

## Glukóza, látky s nebílkovinným dusíkem a porfyriny

V krevní plazmě se nachází velké množství látek, významných z hlediska klinické biochemie. V tomto kurzu bude stručně popsán význam sacharidů, látek s nebílkovinným dusíkem a porfyrinů, dále některé metody stanovení glukózy, látek nebílkovinného dusíku a bilirubinu a také budou zmíněny některé látky další.

### SACHARIDY

Sacharidy jsou aldehydy nebo ketony polyhydroxyalkoholů. Nejjednodušší sacharidy, monosacharidy, se podle počtu uhlíků dělí na triosy, tetrosy, pentosy atd., podle přítomnosti aldehydové či ketonové skupiny pak na aldosy a ketosy. Monosacharidy již nemohou být hydrolyzovány na sacharidy jednodušší, složitější cukry ano. Disacharidy poskytují hydrolyzou dvě monosacharidové jednotky, oligosacharidy dvě až deset, polysacharidy více jak deset monosacharidových jednotek.

Sacharidy jsou hojně rozšířeny jak v rostlinné, tak v živočišné říši. Plní zde úlohu strukturní i metabolickou. Nejrozšířenější a biomedicínsky nejdůležitější monosacharid, glukóza, vzniká u rostlin fotosyntézou z oxidu uhličitého a vody. Glukóza je ukládána ve formě škrobu nebo je přeměňována na celulosu, která tvoří základ rostlinného pletiva. U živočichů, i když mohou některé sacharidy syntetizovat z tuku a bílkoviny, je většina sacharidů odvozena z rostlin.

Mnoho monosacharidů tvoří meziprodukty při metabolismu glukosy (triosy, tetrosy, pentosy, sedoheptulóza). Fyziologicky významné jsou i mnohé deriváty glukosy (např. kyselina glukuronová aj.) a také některé disacharidy (maltóza, sacharóza, laktóza) a zásobní formy glukosy (glykogen u živočichů, škrob u rostlin).

Ve formě glykosidů se cukry vyskytují v různých sloučeninách jako léčiva (kardiální glykozidy, některá antibiotika), různé aromatické látky, jsou i součástí živočišných tkání.

Nemoci týkající se sacharidů jsou zejména *diabetes mellitus*, *galaktosemie*, *nemoci ze střádání glykogenu* a *nesnášenlivost mléka*.

### Glukóza

Podstatná část sacharidů se dostává v savčím organismu do krevního oběhu ve formě glukosy, a to buď přímou resorpcí z potravy, nebo přeměnou sacharidu na glukosu v játrech. V savčích tkáních (kromě přežvýkavců) je glukóza hlavním metabolickým palivem, je rovněž univerzálním metabolickým palivem plodu (fetu).

Glukóza je také prekursorem ostatních sacharidů vyskytujících se v těle, resp. ostatní cukry vyskytující se v těle se z ní mohou tvořit. Mnohé z nich mají vysoce speciální funkce: glykogen je zásobní formou glukosy, ribóza tvoří důležitou součást nukleotidů, nukleových kyselin a mnohých koenzymů, galaktóza je přítomná v laktóze v mléce, v některých komplexních lipidech či v kombinaci s bílkovinami v glykoproteinech a v proteoglykanech (glykany = polysacharidy).

Krevní cukr **glukóza** představuje *okamžitý* energetický zdroj pro potřeby organismu (*zásobními* zdroji energie jsou glykogen a především tuky). Jeho hladina/koncentrace v krvi je pečlivě udržována složitými regulačními mechanismy (podrobnosti v kreditním kurzu Hormony I) a ve zdravém organismu je stálá. Precizní a přesné stanovení koncentrace glukózy v krvi (plazmě, séru, kapilární krvi) se řadí mezi základní analytické metody klinické biochemie a patří vedle rutinních a statimových i mezi *vitálně* důležité analýzy.

## Metody stanovení glukózy

### Metody neenzymové

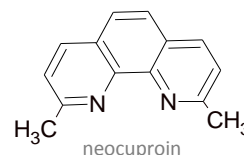
Tyto metody mají pouze historický význam a dnes se nepoužívají.

**Metody využívající redukčních vlastností glukosy** (některé příklady):

- Oxidace glukózy pomocí  $\text{Fe}^{3+}$  (ferrikyanid) podle *Hagedorna* a *Jensena* (dříve nejrozšířenější): ferrikyanid draselný je glukosou redukován na ferrokyanid, který je vysrážen ve formě zinečnato draselné soli, zbývající ferrikyanid je kvantitativně redukován jodidem podle rovnice:  

$$2\text{H}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 + 2\text{HI} = 2\text{H}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 + \text{I}_2$$
 Uvolněný jod je titrován tiosulfátem.
- Oxidace glukózy pomocí  $\text{Cu}^{2+}$ :

- **Neocuproinová metoda**  
Mědné ionty ( $\text{Cu}^+$ ) vzniklé reakcí  $\text{Cu}^{2+}$  s cukrem reagují s neocuproinem (2,9-dimethyl-1,10-fenantrolin) za vzniku oranžového komplexu rozpustného v EtOH ( $\lambda_{\text{max}} = 457 \text{ nm}$ )
- **Reakce podle Nelsona a Somogyiho**  
Mědné ionty ( $\text{Cu}^+$ ) vzniklé reakcí  $\text{Cu}^{2+}$  s cukrem dále redukuje arsenomolybdenovou kyselinu na molybdenovou modř ( $\lambda_{\text{max}} = 820 \text{ nm}$ )



### Kopulace s aromatickými aminy v kyselém prostředí

Reakce glukózy s aromatickými aminy (o-toluidin, benzokain a další) za tepla (var reakční směsi) na barevnou látku; nejčastěji se používal o-toluidin.

**Bývalá diagnostická souprava PLIVA-Lachema Diagnostika:** činidlo obsahovalo vedle o-toluidinu také koncentrovanou kyselinu octovou, thiomocovinu a kyselinu oxalocetovou (existují různé modifikace); v původním provedení se sérum deproteinovalo 5% kyselinou trichloroctovou, přídavek tetraboritanu sodného k reakční směsi tento stupeň analýzy odstranil

### Metody enzymové

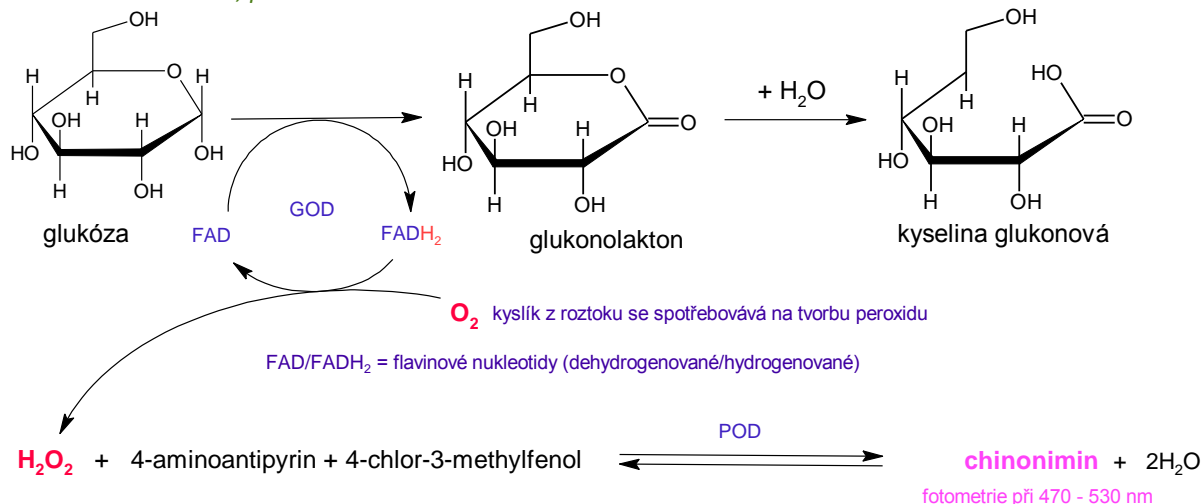
Moderní a široce používané enzymové metody byly vyvinuty zejména pro automatické analyzátoři, využívají se však v prakticky každém typu provozu (podobně jako řada dalších analytických metod).

Jedná se o stanovení glukózy pomocí enzymů

- **glukózaoxidázy a peroxidázy (GOD/POD):** glukóza je oxidována kyslíkem z roztoku na kyselinu glukonovou, vzniklý peroxid vodíku je stanoven modifikovanou Trinderovou reakcí (viz kreditní kurz *Analytická fáze*)
- **hexokinázy a glukóza-6-fosfát dehydrogenázy:** v tomto postupu je využito fosorylačních reakcí známých z biochemie cukrů, kdy je pomocí hexokinázy fosforylována glukóza na glukóza-6-fosfát, který je následně za katalýzy G6PD (glukóza-6-P dehydrogenáza) dehydrogenován na 6-P-glukonolakton. Koenzym reakce, NADP, je přitom hydrogenován. Sleduje se nárůst absorbance při 340 nm (optický test, viz kreditní kurz *Analytická fáze*). Referenční metoda, používaná často i jako metoda rutinní.

### Metoda s glukózaoxidázou a peroxidázou

Glukózaoxidáza EC 1.1.3.4., peroxidáza EC 1.11.1.x



**Diagnostická souprava BLT (PLIVA-Lachema Diagnostika):** Glukóza Liquid 1000, Glukóza GOD 1500: v Trinderově reakci je použit 3-methylfenol, výsledkem je růžové zbarvení fotometrovatelné v oblasti 490 – 540 nm.

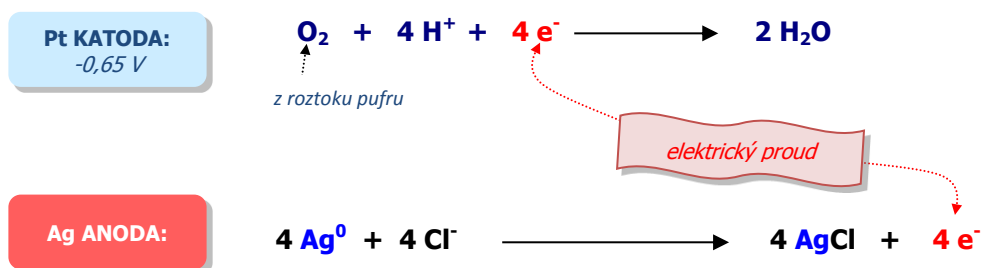
**Referenční hodnota:** FPG = <5,6 mmol/l

**Poznámka I:** označení fP-glukóza značí „glukóza stanovená z plazmy pacienta, který nejedl určitou dobu, lačníl“ – viz „Stanovení diagnózy z hodnoty glykémie (FPG)“; f = fast = nalačno.

**Poznámka II:** K referenčním hodnotám glykémie viz více v kapitole 14, str. 14-22

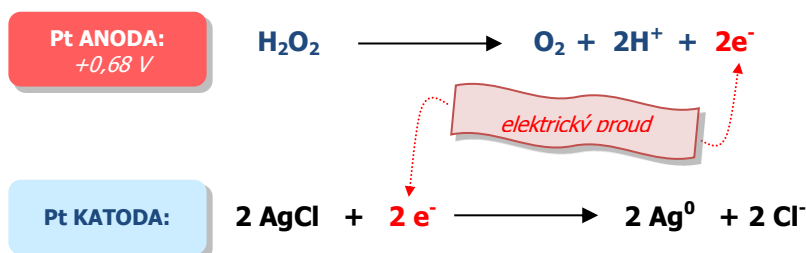
Reakce s glukózooxidázou se využívá i v **jednoučelových analyzátorech** pro stanovení koncentrace glukózy v séru, v plazmě či v hemolýzátu, výsledek reakce je však zjišťován **amperometricky**, nikoliv fotometricky.

Prvním principem je amperometrické stanovení **úbytku kyslíku** v roztoku pufru, ve kterém probíhá glukózooxidázová reakce. Kyslík přebírá na **platinové katodě Clarkovy elektrody** elektrony a tvoří se voda (schéma na následující straně):

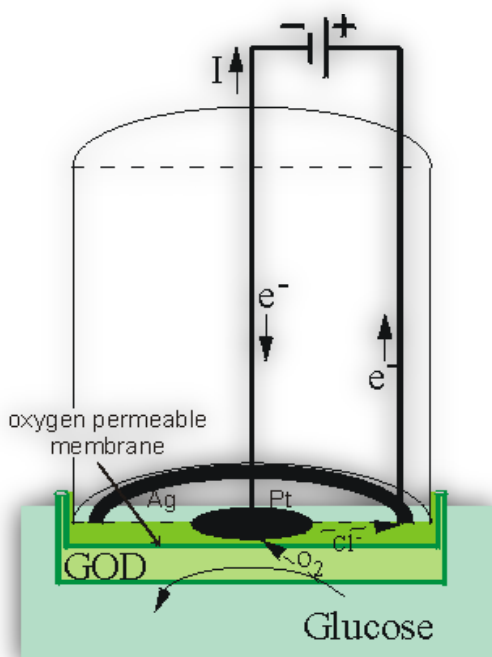


Elektrony ve výše uvedené reakci představují elektrický proud, který se měří, a který je úměrný koncentraci kyslíku v roztoku (čím větší úbytek kyslíku, tím vyšší koncentrace glukózy – *kyslík se spotřebovává na tvorbu peroxidu a z roztoku ubývá* → dojde k poklesu proudu).

Jinou možností amperometrické indikace je **přímé stanovení vzniklého peroxidu vodíku** na **Pt anodě** (peroxid předává platinové anodě elektrony a dochází k jeho rozkladu, redukce peroxidu):



Na tomto principu pracuje např. výrobek fy EKF Biosen C-Clinic



**Clarkova elektroda** je galvanický článek tvořený zdrojem, centrální Pt elektrodou a Ag/AgCl elektrodou, která je situována kolem centrální Pt elektrody. Článek je vložený do vhodného prostředí (pufr s obsahem KCl). Podle toho jaké napětí se vloží na Pt elektrodu, bude tato katodou (-0,65 V) nebo anodou (+0,68 V) a bude probíhat první nebo druhý výše popsaný děj. V prvním případě jsou elektrody s pufrům odděleny od prostředí s glukózooxidázou polyetylenovou membránou propouštějící pouze kyslík. Na obrázku vlevo je příklad takového jednoduchého uspořádání.

**Vysvětlivka k obrázku:** oxygen permeable membrane = membrána propustná pro kyslík

Glukózooxidáza může být součástí reakčního roztoku (přístroje fy Beckman) nebo může být imobilizována na membráně na **Clarkově elektrodě** (glukometr Super G).

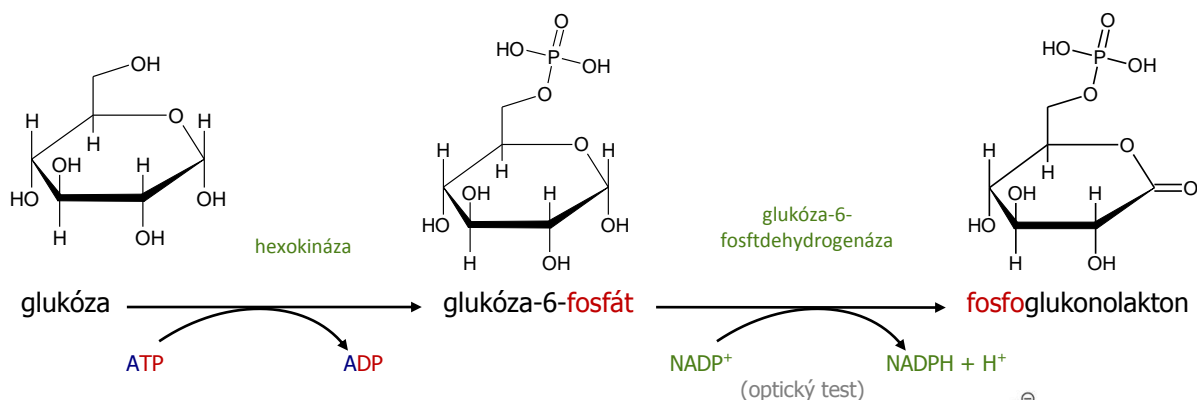
Elektrody s ukotvenými enzymy se nazývají **enzymové elektrody** nebo též **biosensory**

Enzymové metody stanovení glukózy představují rovněž principy reakcí diagnostických proužků jak na stanovení glukózy v moči, tak pro tzv. **self-monitoring**, čili stanovení hladiny glykémie pacientem pomocí **osobního glukometru** (<http://www.novabiomedical.com/>). Osobní glukometry mohou pracovat i na amperometrickém principu.



