.

#### **1.7.1.2. Důkaz Gmelinovou zkouškou - kyselinou dusičnou**

##### **Pracovní postup:**

- 1 ml moče převrstvíte 1 ml koncentrované kyseliny dusičné (dávkovač).
- V pozitivním případě se na styčné ploše vytvoří zelený prstenec biliverdinu.

#### **1.7.1.3. Důkaz Hammarstenovou zkouškou (varianta Gmelinovy zkoušky)**

##### **Pracovní postup:**

- 1 obj. Hammarstenova činidla se smíchá se 4 obj. ethanolu a přidá se kapka moči k přibližně 2 ml činidla.
- V přítomnosti bilirubinu vznikne zelené zbarvení biliverdinu.
- Přidá-li se postupně více kyseliny, zbarvení směsi se mění přes celou stupnici Gmelinovy reakce, vzhledem k progresivní oxidaci bilirubinu přes stadium zeleně, - biliverdin, modř – bilicyanin a nakonec červený pigment – bilipurin, který se mění na žlut, která je choletelin.

*Hammarstenova zkouška je vhodná pro testování přítomnosti bilirubinu v moči, která obsahuje malé množství bilirubinu nebo velká množství urobilinu a indoxylu*

### **1.7.2. Důkaz urobilinogenu a sterkobilinogenu**

Urobilinogen a sterkobilinogen tvoří za studena v silně kyselém prostředí s Ehrlichovým činidlem červeně zbarvené kondenzační produkty.

Reakce je nespecifická. Porfobilinogen poskytuje barevné kondenzační produkty, které nejdou vytřepat do chloroformu. Indol a indolové melanogeny tvoří s Ehrlichovým činidlem červenofialové zbarvení, které vymizí po protřepání s nasyceným roztokem octanu sodného. V přítomnosti sulfonamidů vzniká žluté až oranžové zbarvení, (viz Reakce biochemicky významných funkčních skupin organických sloučenin, úloha 4.).

Urobilinogen a sterkobilinogen reagují s Ehrlichovým činidlem za studena, proto se vyšetřují v čerstvé, vychladlé moči. V čerstvě vymočené moči vznikne červené zbarvení vždy (pozitivitu způsobuje fyziologické množství barviv). Pokud zbarvení v tomto případě



nevznikne, jedná se o snížení koncentrace nebo úplné chybění urobilinogenu (např. u obstrukčního ikteru).

### Hodnocení nálezu žlučových barviv v moči

žlučová barviva	normální nález	hemolytický ikterus	hepatocelulární ikterus	obstrukční ikterus
konjugovaný bilirubin	negativní	negativní	+	+
urobilinogen	negativní	+	+	negativní

### Pracovní postup:

- Ke 2 ml chladné čerstvé moče přidejte 0,5 ml Ehrlichova činidla.
- V přítomnosti urobilinogenu a sterkobilinogenu se do 5 min vytvoří červené zbarvení.
- Polovinu roztoku odlijte do druhé zkumavky.
- Do jedné zkumavky přidejte 1 ml chloroformu a protřepejte.
- Zbarví-li se chloroformová vrstva červeně, jsou přítomny urobilinogen a sterkobilinogen.
- Je-li červeně zbarvená vodná vrstva, jedná se o falešnou pozitivitu Ehrlichovy zkoušky (porfobilinogen).
- Do druhé zkumavky přidejte 1 ml nasyceného roztoku octanu sodného.
- Pokud zbarvení vymizí, jedná se opět o falešnou pozitivitu Ehrlichovy zkoušky (indol a jeho deriváty).
- V další zkumavce smíchejte 1 ml čerstvě vymočené moče a 5 kapek Ehrlichova činidla. Pozorujte zda vznikne červené zbarvení.

### 1.8. Porfyriny

Zvýšené vylučování porfyrinů (tetrapyrrolových prekurzorů hemu) moči - **porfyrinurie**, se vyskytuje při vrozených vadách biosyntézy hemu – **porfyriích**, ale také u jaterní cirhózy, u pacientů s chronickou infekcí virem hepatitidy C (HCV) s abusem alkoholu a při některých otravách (olovo, hexachlorbenzen, otravách léky - barbituráty, sulfonamidy, chloramfenikol atd.).

Moč obsahující porfyriny na světle tmavne a dává pozitivní Ehrlichovu reakci (porfobilinogen, viz úloha 1.7.2.)

Důkaz porfyrinů využívá jejich červenou fluorescenci v UV světle (viz Tetrapyrroly, úloha 2.1.).

Určité typy porfyrií (akutní jaterní porfyrie) a otravy (např. akutní otrava Pb) jsou provázeny vylučováním netetrapyrrolových prekurzorů – 5-aminolevulátu ( $\Delta$ -aminolevulátu) a porfobilinogenu. 5-aminolevulát se stanovuje HPLC a porfobilinogen v eluátu po absorpční chromatografii na anionickém iontoměničím fotometricky Ehrlichovým činidlem..

### Pracovní postup:

- K 1 ml moče přidejte pipetkou 1 kapku koncentrované kyseliny sírové a moč pozorujte v UV světle.
- V přítomnosti porfyrinů se objeví červená fluorescence.

## 1.9. Indolové melanogeny

Indolové melanogeny vznikají jako meziprodukty při biosyntéze melaninu z tyrosinu. Jejich vylučování močí ve zvýšeném množství svědčí pro přítomnost nádoru pigmentových buněk (maligní melanom). Moč obsahující melanogeny na vzduchu tmavne, protože jejich oxidací vzniká černý pigment tzv. močový melanin.

Indolové melanogeny se prokazují Thormählenovou zkouškou, která se provádí stejně jako zkouška Legalova pro důkaz ketolátek, ale po přidání kyseliny octové se objeví modré zbarvení (viz úloha 1.6.1.).

### Pracovní postup:

- K 1 ml moče přidejte 2 kapky připraveného roztoku nitroprussidu sodného z úlohy 1.6.1., 1 ml roztoku hydroxidu sodného a několik kapek koncentrované kyseliny octové.
- V pozitivním případě se objeví modré až modrozelené zbarvení.

## 1.10. Kyselina fenylpyrohroznová

Při dědičné metabolické poruše funkce enzymu fenylalaninhydroxylasy je blokována přeměna fenylalaninu na tyrosin. Koncentrace fenylalaninu a jeho metabolitů (fenylpyruvát, fenyllaktát, fenylacetát) v krvi se zvyšuje a dochází k jejich vylučování močí (fenylketonurie). Důkaz je založen na reakci kyseliny fenylpyrohroznové s chloridem železitým za vzniku zeleně zbarveného komplexu.

### Pracovní postup:

- K 1 ml moče přidejte 1 kapku roztoku chloridu železitého.
- V pozitivním případě se během několika minut objeví tmavě zelené zbarvení vzniklého komplexu.

## VYHODNOCENÍ:

vzorek č.				
pH				
vápenaté ionty				
bílkoviny				
krev				
glukosa				
aceton				
kyselina acetoctová				
bilirubin				
urobilinogen				
porfyriny				
melanogeny				
kys.fenylpyrohroznová				

### Poznámky:



# 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 Cockroftova 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.**

reagentie (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 zapište do tabulky 2.
- Vypočítejte průměrné hodnoty absorbance a zapište 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 zapište 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:**