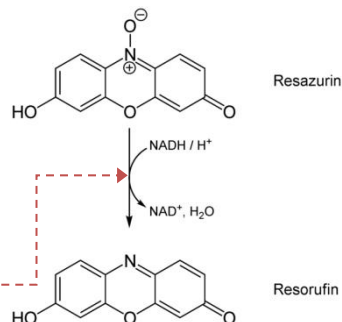
Glukometry fy **Nova Biomedical**: vlevo, přístroj pro nemocniční použití umožňující obousměrnou komunikaci v síti, opatřený čtečkou čárových kódů a dalšími funkcemi, vpravo, přístroj spíše pro domácí užití, bez možnosti napojení do sítě. Vlevo znázorněna **čtyřvrstvá** struktura dg proužku – biosenzoru.

### Metoda s hexokinázou a glukózadehydrogenázou



### Zjištění výsledku

1. *Spražení s další reakcí, kdy výsledkem je barevný či fluorescenční produkt, měřitelný foto- či fluorimetricky (příslušná látka je redukována pomocí  $\text{NADPH}_2$ ):*
  - ▶ jodnitrotetrazoliová violet + fenaziniummethosulfát (fotometrie)
  - ▶ fenaziniummethosulfát + resazurin (fluorimetrie)
  - ▶ resazurin +  $\text{NADH}_2$  (UV-test, pokles absorbance při 340 nm)



2. *Optický test (přímo se proměřuje redukce  $\text{NADP} \Rightarrow$  sledování nárůstu absorbance při 340 nm - viz rovnici výš)*

**Poznámka:** *Optický test je analyticky správnější postup. V tomto provedení se jedná o referenční (analytickou) metodu.*

Jsou popsány i metody s *glukózadehydrogenázou* (EC 1.1.1.47), která má jako koenzym systém  $\text{NAD(P)/NAD(P)H}_2$ , takže využití optického testu je zřejmé. Tento enzym se využívá i u glukometrů, kde je ovšem indikace amperometrická. Systematický název enzymu je *beta-D-glukóza: $\text{NAD(P)}^+$ 1-oxidoreduktáza*. Tento enzym redukuje pouze  $\beta$ -formu glukózy, výsledkem dehydrogenace glukózy je D-glukono-1,5-lakton a redukovaný koenzym. Průběh reakce je tedy velmi podobný reakci s glukózaoxidázou (EC 1.1.3.4), ale zjištění výsledku zase reakci s hexokinázou.

### Klinické poznámky

Organismus může být neschopen využít (utilizovat) glukózu, což vede ke stavu obdobnému hladovění. Dochází ke ztrátě tukové tkáně a vzrůstu koncentrace meziproduktů a metabolitů tvořících se při tukovém a proteinovém metabolismu, tj. dojde k nárůstu

- *ketolátek a mastných kyselin* – ze štěpení tuků
- *aminokyselin a peptidů* – ze štěpení proteinů
- *močoviny* – z aminokyselin a peptidů.

Tento stav může nastat

- dlouhodobě při onemocnění *diabetes mellitus*. O této chorobě viz podrobně v kreditním kurzu Hormony II, v části věnované *inzulínu*
- krátkodobě při pourazovém šoku.

**Galaktosemie** je autosomálně recesivní metabolická porucha metabolismu galaktózy, způsobená mutací v genu kódujícím *galaktóza-1-fosfát uridylyltransferázu*. Projevuje se již u novorozenců, protože mateřské mléko obsahuje značné množství galaktózy. Postiženého jedince provází nevolnost, zvracení, zvětšení jater (hepatomegalie), žloutenka (ikterus), později může dojít až k otoku mozku a smrti.

**Léčba:** Vyloučení galaktózy z diety.

**Poruchy ze střádání glykogenu, glykogenózy.** Existuje několik typů (I – VIII), průvodním znakem je hromadění, střádání glykogenu v buňkách různých orgánů (jater, ledvin), případně v různých organelách buňky, např. u dále zmíněné Pompeho choroby je to střádání glykogenu v lyzosomech.

*Glykogenóza typ II (Pompeho choroba)*, lyzosomální porucha metabolismu glykogenu, autosomálně recesivní dědičné onemocnění s poruchou v genu kódujícím *alfa-1,4-glukosidázu*. Klinické projevy jsou různé, existuje několik stupňů závažnosti této choroby. Dochází k svalové hypotonii i k poškození svaloviny srdeční (kardiomyopatie).

**Léčba:** Dodání chybějícího enzymu.

**Nesnášenlivost mléka, intolerance laktózy**, nutno odlišit od *alergie na mléčnou bílkovinu*. Příčin intolerance laktózy je několik: vrozený deficit, sekundárně snížená aktivita, primárně snížená aktivita laktázy, přesněji *β-galaktosidázy*, EC 3.2.1.23), enzymu, který rozkládá mléčný cukr (laktózu) ve střevech. Důsledky nejsou ani tak nebezpečné, jako nepříjemné: protože laktóza nemůže být (dostatečně) štěpena na glukózu a galaktózu, zvyšuje nerozštěpená laktóza osmotický tlak, což organismus vyrovnává zvýšeným obsahem vody ve střevním obsahu, urychluje se průchod tenkým střevem, což dále zhoršuje vstřebávání laktózy. Pokud se dostane do tlustého střeva, je zde laktóza zkvašována za anaerobních podmínek střevními bakteriemi na vodík, metan, oxid uhličitý (plynatost) a krátké mastné kyseliny (na které mohou být někteří jedinci citliví). Osmotická nerovnováha může vyústit v průjem.

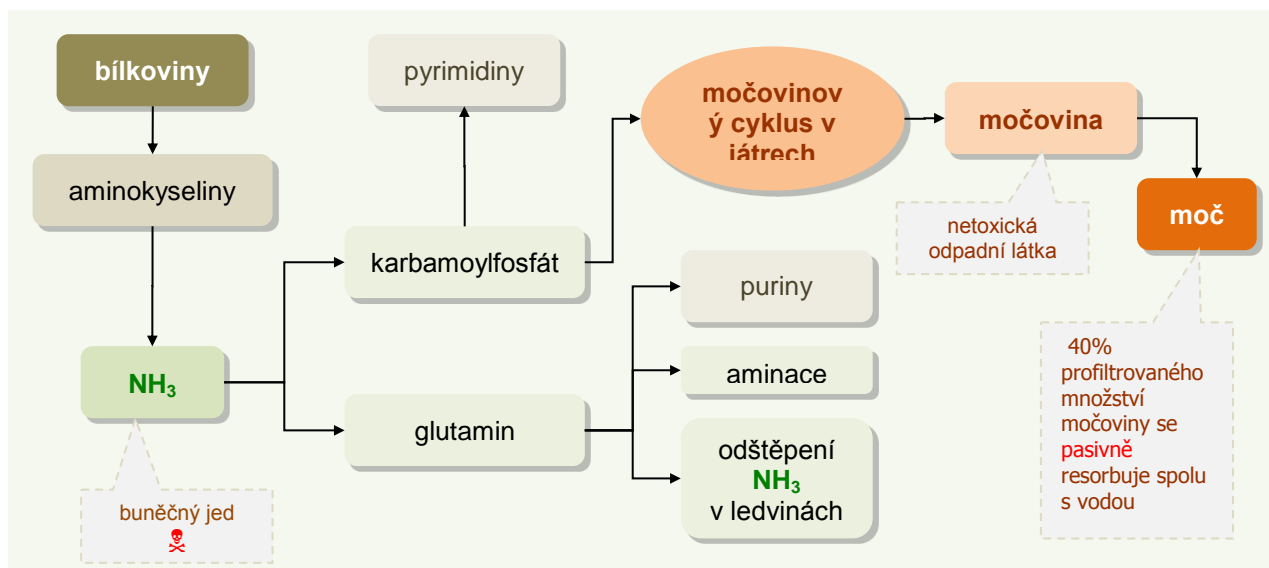
**Léčba:** Úprava diety s vyřazením mléčných výrobků, případně se zařazením výrobků neobsahujících laktózu, užívání potravinových doplňků s obsahem laktázy.

## DUSÍKATÉ LÁTKY NEBÍLKOVINNÉ POVAHY

Kromě plazmatických bílkovin, což jsou dusíkaté látky v plazmě převažující, vyskytují se zde i dusíkaté látky *nebílkovinné povahy*. Mnohé z nich mají diagnostický význam. Některé jsou odpadní látky, jiné vykazují biologickou aktivitu. Mezi hlavní dusíkaté látky nebílkovinné povahy patří *močovina*, *kreatinin*, *kyselina močová*. Dále to jsou karnitin, glutation, oxid dusnatý a nebílkovinné dusíkaté látky s hormonálním účinkem.

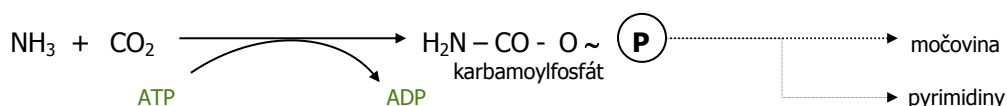
## Močovina

Močovina (urea) je diamid kyseliny uhličité:  $\text{NH}_2\text{--CO--NH}_2$ . Vzniká v játrech v cyklu močoviny (tzv. *malý Krebsův cyklus* nebo též *ornitinový cyklus*). Je to konečný produkt metabolismu dusíku z bílkovin (u savců, obojživelníků a některých ryb; u ptáků a plazů se tvoří kyselina močová). Dusík močoviny představuje hlavní složku tzv. *nebílkovinného dusíku*.



### Osud amoniaku

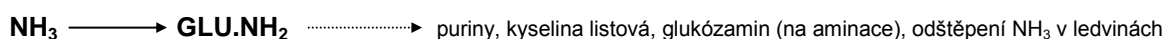
1. Amoniak je **buněčný jed**, proto musí být přeměněn na látku netoxickou. Z  $\text{NH}_3$  se může tvořit karbamoylfosfát, ten vstupuje do močovinového cyklu za tvorby močoviny; druhá metabolická cesta vede od karbamoylfosfátu k pyrimidinům



Sumární reakce pro tvorbu močoviny:



2. Glutamin, který buď odštěpuje  $\text{NH}_3$  v ledvinách, nebo se použije k syntéze purinů (nukleové kyseliny, vitamíny), případně k aminaci (glukózamin)



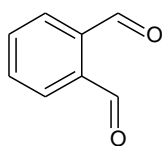
### Metody stanovení močoviny

#### Neenzymové metody

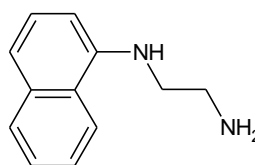
- s diacetylmonoximem (DAM)
- s o-ftaldialdehydem

**Diacetylmonoxim** [ $\text{CH}_3\text{-CO-CNOH-CH}_3$ ] dává s močovinou za přítomnosti thiosemikarbazidu [ $\text{NH}_2\text{-CS-NHNH}_2$ ] v silně kyselém prostředí (kyselina sírová) za zvýšené teploty a v přítomnosti  $\text{Fe}^{3+}$  **ružové zbarvení**; zbarvení je stálé asi 15 minut, vhodné k fotometrii při 525 nm (490 – 540 nm)

**o-Ftaldialdehyd** (orto-ftaldialdehyd) reaguje s močovinou v kyselém prostředí za tvorby meziproductu (N-karbam(o)yl-1,3-dihydroxyisoindolin), který dává s N-(1-naftyl)ethylendiaminem **červeně zbarvený** produkt; sleduje se nárůst absorpance v závislosti na čase při 510 – 530 nm [kinetické měření]



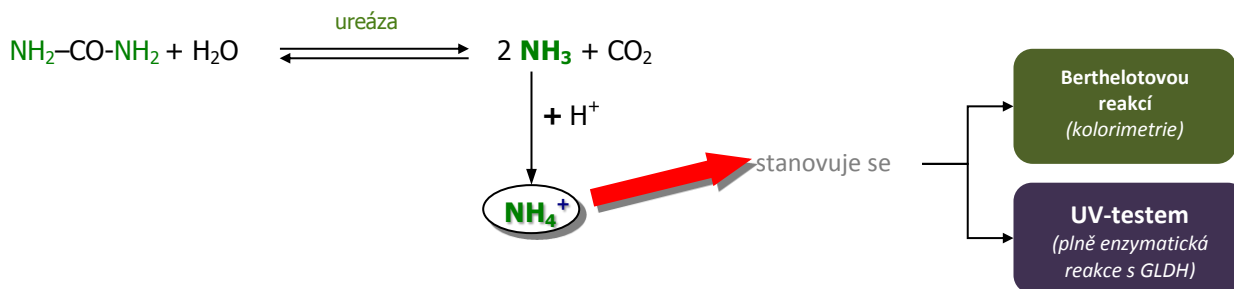
o-ftaldialdehyd



N-(1-naftyl)ethylendiamin

## Enzymové metody

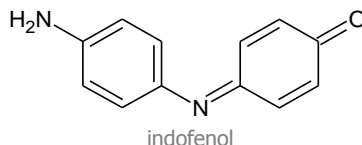
Enzymové metody využívají enzym **ureázu**, který z močoviny odštěpuje **amoniak**, který se stanovuje:



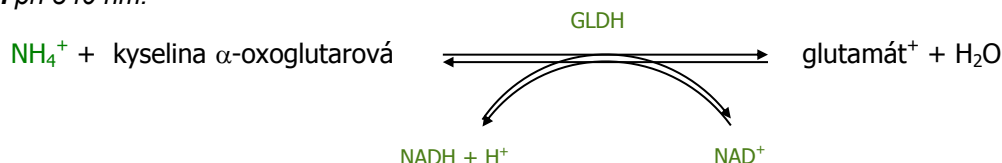
Vzniklý amonný ion se stanovuje

- **Berthelotovou reakcí:** se salicylanem sodným, chlornanem sodným [NaOCl] a nitroprussidem sodným [Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>(NO)].2 H<sub>2</sub>O] (katalyzátor reakce) vzniká **zelené** zbarvení, fotometrovatelné při 540 – 560 nm (při optimální vlnové délce 630 nm je reakce příliš citlivá).

**Diagnostická souprava PLIVA-Lachema Diagnostika:** BLT Močovina 200 (UREA 200) – modifikovaná (upravená) Berthelotova reakce – místo salicylanu sodného se používá 3-metyl-6-isopropylfenol; produktem reakce je indofenol; maximum absorpance je při 705 nm, fotometruje se při 580 – 650 nm



- **UV-testem při 340 nm:**



GLDH = glutamátdehydrogenáza

**Poznámka I:** UV-test je analyticky správnější než reakce uvedená ad a.

**Poznámka II:** Ve výše uvedené rovnici je třeba si představit glutamát za daných podmínek jako kation [HO<sub>2</sub>C-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CHNH<sub>3</sub><sup>+</sup>-CO<sub>2</sub>H]

## Klinické poznámky

**Referenční rozmezí** se uvádí

v plazmě: 2,5 – 8,3 mmol/l

v moči: 320 – 570 mmol/24 hodin

**Hladina v plasmě závisí na**

- exkrečních vlastnostech ledvin pro močovinu (glomerulární filtrace + tubulární resorpce)
- proteinovém metabolismu, tj. na přívodu bílkovin do organismu a na jejich katabolismu (100 g proteinů může vést k produkci až 35 g /5,8 molů močoviny)

**Hladina v moči závisí na**

- urémii (hladině v plazmě, séru)
- exkrečních vlastnostech ledvin (narušené či nenarušené schopnosti filtrace + resorpce)
- průtoku krve ledvinou (záleží zejména na hodnotě krevního tlaku)

Koncentrace močoviny v plazmě/séru se sice využívá také jako ukazatel renální funkce, potíží je ale v tom, že ne zcela spolehlivě funkci ledvin odráží. Ledviny mají totiž velkou rezervní kapacitu k udržení stabilní hladiny močoviny v krvi.

↑ **Nárůst koncentrace močoviny v plazmě může mít různé příčiny:**

- Nadměrná tvorba močoviny
- Porucha jejího vylučování ledvinami
- Kombinace ad A. a ad B.

**A. Zvýšená tvorba močoviny**

- nadměrný příjem bílkovin v potravě
- zvýšený katabolismus (sepsa, horečka, popáleniny)
- podávání steroidních hormonů nebo jejich zvýšená tvorba (syntéza)
- masivní krvácení do GIT
- intenzivní trénink (zvýšení koncentrace na 12 – 15 mmol/l)

**B. Porucha ve vylučování močoviny**

- tzv. funkční selhání ledvin (hypoperfúze kůry ledvin při šoku, srdečním selháním, větší dehydrataci...)
- selhání ledvin při různých chorobách (nefritidy aj.), působením léků apod.
- překážka v odtoku moče (obstrukční uropatie)
- jaterní selhání a jeho komplikace (hepatorenální syndrom)
- poškození ledvin při masivní hemolýze (hemolyticko-uremický syndrom)

**Poznámka:** Při oběhové poruše dojde ke snížení průtoku krve ledvinami, tím dojde ke snížení filtrace a ke zvýšení koncentrace močoviny v plazmě. Koncentrace v plazmě nepřesáhne 17 mmol/l.

**↓ Pokles koncentrace močoviny – možné příčiny:**

- Porucha tvorby močoviny
- Zvýšené ztráty moči

**A. Snížení tvorby močoviny**

- snížení příjmu bílkovin v potravě
- konečné stadium při onemocnění jater (jediný orgán tvorby močoviny)
- anabolické stavy (fyziologicky u dětí)

**B. Ztráty močoviny**

- fyziologicky v těhotenství (zvýšená filtrace v glomerulech + výstavba čili syntéza bílkovin plodu)

**Dusíková bilance pacienta**

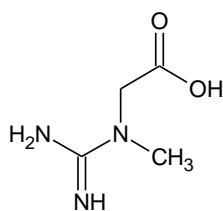
Ztráty dusíku močí za 24 hodin jsou důležitým ukazatelem míry *katabolismu* (zátěže). Dusík močoviny představuje asi 80% celkového dusíku ztraceného močí. Z hodnoty močoviny ve sbírané moči lze vypočítat tzv. *dusíkovou bilanci pacienta*, tj. *rozdíl mezi příjmem a výdejem dusíku*:

$$\text{dusíková bilance} = \text{příjem N} / 24 \text{ h} - (\text{ztráty N v moči} + \text{neměřitelné ztráty})$$

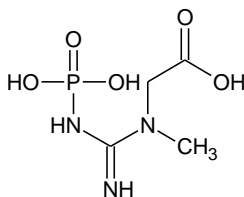
Dusíková bilance se počítá v gramech dusíku za časové období. Využívá se zejména u pacientů v těžkých stavech, kdy je třeba monitorovat příjem a výdej dusíku. V těchto stavech může být odpad dusíku i několik gramů za den (např. u popálenin) a výdej je pak nutno adekvátně hradit. Tělo v těžkém stavu odbourává bílkoviny a odpad dusíku je mírou katabolismu bílkovin. Ztráty dusíku močí, které jsou mírou katabolismu bílkovin, jsou tak zejména v těžkých stavech důležitým biochemickým ukazatelem.

**Kreatin a kreatinin**

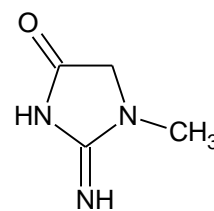
Vznik kreatinu a jeho cyklického amidu kreatininu je naznačen ve zkrácené metabolické cestě na následující straně. Kreatinin vzniká ve svalové tkáni neenzymovým odštěpením anorganického fosfátu. Vylučuje se ledvinami, při fyziologických hladinách prakticky pouze glomerulární filtrací. Při hodnotách kreatininémie cca 200  $\mu\text{mol/l}$  a výš se vylučuje kreatinin i tubulární sekrecí.



kreatin  
svaly, mozek, krev,  
stopy v moči



kreatinfosfát



kreatinin  
(anhydrid kreatinu)  
(resp. cyklický amid kreatinu)  
krev, moč, všechny tělní sekrety,  
sliny, žluč, pot, likvor



## Metody stanovení kreatininu

- Jaffého reakce** (reakce kreatininu s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí)  
Existuje ve dvou provedeních, jako
  - metoda konstantního času (s deproteinací biologického vzorku)
  - kinetické stanovení (bez deproteinace).
- Stanovení s kyselinou 3,5-dinitrobenzoovou**
- Stanovení s 1,4-naftochinon-2-sulfonanem**
- S o-nitrobenzaldehydem a následnou Sakaguchiho reakcí s  $\alpha$ -naftolem a tyminem** (metoda se nehodí pro stanovení v moči)
- Enzymové metody**
  - **ISE**
    - potenciometrické stanovení amoniaku po jeho odštěpení kreatininiminohydrolázou ( $\text{kreatinin} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{N-methylhydantoin} + \text{NH}_3$ )
    - amperometrické stanovení peroxidu vodíku (viz str. 7-2), popis reakce viz dále *Barevný test*
  - **UV-test při 340 nm**: kreatininamid hydroláza umožní působení kreatininázy a přeměnu kreatininu na kreatin. Ten je následně kreatinkinázou fosforylován (s využitím ATP) na kreatinfosfát. V reakční směsi přítomný fosfoenolpyruvát se přispěním pyruvátkinázy změní na pyruvát a v předchozí reakci uvolněný ADP se regeneruje na ATP. Pyruvát se v další reakci katalyzované laktát dehydrogenázou hydrogenuje na kyselinu mléčnou, přitom přechází NADH na NAD. Sleduje se pokles absorbance při 340 nm (viz schéma na str. 7-11).
  - **Barevný test**: kreatinin hydrolyzuje za přispění kreatininázy na kreatin, ten dále hydrolyzuje za přispění kreatinázy na sarkozin a močovinu, sarkozin se oxiduje pomocí sarkozinoxidázy na glycin, formaldehyd a peroxid vodíku; peroxid vodíku, 4-aminoantipyrin a TOOS [N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidin] reagují za odštěpení vody na červené chinonové barvivo (viz schéma na str. 7-10)
 

*Poznámka: enzymové metody jsou již delší dobu doporučeny pro pracoviště s pacienty v transplantačních programech a na hemodialýze. V současnosti je enzymová metoda doporučena ČSKB k všeobecnému používání jako standardizovaná metoda s návazností na primární standard, která nemá nedostatky Jaffého reakce, a kterou by měla postupně nahradit.*
- Iontová diluce** ve spojení s plynovou nebo kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií (referenční metoda)

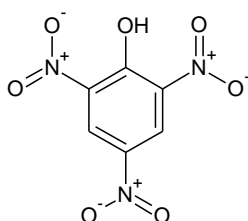
### Reakce Jaffé

Max Jaffé (1841 – 1911), německý biochemik, profesor farmakologie, popsal reakci kreatininu s alkalickým pikrátem za tvorby červenooranžového zbarvení již v roce 1886 (!). Pro stanovení kreatininu v séru ji poprvé použil Folin v roce 1904. Od té doby prošla tato reakce mnoha úpravami a obměnami s cílem vylepšit její specifitu.

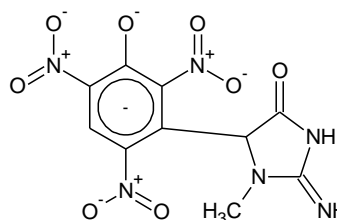
*Poznámka: Ačkoliv jméno Jaffé má zřejmě francouzský původ, jedná se o německého badatele a výslovnost je shodná s psanou podobou, tedy jaffe (nikoliv žafe, džafe apod., jakkoliv se to v této podobě u nás hojně používá).*

Jedná se tedy o reakci *kreatininu s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí*. Reakce je jednoduchá, ale nespecifická, doposud je to však nejrozšířenější reakce, která je postupně nahrazována specifitější reakcí enzymatickou (širšímu a rychlejšímu rozšíření enzymové metody brání zejména ekonomické důvody).

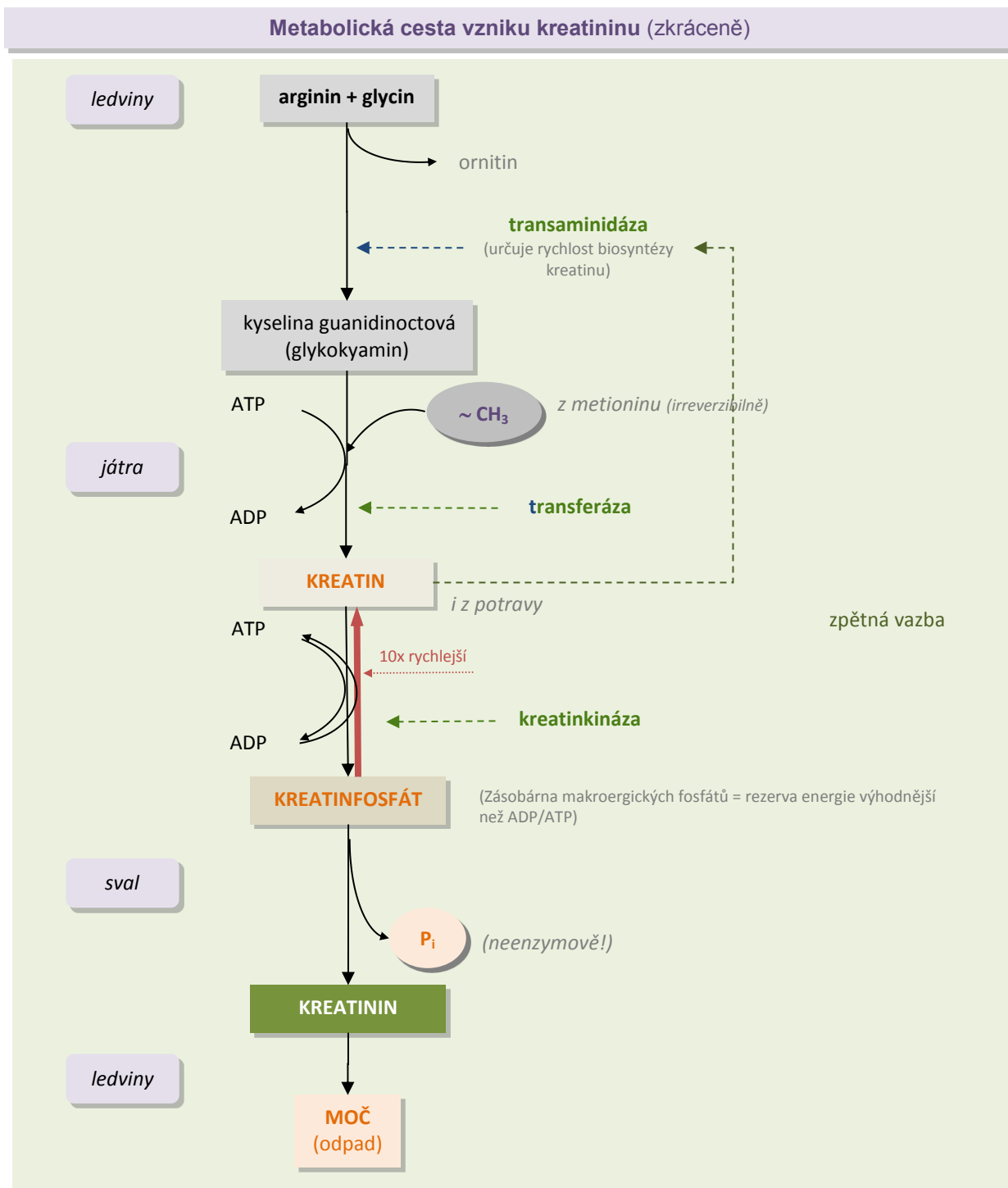
Výsledkem Jaffého reakce je nestálý adukt červenooranžové barvy, v kyselém prostředí se rozpadající



Kyselina pikrová  
(2,4,6-trinitrofenol)



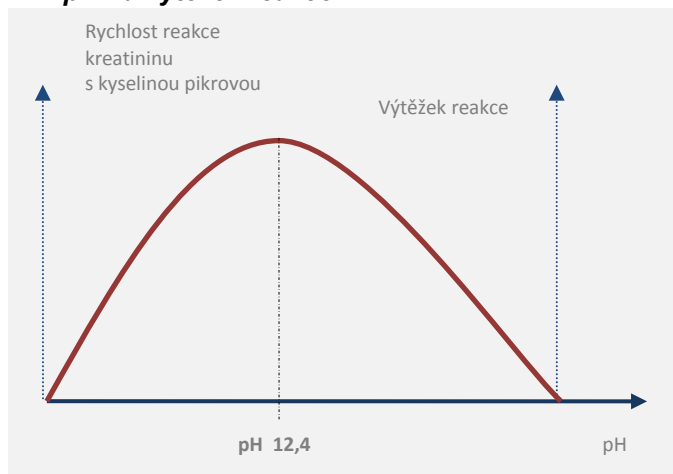
Komplex pikrát-kreatinin  
(okyselením se rozpadá)



Kromě kreatininu reagují při Jaffého reakci ve vedlejších reakcích i jiné látky (tzv. chromogeny, což jsou v daném případě zejména bílkoviny, glukóza, kyselina askorbová, guanidin, aceton, cefalosporiny (kefalosporiny) a  $\alpha$ -oxokyseliny, jako jsou kyselina acetoctová a pyrohroznová), které snižují specifitu metody pro stanovení kreatininu, tj. vedou k falešně vyšším výsledným hodnotám (v plazmě se podle metody jedná o navýšení cca 18 – 35  $\mu\text{mol/l}$ ), kromě bilirubinu, který výtěžnost reakce snižuje (u kinetického stanovení, viz dále).

**Relativní rychlosti reakce** jsou následující:

1. chromogeny velmi rychle reagující (nejvíce pyrohrozná)
2. kreatinin (v alkalickém prostředí!)
3. chromogeny pomalu reagující

**Vliv pH na výtěžek reakce**

Vzrůstu rychlosti reakce kreatininu s kyselinou pikrovou konkuruje vzrůst rychlosti reakce s  $\text{OH}^-$  ionty, výtěžek je tedy nižší (z obrázku je patrné, že optimálním pH je pH 12,4)

**Vliv rušivých látek je omezen**

- správnou volbou optimálních podmínek (tj. čas, pH, teplota)
- použitím čerstvých, správně uchovávaných reagensů (zejména NaOH)
- úpravou (modifikací) reakce (např. okyselením se eliminuje vliv pomalu reagujících chromogenů)

**Diagnostická souprava PLIVA-Lachema Diagnostika:**

**Reakční podmínky pro BLT test CREAT 100 (určen pro manuální stanovení)**

Reakční doba: 15 – 20 minut

pH: 12,3 – 12,5 (nejkritičtější faktor)

Teplota:  $25 \pm 1,5$  °C (kritické je ovlivnění pH teplotou)

Vlnová délka: z pásma 490 – 520 nm (505 nm)

Spektrální šíře: 1 – 2 nm (méně jak 10)

Reakce  $\text{OH}^-$  iontů je kompenzována porovnávacím vzorkem (slepým pokusem), ostatní chromogeny volbou reakční doby.

**Poznámka:** V praktickém životě je potřeba dát pozor na to, aby hydroxid sodný byl vždy čerstvý a aby dávkovače dávaly správné množství jak hydroxidu, tak kyseliny pikrové (platí i pro provoz na automatických analyzátoch)

**Běžně se jako rušivé látky projevují především:**

- **Glukóza** – ovlivňuje již v koncentracích nad 6,1 mmol glukózy/l, hodnoty nad 15 mmol glukózy/l ovlivňují stanovení kreatininu takovým způsobem, že výsledky jsou nespolehlivé
- **Kyselina acetoctová** – pokud je v moči, je nutno ji odstranit povařením
- **Bilirubin** – při kinetickém stanovení (ne při stanovení s deproteinací, kdy je odstraněn) snižuje výsledky stanovení kreatininu; při koncentracích nad 100 mmol bilirubinu/l je nutno bilirubin ve vzorku potlačit (ferrikyanidem, jódem aj.)

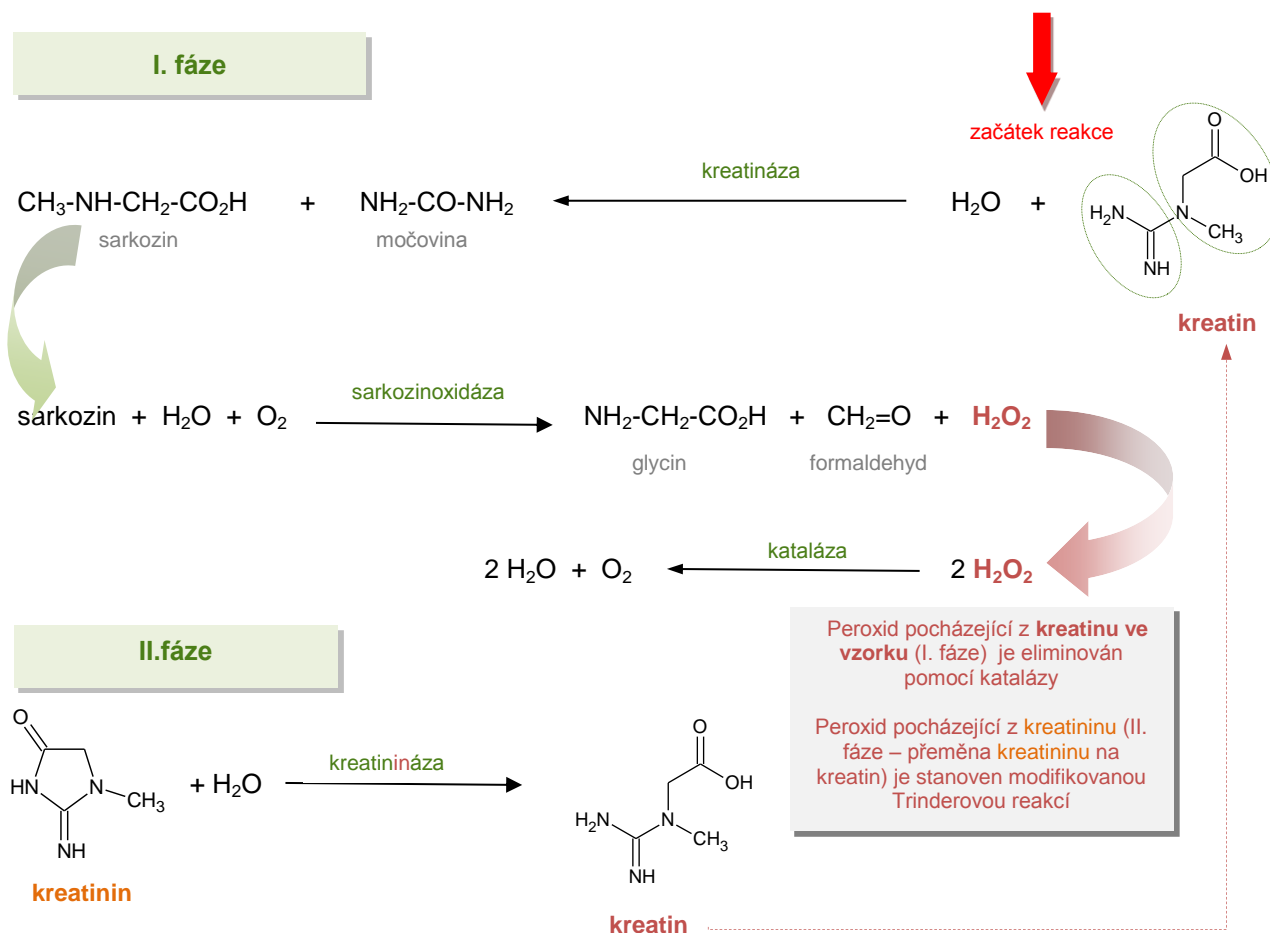
Reakce se používá jak pro stanovení v séru (plazmě), tak v moči (moč je nutno před analýzou ředit).

## Enzymové reakce

### Barevný test

V první reakci, kreatináza a sarkozin oxidáza hydrolyzují endogenní kreatin za vzniku peroxidu vodíku, který je eliminován katalázou. Po přidání kreatininázy a 4-aminoantipyridinu, pouze kreatin vytvořený z kreatininu účinkem kreatininázy je následně hydrolyzován kreatinázou a sarkozin oxidázou za vzniku peroxidu vodíku. Tento nově vzniklý peroxid vodíku reaguje s N-etyl-N-sulfopropyl-m-toluidinem (ESPMT) za katalýzy peroxidázy. Absorbance vzniklého komplexu při 546 nm je přímo úměrná koncentraci kreatininu ve vzorku. (*Souprava CREAT E L 204 Erba-Lachema Diagnostika, citace z příbalového letáku*).

**Poznámka 1:** Na obdobném principu pracují i soupravy jiných výrobců)



Po přidání kreatininázy, tj. od kreatininu, běží dále reakce podle schématu I. fáze (naznačeno šipkou); tvořící se peroxid vodíku tentokrát pochází výlučně z **kreatininu** a je stanoven modifikovanou *Trinderovou reakcí* (intenzita zbarvení barevného pigmentu je proporcionální původní koncentraci kreatininu ve vzorku):

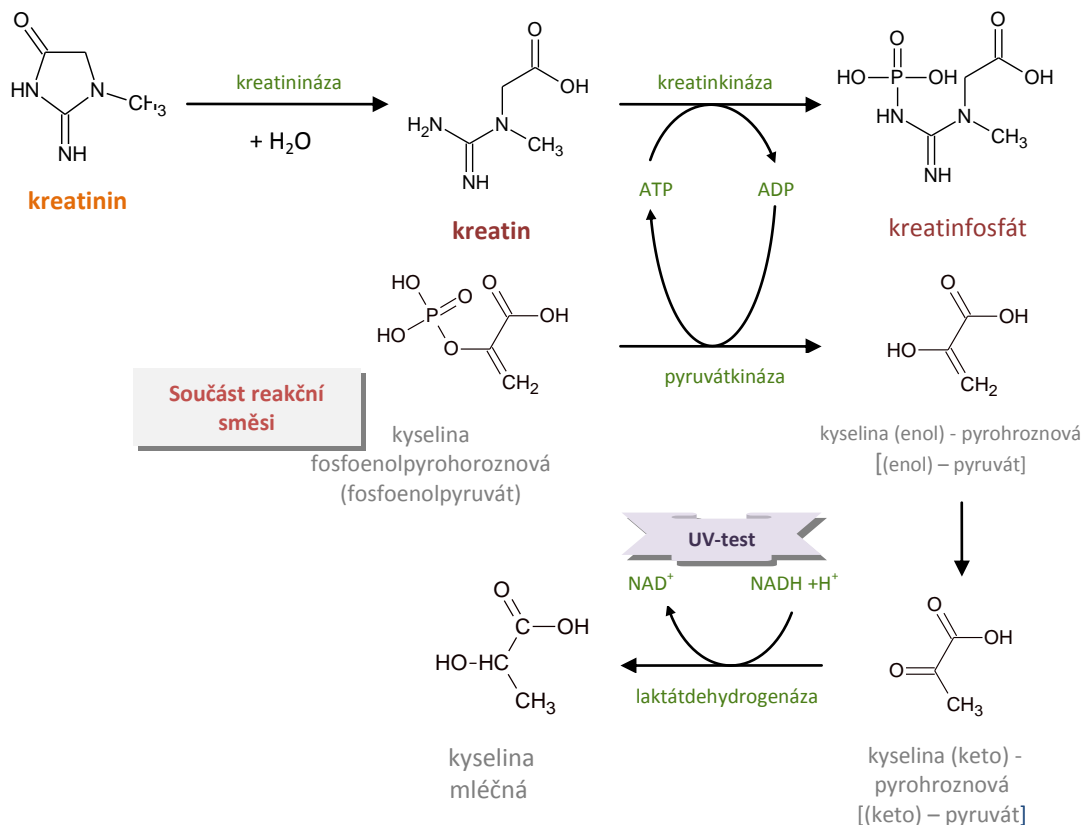


#### Poznámka k názvosloví některých enzymů

EC 3.5.2.10 Kreatinin amidohydroláza, též Kreatinin hydroláza nebo Kreatinináza; hydrolázy tohoto typu se také nazývají amidázy

EC 3.5.3.3 Kreatin amidinohydroláza, též Kreatináza

Přehledný seznam enzymů včetně užívaných názvosloví ve [Wikipedii](https://www.wikipedia.org)

**UV test****Klinické poznámky**

**Referenční meze** se liší podle pohlaví, věku a hmotnosti testované osoby. Pro stanovení *metodou Jaffé* platí přibližně:

**Krev:** muži do 124  $\mu\text{mol/l}$   
 ženy do 115  $\mu\text{mol/l}$   
 děti výrazně nižší hodnoty (malá svalová hmota)

**Moč:** do 18  $\text{mmol/24 hod}$

Množství vyloučené denně je úměrné svalové hmotě a je **individuální konstantou** člověka

**Odpad na kg hmotnosti:** **muži:** 0,097 - 0,177  $\text{mmol/kg/24 hod}$   
**ženy:** 0,124 - 0,230  $\text{mmol/kg/24 hod}$

Pro stanovení enzymovou metodou (BLT) platí hodnoty referenčních mezí:

**Krev:** muži 44 – 90  $\mu\text{mol/l}$   
 Ženy 44 – 87  $\mu\text{mol/l}$   
**Moč:** 5 – 18  $\text{mmol/d}$

**↑ Zvýšená koncentrace sérového kreatininu:**

Viz odstavec *Klinické poznámky* na str.7 a na následujících stranách, kde se diskutují příčiny zvýšené urémie (funkční i anatomické selhání ledvin, obstrukce v močových cestách atd.). Kreatininémie výrazně stoupá u chronického selhání ledvin (hodnoty u těžkého selhání jsou až nad 1000  $\mu\text{mol/l}$ ), u akutních stavů a u funkčního selhání ledvin je zvýšení kreatininémie mírnější. Indikovaný stav pro umělou ledvinu je pro pacienty s hodnotami kreatininu mezi 700 – 800  $\mu\text{mol/l}$ . Zvýšený příjem bílkovin a fyzická námaha ovlivňují hladinu kreatininu v krvi jen málo, proto je kreatinin *specifičtější* ukazatelem porušené funkce ledvin než močovina. Hladina kreatininu v séru však není citlivá na rané poškození ledvin a během léčby selhání ledvin reaguje na hemodialýzu pomaleji, než močovinový dusík v krvi (BUN). *Citlivým ukazatelem/markerem raného poškození ledvin je NGAL (viz konec kapitoly).*

**↓ Snížená koncentrace sérového kreatininu:**

Fyziologicky v dětském věku a u těhotných (zvýšená glomerulární filtrace – viz „Močovina“). U osob s malou svalovou hmotou, u nemocných s myodystrofií a u osob dlouhodobě upoutaných na lůžko.

**Stanovení v moči** se používá pro

- *odhad glomerulární filtrace* (viz *Clearance endogenního kreatininu*)
- *odhad úplnosti sběru moče*: odpad kreatininu vztahovaný na kg hmotnosti by se neměl snížit víc jak o 30% proti očekávané hodnotě
- *standardizaci odpadu látek močí*: koncentrace stanovené látky se přepočítává na 1 mmol kreatininu a tím se eliminuje vliv různé koncentrace moči

### Clearance endogenního kreatininu

**to clear** (angl.) = čistit, očistit, vyčistit, vyprázdnit, vyklidit, uvolnit

**clearance** (angl.) = vyklizení, vyprázdnění, vybírání (schránky) [vyslov: *klírens*]

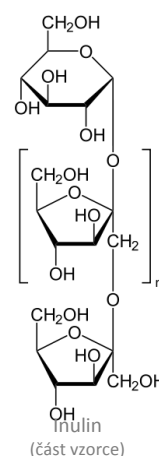
**endogenní** = vnitřní (tzn. vytvořený v organismu, organismu vlastní, nedodaný zvenku)

Každou sekundu se ve zdravé ledvině tvoří přibližně 2 ml primární moči. Snížení glomerulární filtrace vypovídá o snížené funkci ledviny. Jednou z cest, jak se (nepřímo) přesvědčit o filtrační schopnosti ledviny, je stanovení tzv. *clearance* (*indikátorové látky*). Pod pojmem *clearance* se rozumí

- **objem** krve nebo plazmy, obsahující stejné množství indikátorové látky, jaké se močí vyloučí za jednu sekundu
- **objem** krve nebo plazmy „očistěné“ zcela od takového množství (indikátorové) látky, které je v jednosekundovém vzorku moči.

Tento objem, se zjišťuje výpočtem z údajů *koncentrace podané* (či *endogenně vytvořené*) *indikátorové látky v séru/plazmě* a její *koncentrace v moči*, sbírané po určitou konkrétní dobu (obvykle 24 hodin).

Indikátorová látka by při průchodu ledvinou neměla být ledvinou (tj. tubuly) ani resorbována, ani vylučována (secernována), ale pouze filtrována. Tyto podmínky nejlépe splňuje *inulin* (polysacharid nahrazující u některých rostlin škrob). Proto se *inulinová clearance* považuje za „zlatý standard“ tohoto typu vyšetření. Nicméně i endogenně tvořený *kreatinin* vykazuje podobné vlastnosti jako inulin a vylučování kreatininu do moči je považováno za míru glomerulární filtrace. Vyšetření se nazývá *Clearance endogenního kreatininu*, nebo zkráceně *Kreatininová clearance*. Mírné vylučování kreatininu tubuly navyšuje hodnotu kreatininové clearance oproti aktuální GFR o 10 – 20%, což je přijatelné, avšak při kreatininémii > 200 μmol/l tubuly secernují kreatinin již významně a vyšetření nelze použít.



### Přehledné schéma clearance endogenního kreatininu

Anatomie	Nefron	Obecné pojmy	Příklad
<b>Glomerulus</b>		Filtrace plazmy  <b>C<sub>P</sub></b> (koncentrace kreatininu v plazmě)	<b>C<sub>P</sub></b> 72 μmol/l
		Primární moč  <b>C<sub>P</sub></b> (stejná koncentrace jako v plazmě)	<b>V<sub>P</sub></b> (objem plazmy očištěné glomerulární filtrací za 1 sekundu od kreatininu)  $V_P = K_I \cdot V_s = GF$  <b>V<sub>P</sub></b> $83 \cdot 0,0174 = 1,44 \text{ ml/s}$  Ref. hodnota: 1,7 – 2,0 ml/s
<b>Tubuly</b>		Tvorba definitivní moči (zakoncentrování) (zde především zahuštění)  <b>K<sub>I</sub></b> (koncentrační index)  $K_I = C_M / C_P$	<b>K<sub>I</sub></b> $5936 / 72 = 83$
<b>Ledvinová pánvička</b>		Definitivní moč  <b>C<sub>M</sub></b> (koncentrace kreatininu v definitivní moči)	<b>V<sub>24</sub></b> (objem moči za 24 hodin v ml) 1500 ml  <b>V<sub>s</sub></b> (objem moči za sekundu v ml) $1500 / 60 \cdot 60 \cdot 24 = 1500 / 86400 = 0,0174$  $V_s = V_{24} / 60 \cdot 60 \cdot 24$ $V_s = V_{24} / 86400$  <b>C<sub>M</sub></b> 5936 μmol/l

Legenda k tabulce:

$V_p$  = objem plazmy očištěné glomerulární filtrací za 1 sekundu od kreatininu

$V_{24}$  = objem moči sbírané 24 hodin

$V_s$  = objem moči vyloučené za 1 sekundu (tj.  $V_{24} / 24 \text{ hod} \cdot 60 \text{ min} \cdot 60 \text{ s}$ )

$C_M$  = koncentrace kreatininu v definitivní moči

$C_P$  = koncentrace kreatininu v plazmě (= koncentrace kreatininu v primární moči)

KI = koncentrační index (tj.  $C_M / C_P$ )

GF = glomerulární filtrace =  $V_p$  = clearance (nedochází-li k tubulární resorpci či sekreci, je clearance rovna glomerulární filtraci GF)

**Poznámka:** Clearance je fiktivní pojem, protože se při jednom průtoku ledvinami plazma zcela nezbaví dané látky (výjimkou je aminohippurát).

Výpočtem pro **glomerulární filtraci GF** vychází:

$$GF \approx V_p = V_s \times KI = V_s \times \frac{C_M}{C_P} \quad (= \text{clearance}),$$

norma: [1,7 – 2,0 ml/s], čili jednosekundový objem od kreatininu očištěné plazmy je roven sekundovému objemu vyloučené moči krát zahuštění moči, tedy koncentrační index. Koncentrační index je roven koncentraci kreatininu v definitivní moči lomeno koncentrace kreatininu v primární moči, tj. v plazmě (až na bílkoviny má primární moč prakticky stejné složení jako plazma).

Filtrační plocha v ledvinách je přímo úměrná povrchu těla ( $S$  = povrch těla), proto daný výpočet odpovídá konkrétnímu povrchu těla  $S$ . Pro možnost srovnání výsledků různých velkých osob, tedy s různou velikostí povrchu těla, se výsledky vztahují na jednotkový povrch těla, který je  $1,73 \text{ m}^2$   
Povrch těla  $S$  se získá z údajů o výšce a váze testované osoby, a to odečtením z nomogramu nebo výpočtem.

Jeden z možných vzorců pro výpočet povrchu těla je

$$S = 0,0167 \sqrt{m \times h} \quad [m = \text{hmotnost v kg}, h = \text{výška v cm}]$$

Odpovídá-li tedy vypočtená GF povrchu těla  $S$ , pak tzv. *korigovaná glomerulární filtrace*  $GF_K$  odpovídá velikosti těla s povrchem  $1,73 \text{ m}^2$ :

$$\begin{array}{l} GF \dots\dots\dots S \\ GF_K \dots\dots\dots 1,73 \end{array}$$

a odtud

$$GF_K = \frac{GF}{S} \times 1,73$$

$$\text{norma: } [1,28 - 2,29 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1} \cdot 1,73 \text{ m}^2] \quad [1,15 - 2,35 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1} \cdot 1,73 \text{ m}^2 - \text{podle Racka}]$$

Kreatininová clearance se většinou vyšetřuje jako *jednorázová*, tj. moč se sbírá jedno sběrné období, nejčastěji 24 hodin. Někdy se moč sbírá ve více intervalech, např. šestkrát po čtyřech hodinách, vypočítá se clearance pro každý interval zvlášť a z výsledků se potom vypočítá průměrná clearance (jako konečný výsledek). V tomto případě se jedná o tzv. clearanci *dělenou (frakcionovanou)*.

**Ideální clearance kreatininu  $GF_{ID}$**  je clearance vztažená na věk (s věkem clearance klesá – klesá glomerulární filtrace):

$$GF_{ID} = -0,00946 \times \text{věk} + 2,118 \quad [\text{věk je udán v rocích}]$$

**Resorpce  $R$**  je definována jako *vstřebaný objem*  $V_R$  připadající na glomerulární filtraci GF, čili *podíl*  $V_R/GF$ . Vstřebaný objem („zahuštění“) je definován

$$V_R = GF - V_s \quad (\text{glomerulární filtrace minus sekundový objem moči}).$$

$$R = \frac{V_R}{GF} = \frac{GF - V_s}{GF} = 1 - \frac{V_s}{GF} = 1 - \frac{C_P}{C_M} \quad \text{norma: } [0,986 - 0,998]$$

Kreatininová clearance je rutinním testem pro vyšetření filtrační funkce ledvin.

↓ **Snížení hodnoty GF:**

1. funkční poškození glomerulů
2. anatomické poškození glomerulů

Za normální se považuje hodnota v rozmezí  $GF_{ID} \pm 30\%$

Velmi snížená je hodnota kreatininové clearance pod  $25\%GF_{ID}$

**Příklad:** Pacientka, 76 roků, s diagnózou pyelonefritida měla při kreatininové clearanci tyto hodnoty: Sběr moči za 24 hodin = 1400 ml, hodnota kreatininu v séru = 98  $\mu\text{mol/l}$ , kreatinin v moči 6,63 mmol/l. Váha 90 kg, výška 155 cm. Vypočtěte hodnoty nekorigované GF a R, zhodnoťte výsledek

$$\begin{aligned} \text{GF} &= V_S \cdot (C_M / C_P) = (V_{24}/60 \cdot 60 \cdot 24) \cdot (C_M / C_P) = (1400/86400) \cdot (6630/98) = 0,016 \cdot 67,7 = \mathbf{1,08 \text{ [ml/s]}} \\ \text{S} &= 0,0167 \cdot \sqrt{m \cdot h} = 0,0167 \cdot \sqrt{90 \cdot 155} = 0,0167 \cdot \sqrt{139,5} = 0,0167 \cdot 118,1 = \mathbf{1,97 \text{ [m}^2\text{]}} \\ \text{GF}_K &= (\text{GF} \cdot 1,73) / \text{S} = (1,08 \cdot 1,73) / 1,97 = 1,87 / 1,97 = \mathbf{0,95 \text{ [ml/s]}} \\ \text{GF}_{ID} &= -0,00946 \cdot \text{věk} + 2,118 = -0,00946 \cdot 76 + 2,118 = -0,719 + 2,118 = \mathbf{1,40 \text{ [ml/s]}} \\ &(0,95/1,40) \cdot 100 = 68\% \text{ (tedy sníženo o 32\%)} \end{aligned}$$

**Komentář:** Třicetiprocentní rozmezí ideální GF = [0,98 – 1,82]. Naměřená hodnota GF je menší než –30% GF<sub>ID</sub>, je tedy snižena. Kdyby se nebral v úvahu věk pacientky (tedy ideální GF), je výsledek rovněž pod dolní hranici normy: 0,95 proti 1,28 resp. 1,15 ml/s. **R = 1 – (C<sub>P</sub> / C<sub>M</sub>) = 1 – (98/6630) = 1 – 0,0148 = 0,985.** Výsledek je těsně pod dolní hranicí normy.

### Odhad glomerulární filtrace z hodnot sérového kreatininu

Z hodnot sérového kreatininu [S-Kreat] lze odhadnout hodnotu glomerulární filtrace [eGF] pomocí výpočtových metod. Existuje rovnice podle *Cockrofta a Gaulta*, ta je však v současnosti již považována za obsolentní (neaktuální, zastaralá) a od roku 2009 v ČR nedoporučována k používání. Přednost se dává rovnici MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*), která má při použití standardizované metody stanovení sérového kreatininu (enzymově) tzv. zkrácený či čtyřparametrový tvar:

$$eGF = 547,1535 \times [S - \text{Kreat}]^{-1,154} \times \text{věk}^{-0,203} \times 0,742 \text{ (ženy)} \text{ [ml/s/1,73 m}^2\text{]}$$

Pro muže je poslední člen rovnice roven "1", pro černou populaci obsahuje rovnice ještě další korekční člen. Výsledek je vztažen na tzv. *ideální povrch těla*, tj. 1,73 m<sup>2</sup>. Absolutní hodnota odhadnuté glomerulární filtrace se získá vydělením výsledku hodnotou 1,73 a vynásobením skutečnou hodnotou povrchu těla (viz např. str. 7-13). Tato rovnice vznikla ze studie na pacientech s chronickou renální insuficiencí. Je tedy vhodná ke sledování funkce ledvin u pacientů s GF < 1,0 ml/s a k posuzování GF > 1.0 ml/s se nehodí. Nehodí se ani pro výpočet [eGF] u dětí a mladistvých do 18 let. Pro tuto věkovou kategorii se používá výpočet podle *Schwartz*:

$$eGF = F \times \frac{\text{výška}}{[S - \text{Kreat}]} \text{ [ml/s/1,73 m}^2\text{]}$$

V této rovnici **F** představuje faktor, který je tabelován a nabývá různých hodnot pro různá pohlaví a různé věkové skupiny.

Rovnicí obdobnou rovnici MDRD je rovnice *CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration)*, rovněž obsahuje čtyři proměnné, ale je postavena poněkud odlišně, měla by dávat poněkud lepší výsledky než rovnice MDRD.

V současnosti se v Evropě prosazuje rovnice *Lund-Malmö*, která má proti jmenovaným určité výhody, např. možnost použití pro jedince již od 1 roku věku až po dospělé. Detailnější popis [zde](#).

Kromě toho je navržena i tzv. *kvadratická rovnice Mayo Clinic (MCQ)*, ta se však v České republice nepoužívá.

Pro výpočtové metody se zásadně doporučuje použití hodnoty koncentrace kreatininu získané enzymovou metodou.

**Jiné možnosti odhadu glomerulární filtrace** poskytují nízkomolekulární proteiny a polypeptidy, které se při poklesu glomerulární filtrace hromadí v plazmě.

Jedná se např. o

- $\beta_2$ -mikroglobulin
- C-peptid
- Cystatin C aj.

Pro odhad glomerulární filtrace je zvl. vhodný zejména **cystatin C**, protože na rozdíl od ostatních jmenovaných je to látka nezávislá (tzn. její produkce a tím i její koncentrace v plazmě/séru) na přítomnosti zánětu, některých nádorů apod. Cystatin C je produkován všemi jadernými buňkami v těle. Patří mezi inhibitory *cysteinových proteáz*, je tvořen dvěma polypeptidovými řetězci, molekula má kladný náboj, relativní molekulová hmotnost je 13 343. Stanovuje se *imunochemicky* a na trhu jsou momentálně soupravy pracující dvěma způsoby: tzv. *PENIA (Particle Enhanced Nephelometric Immuno Assay)* a *PETIA (Particle Enhanced Turbidimetric Immuno Assay)*.

Od určité hodnoty koncentrace Cystatinu C v plazmě vykazují metody poněkud rozdílné výsledky, proto existují i dvě rovnice pro výpočet odhadu glomerulární filtrace – *Leveyova (PENIA)* a *Grubbova (PETIA)*.

$$\text{Levey: } eGF = 1,278 \cdot [\text{CysC}]^{1,19}$$

$$\text{Grubb: } eGF = 1,412 \cdot [\text{CysC}]^{1,68} \text{ (tato rovnice je použitelná do koncentrace 2,5 mg CysC/l)}$$

[CysC] = koncentrace cystatinu C v krevním séru v mg/l.



Pro vzájemnou srovnatelnost je vyžadováno použití certifikovaného referenčního materiálu. V současné době je k dispozici certifikovaný referenční materiál pro cystatin C *ERM DA-471/IFCC*, jehož certifikované hodnoty byly určeny metodami RID, PETIA a PENIA a jsou nabízeny soupravy s návazností na tento materiál).

*Cystatin C je lepším ukazatelem funkce glomerulů než clearance endogenního kreatininu! Je třeba zvážit i výhodu stanovení v plazmě před sběrem moči!*

**Poznámka:** Z hlediska rané detekce akutního ledvinového selhání (AKI) se jako velmi nadějný jeví nový marker z rodiny lipokalinů, *neutrofilní lipokalin asociovaný s gelatinasou (NGAL)*, jehož hladina v moči i v plazmě se oproti hladině S-kreatininu v případě hrozícího AKI zvyšuje podstatně rychleji, řádově v hodinách. Lipokaliny jsou malé sekreční proteiny účastnící se převážně transmembránových přenosů lipofilních substancí.

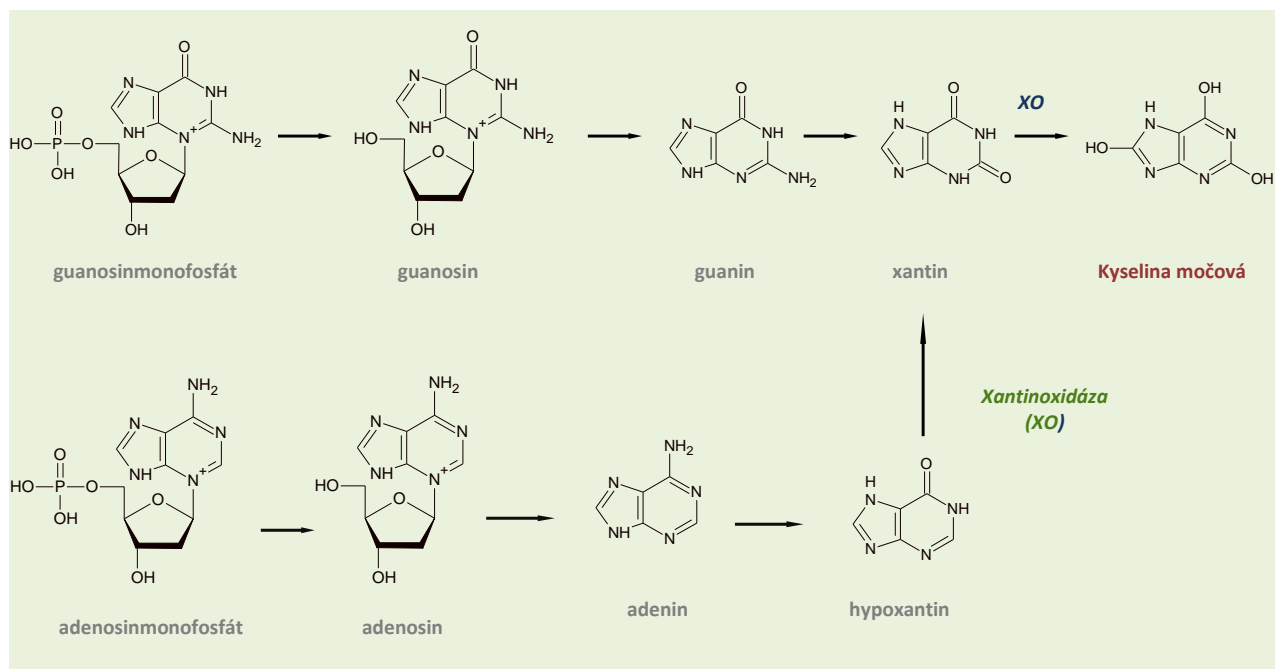
Základní zkušenosti s NGAL v klinické praxi však teprve musí přijít. (Srovnej též kreditní kurz *Biomarkery*).

Stručně k dané problematice viz. např. [zde](#).

## Kyselina močová

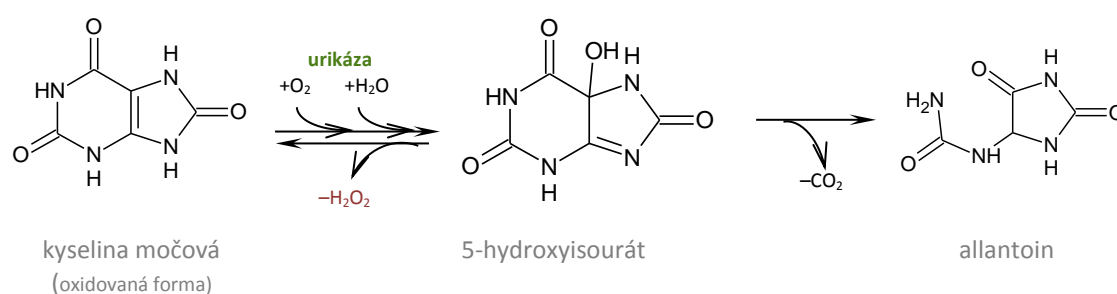
Kyselina močová (1,3,8-trioxapurin) – u člověka a primátů konečný produkt metabolismu *purinových* látek (adenin, guanin). Adenin a guanin jsou součástí především nukleových kyselin, ale i některých koenzymů (ATP, NAD(P) aj.). Kyselina močová vzniká jak z purinových látek těla vlastních, tak z purinových látek přivedených do organismu potravou (!).

### Tvorba kyseliny močové

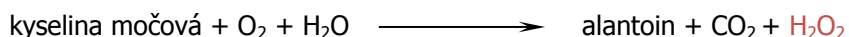


**Obecně:** nukleové kyseliny → nukleotidy → nukleosidy → volné báze → **kyselina močová**

Ostatní savci přeměňují kyselinu močovou dále na allantoin.



Sumárně zapsaná rovnice tvorby allantoinu:



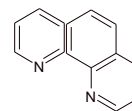
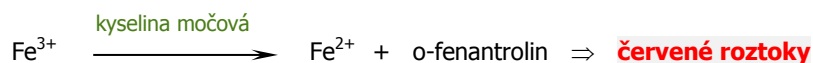
Kyselina močová není pouze odpadní látkou, je významným **antioxidantem** a chrání organismus před účinky *volných radikálů*. Přeměna na allantoin probíhá i u člověka (oxidací kyseliny močové působením volných radikálů), malé množství allantoinu se dá prokázat v krvi člověka a *toto množství je ukazatelem zátěže organismu volnými radikály*.

Asi 90% kyseliny močové profiltrované glomeruly se resorbuje v proximálním tubulu. V distálním tubulu dochází jednak k sekreci kyseliny močové, jednak k její absorpci. Pochody v distálním tubulu mohou být ovlivněny řadou aniontů a léků. Zbývající (neresorbovaný) podíl kyseliny močové se vylučuje močí. Kyselina močová je špatně rozpustná ve vodě. Tak mohou vznikat krystaly v okolí kloubů (dna) a „kameny

## Metody stanovení

**Redoxní metody** (v současnosti se nedoporučují)

- Redukce solí kyseliny fosfowolframové v alkalickém prostředí – vznikají modré roztoky vhodné k fotometrii
- Redukce železitých solí kyselinou močovou a reakce s o-fenantrolinem



o-fenantrolin

**Příklad přípravy činidla kyseliny fosfowolframové v laboratoři:** 40 g wolframanu sodného p.a. nebo 44,9 g  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  rozpustit v asi 300 ml destilované vody. Přidat 32 ml 85% kyseliny o-fosforečné a mírně vařit pod zpětným chladičem po dobu 4 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu přidat 300 ml destilované vody, 32 g  $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  p.a. a doplnit destilovanou vodou na 1000 ml. Připravit 3 mol/l NaOH (12 g NaOH do 100 ml destilované vody) a upravit jím pH fosfowolframového činidla na hodnotu  $\text{pH} = 2,5 \pm 0,1$  (spotřeba asi 76 ml). Roztok činidla má být čirý a slabě žlutozelený. Uchovávat v lednici.

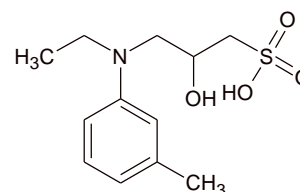
Tato ukázka návodu na přípravu činidla má pouze demonstrovat ještě nedávné poměry v laboratorní praxi. Příprava reagentů v laboratoři v současné době se nedoporučuje!

## Enzymové metody

Použitý enzym – *urikáza* – katalyzuje oxidaci kyseliny močové kyslíkem na **peroxid vodíku** a allantoin (viz rovnici na str. 7-14).

### Stanovení peroxidu vodíku

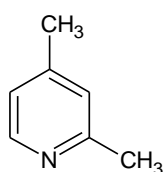
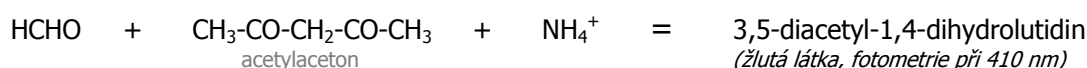
- S využitím *Trinderovy reakce* - toto uspořádání měl např. **set BLT: OXOCHROM KYSELINA MOČOVÁ (UA 105 E)**



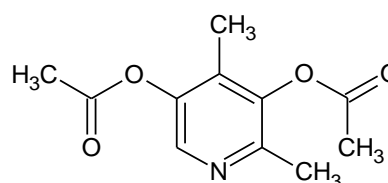
N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfo-propyl)-m-toluidin

**Diagnostický set PLIVA-Lachema Diagnostika: KYSELINA MOČOVÁ AOD 100** používá místo 4-chlor-3-methylfenolu tzv. TOOS, tj. sodnou sůl N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfo-propyl)-m-toluidinu. Vzniklý peroxid vodíku se tedy stanovuje oxidační kopulací se 4-aminoantipyrinem a s TOOS (za katalýzy peroxidázou). Fotometrie při 505 nm.

- Nepřímé stanovení peroxidu vodíku**



lutidin (2,4-dimethylpyridin)



3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidin

**Poznámka:** Metody s katalázou se v současnosti nedoporučují.

## Klinické poznámky

**Referenční rozmezí** se mírně liší podle použité metody, obecné hodnoty uvádí např. *Racek*

pro muže 200 – 420  $\mu\text{mol/l}$ ,

pro ženy 140 – 340  $\mu\text{mol/l}$ .

### ↑ Hyperurikémie:

Vyšší koncentraci kyseliny močové v krvi mají muži (vzhledem k ženám), obézní osoby, dříve to byli také lidé z „vyšších společenských vrstev“ (souvislost se způsobem stravování).

Obecný princip hyperurikémie – zvýšená tvorba a snížené vylučování kyseliny močové. Velmi často bývají příčinou hyperurikémie oba mechanismy současně

#### a. Zvýšená produkce kyseliny močové

- zvýšený příjem purinů v dietě (maso, zvěřina, vnitřnosti)
- zvýšená syntéza purinů díky zvýšené aktivitě příslušného enzymu
- zvýšená degradace nukleových kyselin při zániku velkého množství buněk (po ozáření, po léčbě cytostatiky aj. chorobné stavy)
- zvýšené odbourávání ATP (např. po zátěži)
- u některých dědičných onemocnění postihujících enzymový aparát metabolismu adeninu a guaninu

#### b. Snížené vylučování kyseliny močové

- stavy se sníženou glomerulární filtrací
- soutěž některých aniontů s kyselinou močovou o aktivní sekreci v distálním tubulu (takto působí např. laktát, thiazidová diuretika aj.); tubulární sekreci kyseliny močové snižuje i alkohol

### ↓ Hypourikémie:

Zhusta bývá příčinou působení léků. Malý diagnostický význam. Možnou příčinou může být i vrozený defekt tvorby xantinoxidázy.

**Dna** (*arthritis uratica, podagra*), metabolické onemocnění, kdy došlo k přesáhnutí meze rozpustnosti urátu (močanu) sodného. Bývá doprovázena hyperurikémií, ale neplatí to vždy. Rovněž tak hyperurikémie nemusí mít příznaky dny. Vznikající krystaly této látky se ukládají v okolí kloubu a vyvíjí se zánětlivá reakce. Léčba se snaží potlačit zvýšenou tvorbu kyseliny močové, zvýšit její vylučování, případně odstranit primární onemocnění, které k hyperurikémii vede.

## NĚKTERÉ DALŠÍ DUSÍKATÉ LÁTKY

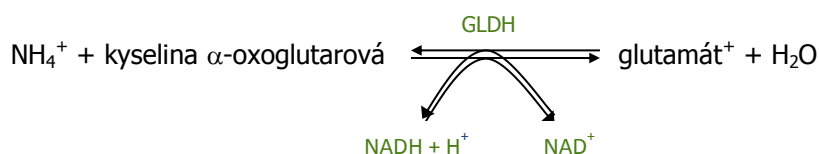
### Amoniak

Vzniká při degradaci dusíku aminokyselin v játrech, kde z něj vzniká močovina, a v proximálním tubulu ledvin hydrolyzou glutaminu.

**Referenční hodnoty** pro amoniak v plazmě se uvádějí 35 – 50  $\mu\text{mol/l}$  (záleží na použité metodě). Odběr plazmy je speciální (anaerobní s okamžitým chlazením) a zpracování materiálu musí být bezprostřední. Nejčastější indikací tohoto vyšetření je selhání jater.

### Metody stanovení

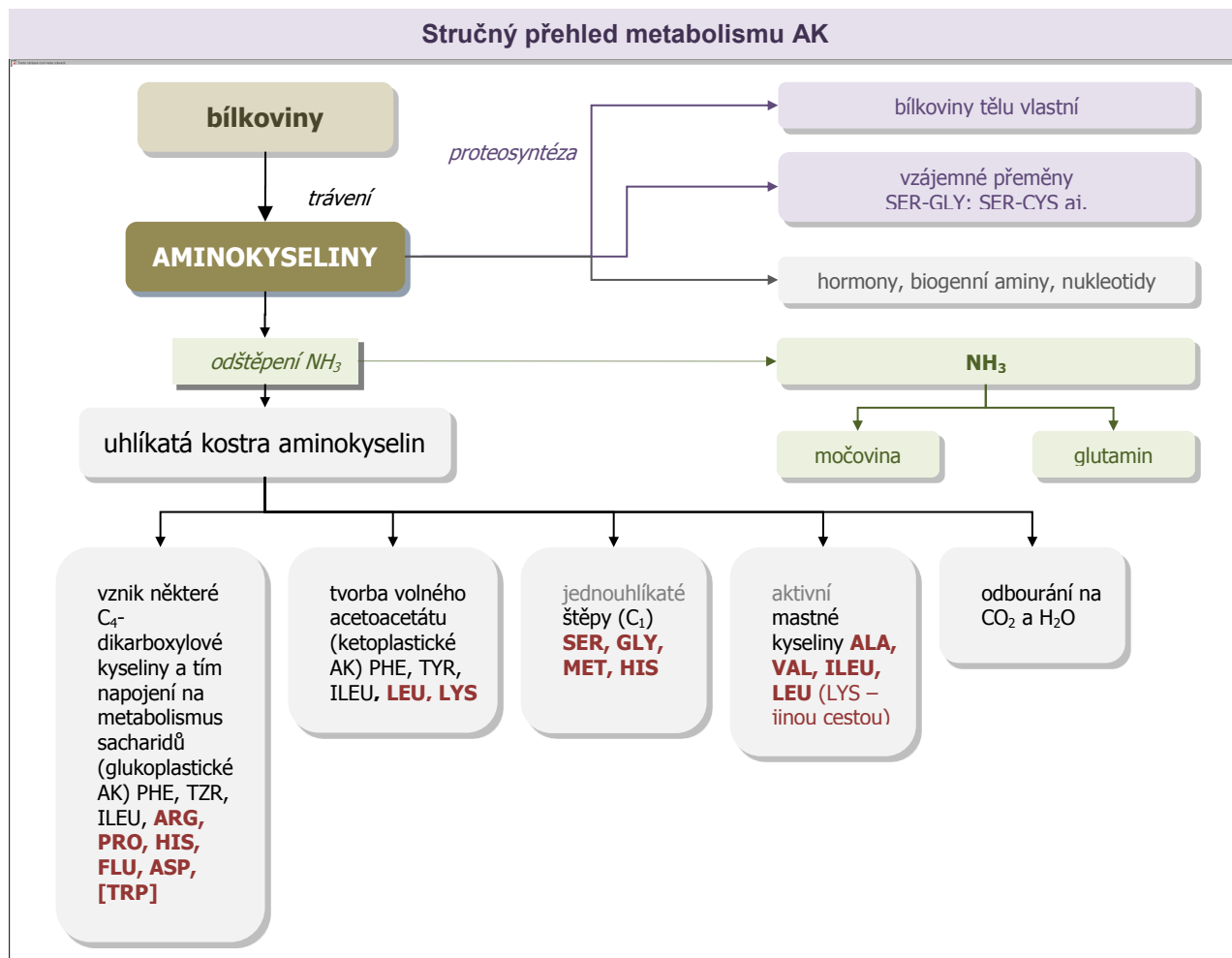
Využívá se typu reakce, známého ze stanovení močoviny, s glutamátdehydrogenázou:



Při analýze je nutno pracovat s vysoce čistou vodou prostou amoniaku, který se ve stopách vyskytuje běžně v ovzduší. Diagnostická souprava může obsahovat ionex na bezprostřední přípravu čisté vody. Odběr musí být anaerobní, vzorek uchovávaný při teplotě tajícího ledu a analýza musí proběhnout do 1 hodiny po odběru. Použití moderního odběrového systému a bezprostřední doprava vzorku do laboratoře s okamžitou následnou analýzou preanalytické podmínky zjednodušují.

## Aminokyseliny

Mezi látky nebílkovinného dusíku patří i aminokyseliny. Na rozdíl od močoviny, kreatininu a kyseliny močové však nejsou odpadními látkami, ale prekursory (výchozími látkami), ze kterých si organismus staví bílkoviny tělu vlastní. Aminokyseliny jsou i důležitými metabolity využívané organismem k získávání energie i k přeměně na různé biologicky významné sloučeniny, jak je zřejmé z jejich bohatého metabolismu znázorněného na následujícím schématu.



Některé aminokyseliny, tzv. esenciální, si organismus sám neumí vytvořit a získává je z potravy (arginin, histidin, izoleucin, leucin, lysin, methionin, fenylalanin, threonin, tryptofan a valin).

Navzdory svému významu nejsou aminokyseliny v ledvinných tubulech zcela resorbovány, a proto se nacházejí i v moči.

**Volné aminokyseliny se stanovují** v séru a/nebo v moči, a to:

- jako tzv.  $\alpha$ -aminodusík (tj. souborně všechny aminokyseliny; aminodusík podává informaci o celkovém množství aminokyseliny v dané tělesné tekutině a má jen omezený diagnostický význam)
- jako *spektrum aminokyselin*
- *cíleně konkrétní aminokyseliny* (hydroxyprolin, cystin...)

Aminokyseliny se stanovují (indikace stanovení aminokyselin)

- u jaterního selhání (především jako  $\alpha$ -aminodusík)
- u nemocných v těžkém stavu (*spektrum*)
- při diagnostice *dědičných poruch metabolismu* (*cílené stanovení*, případně *spektrum aminokyselin*)
- při posuzování kostního metabolismu (*cílené stanovení* aminokyselin hydroxyprolinu a hydroxylyzinu z kolagenu).

Změny plazmatických aminokyselin nastávají zejména u *jaterního selhání* a *akutní hepatitidy*:

### Jaterní selhání

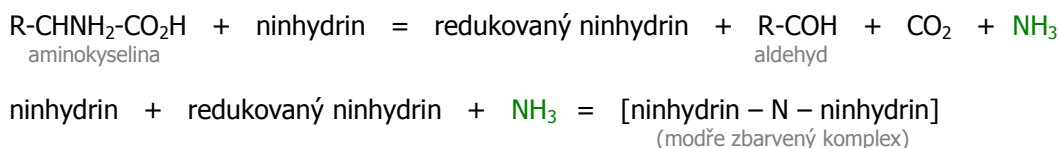
- ↑: alanin, arginin, kyselina glutamová
- ↓: glycin, serin, treonin

### Akutní hepatitida

- ↑: fenylalanin, tyrozin

## Metody stanovení aminokyselin

$\alpha$ -**aminodusík** se stanovuje *ninhydrinovou reakcí* - stručné schéma reakce:



**Provedení:** biologický materiál se deproteinuje, aminokyseliny v supernatantu se potom nechají reagovat za varu s činidlem (ninhydrin); dochází k odbourání aminokyselin na aldehyd a oxid uhličitý, současně se uvolní amoniak, který s ninhydrinem reaguje za tvorby sloučeniny složené ze dvou molekul ninhydrinu spojených atomem dusíku; výsledkem je modrý roztok, vhodný k fotometrii; při stanovení interferují močovina a pochopitelně amoniak z okolí, které s ninhydrinovým činidlem reagují také; reakce je poměrně citlivá, lze jí zjistit množství aminokyselin nižší než 1  $\mu\text{g}$

**Referenční rozmezí u dospělých:** 2,4 – 4,0 mmol/l (u novorozenců jsou hodnoty vyšší)

Druhou možností je reakce aminokyselin s **fluorescaminem**; lze zjistit nanogramová množství aminokyselin

**Jednotlivé aminokyseliny** lze oddělit a stanovit *chromatografickými a elektroforetickými metodami*, o kterých se podrobněji pojednává v hodinách *Vybraných laboratorních metod*.

**Spektrum aminokyselin** lze stanovit jak chromatografickými, tak elektroforetickými technikami

**Princip chromatografických metod:** molekuly dělených látek se rozdělují (podle různých fyzikálně-chemických principů jako jsou adsorpce, rozpustnost, velikost molekuly, ...) mezi nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní) fázi (např. mezi dvě rozpouštědla). Dělení je založeno na skutečnosti, že molekuly ve směsi mají rozdílné tendence připojit se k jedné nebo ke druhé fázi.

Chromatografické metody používané pro *analýzu aminokyselin*:

- papírová chromatografie
- papírová chromatografie dvourozměrná
- tenkovrstevná chromatografie (TLC – *Thin Layer Chromatography*)
- iontově-výměnná (ionexová) chromatografie
- automatizovaná ionexová chromatografie: automatické analyzátoř aminokyselin (na výstupu je ninhydrinová reakce)



Analyzátoř aminokyselin  
AAA 400, fy Ingos, s.r.o.

Z elektroforetických metod je to především *vysokovoltová elektroforéza* (pracuje se s napětím 2000 – 5000 V, případně i vyšším)

**Koncentrace jednotlivých aminokyselin v plazmě:**

Od stopových množství až po 650 mmol/l (maximální koncentrace alaninu u zdravých osob).

## Poruchy metabolismu aminokyselin a jejich příčiny

Poruchy metabolismu aminokyselin lze rozdělit do dvou velkých skupin. Jsou to

- **poruchy intermediárního metabolismu aminokyselin**, kde příčinou je *defekt tvorby enzymu* potřebného pro jejich metabolismus (důsledkem je hromadění metabolitu, tj. substrátu příslušného enzymu, před přerušením metabolické dráhy a poškození tkání, především CNS)
- **poruchy transportu aminokyselin**, kde lze rozlišit
  - *poruchy renálního tubulárního transportu (reabsorpce)*, tj. *poruchy resorpce* určitých aminokyselin v tubulech ledvin
  - *poruchy střevního transportu určité aminokyseliny*, tj. *poruchy jejich absorpce* z tenkého střeva; důsledkem je malnutrice této aminokyseliny; v obou případech je výsledkem atypické složení aminokyselin v moči

### Příklady dědičných poruch z oblasti metabolismu aminokyselin

#### a. Poruchy intermediárního metabolismu aminokyselin

- *Fenylketonurie* (viz též kreditní kurz *Analýza moči*) – autosomálně recesivní dědičná metabolická porucha, tzn. dědí se od obou rodičů, při které se fenylalanin nepřeměňuje na tyrozin, protože došlo k mutaci genu zodpovědného za tvorbu jaterní *fenylalanin hydroxylázy*, nezbytné pro tuto přeměnu. Frekvence výskytu této poruchy je relativně vysoká, 1:9000. Při zanedbání dojde u jedince

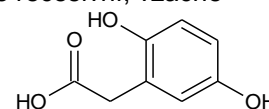
k mentální retardaci, epileptickým záchvatům a dalším závažným medicínským projevům. Proto se pravidelně vyhledává u všech novorozenců (v ČR od roku 1975): metodou je **Guthrieho** [guth'ree] **test** pro screening. Principem testu je podpora růstu bakteriálního kmene *Bacillus subtilis* v okolí terčíku s krví obsahující zvýšenou koncentraci fenylalaninu (což je esenciální složka pro tento kmen). U tzv. *variantních fenylketonurií* má fenylalanin hydroxyláza částečně zachovanou aktivitu.

**Léčba:** speciální strava bez fenylalaninu (do dospělosti, u žen po celé období plodnosti, protože během těhotenství může dojít k tzv. *maternální fenylketonurii*, tj. ovlivnění nepostíženého plodu vysokou hladinou fenylalaninu v krvi postižené matky, průnikem přes placentu). Léčba závisí také na stupni postižení produkce enzymu (variantní fenylketonurie), v některých případech je dieta méně přísná, popřípadě žádná.



- **Tyrozínemie** (schéma viz v Kapitole 5, Analýza moči) - tyrozin se nemůže dále metabolizovat na kyselinu homogentisovou což vede ke zvyšování jeho koncentrace v krvi
  - **Tyrozínemie I**, autosomálně recesivní genetické onemocnění s postižením (pravděpodobně) *fumarylacetátacetáhydrolázy* případně i *maleinylacetáthydrolázy*. V krvi je zvýšená koncentrace tyrozinu a metioninu. Průběh může být akutní nebo chronický. Při neléčení akutní tyrozinózy selhávají kojencům játra a jedinec umírá asi po půl až třičtvrté roce. U chronického průběhu se vyskytují hepatopatie postupně progredující v jaterní cirhózu až selhání jater, hepatomy, porucha funkce ledvin. Někdy se pozorují i poruchy duševního vývoje, hyperglykemie, hypertenze aj. Nemocní se dožívají přibližně 10 let.  
**Léčba:** Dieta chudá na tyrozin a fenylalanin.
  - **Tyrozínemie II**, *Richner-Hanhartův syndrom*, autosomálně recesivní genetické onemocnění s postižením jaterní cytosolové *tyrosinaminotransferázy* (mitochondriální izoenzym má funkci zachovanou): v krvi a v moči se nacházejí zvýšené koncentrace tyrozinu (tyrozin je jediná aminokyselina zvýšená v moči). U postiženého jedince dochází k různým malformacím, změnám na kůži, k poruše duševního vývoje. Změny na játrech a ledvinách pozorovány nejsou.  
**Léčba:** Upravená dieta, tzn. snížený přísun aromatických aminokyselin a proteinů.

- **Alkaptonurie** (schéma viz v kreditním kurzu Analýza moči) – autosomálně recesivní, vzácné postižení metabolismu aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu: kyselina homogentisová (alkapton) se nemůže dále metabolizovat na kyselinu fumarovou a acetocetovou. Její přebytek má za následek ukládání alkaptonu a jeho oxidačních, tmavě zbarvených produktů v kůži, v chrupavkách a ve vazivu, což vede k degenerativním změnám kloubů, osteoartritidě, poškození srdečních chlopní a tvorbě ledvinových kamenů.

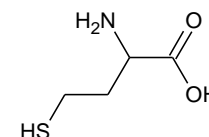


kyselina homogentisová (alkapton)

**Léčba:** Žádná jednoznačná léčba neexistuje. Doporučují se vysoké dávky vitamínu C a omezení (zvl. u dětí) fenylalaninu a tyrosinu ve stravě.

- **Albinismus** - vrozený deficit tyrozinázy, porucha přeměny tyrozinu na melanin. Důsledkem je postižení kůže (bílá až průhledná), duhovky (nebarevná, někdy narůžovělá, díky prosvítající krvi v kapilárách), světloplachost, problémy se zrakem aj.  
**Léčba:** Jedná se zejména o nápravu zraku, ať již chirurgicky (těkání očí čili *nystagmus*) nebo pomocí brýlí či kontaktních čoček.

- **Homocystinurie** - dědičná autosomálně recesivní porucha metabolismu cysteinu, při které díky deficitu *cystationin-β-syntázy*, dochází ke zvýšeným hladinám homocysteinu. Tato skutečnost má závažné důsledky, včetně mentální retardace, epilepsie, psychických chorob, očních anomálií, trombóz, předčasné aterosklerosy aj.



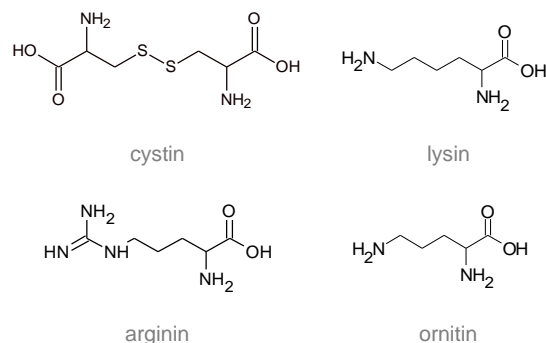
homocystein

**Léčba:** Specifická léčba neexistuje. Doporučují se vysoké dávky vitamínu B<sub>6</sub>, případně dieta s nízkým obsahem metioninu (obecně dieta s nízkým obsahem bílkovin), často také léčba pomocí trimetylglycinu (betainu), který konvertuje přeměnu homocysteinu zpátky na metionin, normální dávky kyseliny listové a přídavek cysteinu do stravy. Odpověď jednotlivých pacientů na terapii je však rozdílná, proto je nutný individuální přístup.  
(O homocysteinu je také zmínka v kreditním kurzu, Vitamíny).

### b. Poruchy transportu aminokyselin

- Cystinurie** (nejčastější případ) – autozomálně recesivní dědičně podmíněná metabolická porucha vstřebávání *cystinu* a bazických aminokyselin *lyzinu*, *argininu* a *ornitinu* ve střevech a ledvinách. Důsledkem je vysoká koncentrace nejméně rozpustného cystinu v moči a tvorba cystinových konkrementů v ledvinách, v močovodu, ale také ve žlučníku, a to již v mladém věku. Cystinurie je asymptomatická (bezpříznaková), pokud se nevytvoří kameny (*lithiáza*).. Při již přítomné nebo recidivující lithiáze může být přítomna řada symptomů v závislosti na postiženém místě (poruchy trávení při cholecystolithiáze, hematurie při lithiáze močových cest, bolesti atd.)

**Léčba:** Odpovídající hydratace, alkalizace moči, úprava diety s redukcí soli a příjmu bílkovin, zejména s obsahem metioninu. Léčba kamenů je zvláštní kapitolou jiného medicínského odvětví..



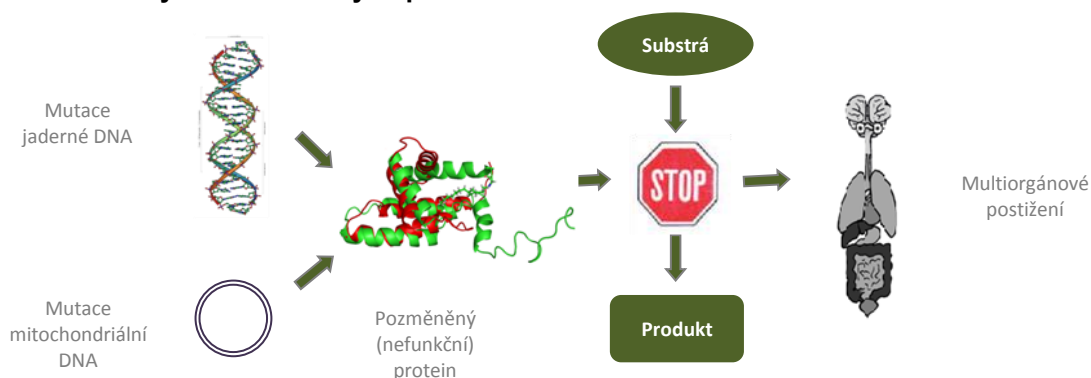
- Hartnupova choroba**, autosomálně recesivní metabolická porucha transportu neutrálních aminokyselin v ledvinových tubulech a tenkém střevě. Postižený gen kontroluje absorpci těchto aminokyselin ze střeva a reabsorpci v ledvinách. Osoby s touto poruchou nemohou patřičně absorbovat příslušné aminokyseliny ze střeva a reabsorbovat je z ledvinových tubulů. Do moči se tak vylučují značná množství aminokyselin typu tryptofanu, důsledkem jsou projevy nedostatku aminokyselin, poškození CNS produkty odbourávání (např. indikanem, produktem oxidace tryptofanu), snížená syntéza niacinu (důsledek malabsorpce tryptofanu), kožní pelagroidní změny aj.

**Léčba:** Deficit aminokyselin může být překonán dietou bohatou na proteiny. Pacienti se musí chránit před působením slunečního světla. U některých pacientů je třeba dodávat kyselinu listovou.

### Dědičné metabolické poruchy

V předchozích popisech jsme se setkali s pojmem *dědičné poruchy metabolismu*, správněji *dědičné metabolické poruchy (DMP)*. Jsou to *molekulární geneticky podmíněné* choroby, které (negativně) ovlivňují metabolické dráhy v těle, protože, díky genetickému defektu, v metabolické dráze chybí určitá klíčová součást. Fyziologická funkce metabolické dráhy je tak narušena a vyústí v různé patologické projevy dané choroby. Jedná se o širokou škálu onemocnění, která se mohou projevit od dětského věku po dospělost. Důsledkem genetického defektu je chybná tvorba příslušné bílkoviny a podle důležitosti bílkoviny v metabolismu či stavbě organismu, vzniknou různé klinické projevy.

#### Podstata vrozených metabolických poruch



#### Bílkoviny, které mohou být tímto defektem postihnuty

- enzymy:** nejčastější případ, důsledkem je hromadění substrátu a/nebo nedostatek produktu; vznikají náhradní metabolické cesty a následně atypické, často toxické látky
- krevní bílkoviny** (nikoliv enzymy): plazmatické bílkoviny nebo hemoglobin
- strukturní bílkoviny buněčné membrány:** změna tvaru buňky a její odolnosti k cytolýze
- receptor:** buňka ztrácí schopnost navázat a vychytat určitou látku
- regulační protein:** projevem může být např. nekontrolovaný růst (vznik malignity)

U tzv. *enzymopatií* je příčinou dědičné metabolické poruchy mutace v genu, který kóduje určitý enzym. Většinou (ale ne vždy) je dědičnost recesivní, protože nepostížená alela zajišťuje tvorbu dostatečného množství funkčního enzymu.

**Pokud enzym chybí, nebo je nefunkční, mohou nastat tři případy:**

1. Netvoří se produkt reakce daným enzymem katalyzované a nemohou tak vznikat ani následné produkty, pro který je předchozí produkt prekurzorem. Některá z (nevytvořených) látek pak tělu chybí.
2. Substrát reakce daným enzymem katalyzované se neodbourává, hromadí se. Tato kumulace může poškozovat buňky či tkáň, může jít i o látku potenciálně toxickou.
3. Substrát, který se nemůže přeměnit na produkt, se začne náhradní cestou odbourávat na jinou látku, která bývá toxická a může určité buňky či tkáň poškozovat.

U konkrétní osoby může dojít i ke kombinaci těchto mechanismů.

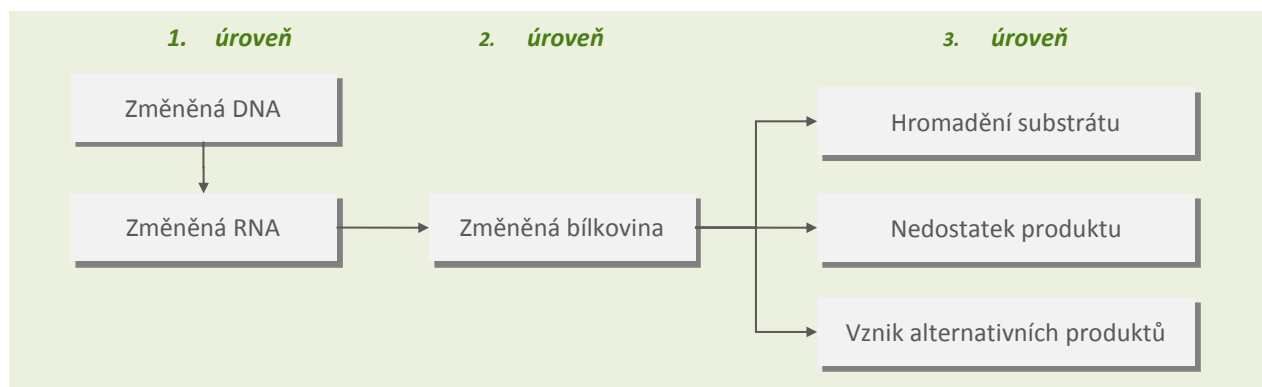
Metabolické dráhy či metabolické funkce mohou narušovat i mutace v genech pro receptory, specifické proteiny či strukturální proteiny. Dědičných metabolických poruch je obrovské množství, některé se vyskytují relativně často (fenyketonurie), jiné se vyskytují naopak velmi vzácně, v počtu několika jedinců na celém světě. Ne všechny příčiny těchto chorob byly již objeveny.

**Principy laboratorní diagnostiky dědičných poruch metabolismu**

Rozlišují se *tři úrovně detekce poruchy*, tj. detekce na úrovni

1. **Nukleové kyseliny** (DNA, mRNA) - metody přímo prokazují defektní gen; nejznámější metodou z této oblasti je polymerázová řetězová reakce (zkratka *PCR*, výslovnost *pí sí ár*, z anglického *polymerase chain reaction*), ale existuje celá řada dalších metod. Problematice DNA a RNA diagnostiky lidských chorob, PCR a dalším metodám se věnuje *Kapitola 20, DNA diagnostika lidských chorob*. Jedná se o moderní metody, které poskytují vesměs lepší výsledky než analýza např. na úrovni proteinu.
2. **Proteinu** – enzym se může prokázat v tkáňové kultuře fibroblastů histochemicky či imunohistochemicky; proteiny bez enzymové aktivity se prokazují např. změnou putování při elektroforéze a jinými elektromigračními metodami.
3. **Substrátu** (postiženého enzymu) – nejdéle používaný způsob (viz popisy metabolických poruch aminokyselin)

**Schéma různých úrovní detekcí dědičných poruch metabolismu**





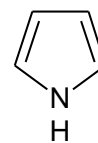
## OSTATNÍ LÁTKY S NEBÍLKOVINNÝM DUSÍKEM

Patří sem např. *karnitin, glutation, oxid dusnatý a nebílkovinné dusíkaté látky s hormonálním účinkem*. Zde nebude o těchto látkách zmiňováno.

## Porfyriny, hemoglobin, bilirubin

### Porfyriny

Porfyriny jsou organické, cyklické sloučeniny, odvozené od tetrapyrrolo **porfinu**, což je látka tvořená spojením čtyř pyrrolových kruhů pomocí methylenových můstků:

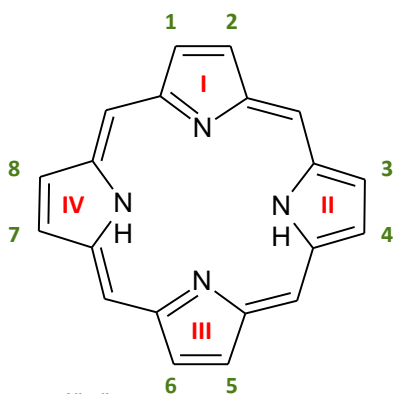


Pyrrol

Existuje celá řada sloučenin na bázi tetrapyrrolů, které mají rozmanité biologické účinky.

Mezi tyto účinky patří např.:

- *zachycování světelné energie* (chlorofyl a další sloučeniny u sinic, řas a vyšších rostlin)
- *uvolnění energie a tvorba ATP v dýchacím řetězci* (cytochromy, cytochromoxidáza)
- *transport kyslíku* (hemoglobin, myoglobin, leghemoglobin – pigment u bobovitých rostlin)
- *antioxidační účinky* (hemoproteiny, peroxidáza, kataláza, ale také degradační produkty biliverdin a bilirubin !!)
- *buněčná signalizace* (působení hemoxygenázy a biliverdinreduktázy) aj.



Postranní řetězce:

Acetát,	A = -CH <sub>2</sub> COOH
Propionát,	P = -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH
Metyl,	M = CH <sub>3</sub>
Vinyl,	V = -CH=CH <sub>2</sub>

**Protoporfyrin III**, který je základem **hemu**, obsahuje M, V a P v pořadí typickém pro porfyrin III: M, V, M, V, M, P, P, M. Je to tedy porfyrin typu III, ale častěji se uvádí jako protoporfyrin IX (podle systematického řazení izomerů).

Nejvýznamnějším porfyrinem je *hem*.

Vlevo je uveden vzorec **porfinu**, který je v **porfyrinech** substituován v polohách 1–8 různými postranními řetězci.

V **porfyrinech typu I**, se pravidelně střídají dva postranní řetězce v uvedeném pořadí 1–8.

V **porfyrinech typu III** se pravidelně střídají dva postranní řetězce v polohách 1–6, v polohách 7 a 8 jsou v opačném pořadí (místo 7-8 je 8-7).

Střídající se (konjugované) dvojném vazby jsou příčinou **barevnosti** těchto látek.

**Uroporfyriny**, poprvé zjištěny v moči, vyskytují se nejen v moči, obsahují A a P.

Uroporfyrin I v pořadí: A,P,A,P,A,P,A,P

Uroporfyrin III v pořadí: A,P,A,P,A,P,P,A

**Koproporfyriny**, poprvé zjištěny ve stolici, lze je nalézt i v moči, obsahují M a P

Uroporfyrin I v pořadí: M,P,M,P,M,P,M,P

Uroporfyrin III v pořadí: M,P,M,P,M,P,P,M

## Klinické poznámky

### Porfyrie

Porfyrie je skupina vrozených metabolických poruch způsobených mutacemi genů, řídících syntézu enzymů působících při biosyntéze hemu. Je to důsledek poruchy ve vytváření hemu. Bylo popsáno šest typů porfyrie, majících za následek *pokles aktivit enzymů* zúčastněných v syntéze hemu (důsledkem je hromadění některého z metabolitů - porfyrinů, a to především v kůži, kostech a zubech, také v játrech a nález porfyrinů v moči a ve stolici)..

Porfyrie jsou klasifikovány na základě *nejvíce postižených orgánů a buněk*; rozeznávají se porfyrie

- *erythropoetická* (poznámka: kostní dřev syntetizuje významně hemoglobin)
- *hepatální* (poznámka: kromě hemoglobinu syntetizují játra další hemoprotein - *cytochrom P-450*)
- *erytrohepatální* (smíšená porucha)

Porfyrie s postiženými enzymy, které jsou na **počátku** metabolické dráhy, vedou k hromadění kyseliny  $\delta$ -aminolevulové (ALA) a porfobilinogenu (PBG; viz schéma na str. 27). Jedna z těchto látek, možná obě, působí toxicky na abdominální nervy a CNS, což vede k abdominální (v oblasti břicha) bolesti a neuropsychickým symptomům. Enzymové bloky v **pozdějších** stupních metabolismu mají za následek akumulaci různých typů porfyrinogenů, jejichž oxidační deriváty způsobují *fotosenzitivitu*, tj. reakci na viditelné světlo v oblasti 400 nm, což má za následek kožní defekty. Porfyriny, které neobsahují kov, mohou absorbovat světlo určitých vlnových délek, a tím dochází k excitaci elektronů - energie pohlceného světla přesune elektrony do vyšších energetických hladin (*porfyrinogeny* jsou bezbarvé, *porfyriny*, tj. *oxidované porfyrinogeny* jsou barevné a červeně fluoreskují). Tyto molekuly mohou svou energii později předat jiným molekulám, např. kyslíku, za vzniku reaktivních kyslíkových atomů (singletů) a dalších destruktivních molekul – *volných radikálů*. Tyto útvary pak působí toxicky na tkáň.

Vrozená erythropoetická porfyrie může vést k takovému znetvoření pacienta, že ten připomíná upíra a je možné, že tato světlem navozená toxicita může být **pramenem pověstí o upírech**:

*Toxickým působením radikálů dochází ke zničení uší a nosu oběti, rty a dásně se rozkládají a odhalují červené zuby podobné tesákům. Kůže se pokrývá jizvami, hustá pigmentace a smrtelně bledá pleť ukazuje na anemii. Někteří historikové se domnívají, že v dávných dobách se postižení jedinci pokoušeli léčit tak, že pili krev (anemie se léčí krevními transfuzemi). Lidé s vrozenou erythropoetickou porfyrií se po zkušenostech se sluncem zcela jistě neodvažovali opouštět své příbytky za denního světla. Stejně tak si mohli ošklivit česnek, protože některé látky z česneku podle všeho zesilují symptomy porfyrie a z mírného záchvatu mohou učinit reakci vedoucí k agonii.*



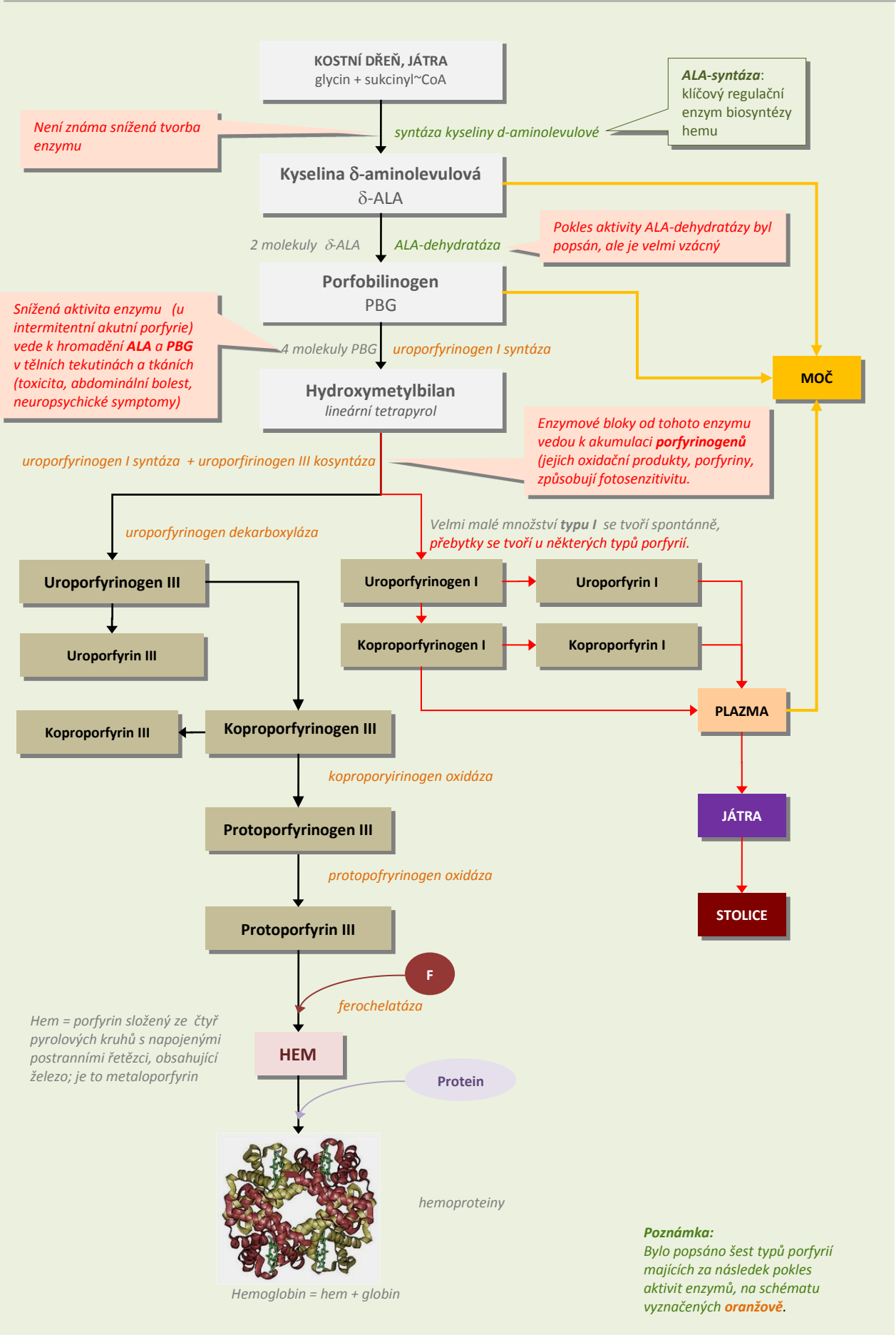
**Léčba:** Úprava diety (absence alkoholu, česneku, naopak příjem vitamínů..), minimalizace denního světla; aplikace krevních transfuzí (léčba projevů nemoci), odběry žilní krve („pouštění žilou“) pro snížení zásob železa, které může být vyvolávacím faktorem, pomalé vyplavování jaterních porfyrinů pomocí farmak (cholestyramin). Léčba porfyrií je neshadná, vzhledem k různým projevům i různému rozsahu postižení. Někdy je třeba sáhnout i k transplantaci jater.

### Hlavní nálezy u porfyrií

Moč	Stolice	Erytrocyty
PBG (+, -)	koproporfyryn (+)	protoporfyryn (+)
uroporfyryn (+)	protoporfyryn (+)	

U různých typů porfyrií se nacházejí tyto laboratorní nálezy v různých kombinacích, PBG je v některých kombinacích pozitivní, v jiných negativní.

Zkrácené schéma syntézy hemu a příčiny porfyrií

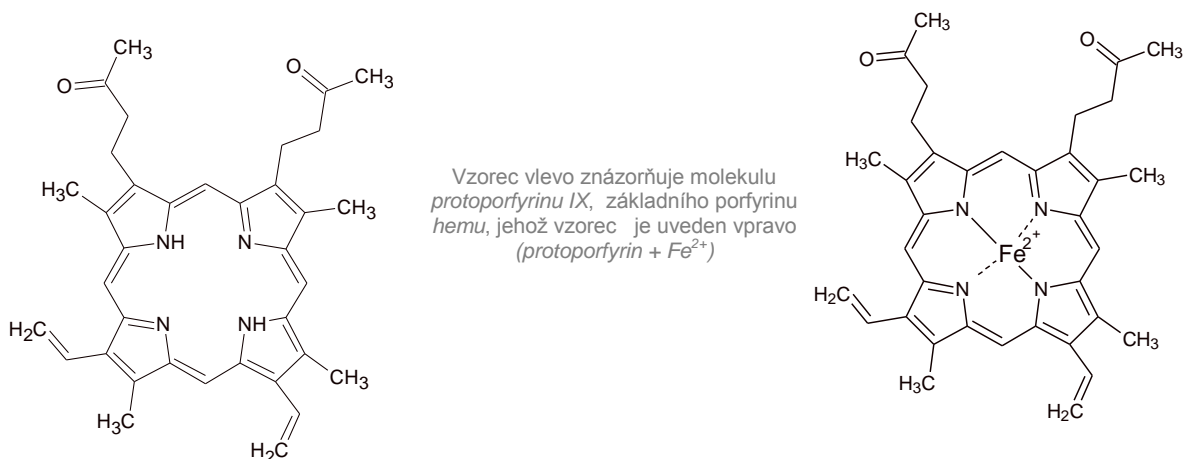


## Hemoglobin

Hemoglobiny jsou porfyriny s obsahem železa vázané na protein globin. Jsou schopné vázat reverzibilně kyslík, slouží jako transportní systém kyslíku v krvi.

Hemoglobin v erythrocytech obratlovců plní dvě hlavní transportní funkce:

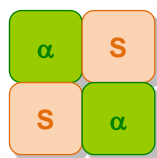
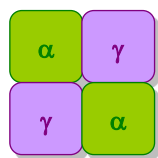
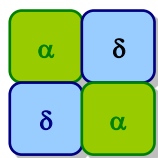
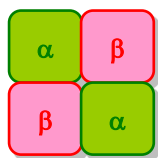
- *transport kyslíku* z dýchacího orgánu do periferních tkání
- *transport oxidu uhličitého a protonů* z periferních tkání do dýchacího orgánu, kde dojde k jejich vyloučení; oxid uhličitý se váže na aminoskupiny deoxygenovaného hemoglobinu a tvoří *karbaminohemoglobin* (obdobná reakce probíhá i s různými bílkovinami krevní plazmy za vzniku karbaminoproteinů). Takto, jako karbaminosloučeniny, se přepraví v artériích asi 5% celkového CO<sub>2</sub> (ostatních 90% ve formě bikarbonátu a 5% jako fyzikálně rozpuštěný), ve vénách je to 30% (60% jako bikarbonát a 10% fyzikálně rozpuštěný). Deoxyhemoglobin je zásaditější povahy než oxyhemoglobin, tudíž lépe váže protony uvolněné ve tkáních, které ovšem zase uvolňuje v plicích po nasycení kyslíkem.



Hemoglobin má tetramerní strukturu, skládá se vždy ze dvou dvojic odlišných polypeptidů (monomerních jednotek), označovaných řeckými písmeny ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), ale i latinkou (S), každá podjednotka obsahuje hem.

### Některé hemoglobiny a jejich struktura

Hemoglobin	Popis	Složení	Novorozenci	Dospělí
<b>HbA</b>	Normální lidský hemoglobin	$\alpha_2\beta_2$	20 – 40%	95 – 98%
<b>HbA<sub>2</sub></b>	Minoritní hemoglobin přítomný u dospělých lidí	$\alpha_2\delta_2$	0,5%	1,4 – 3,0%
<b>HbF</b>	Fetální hemoglobin	$\alpha_2\gamma_2$	60- 80%	0,3 – 1,0%
<b>HbS</b>	Hemoglobin srpkovité anémie	$\alpha_2S_2$	patologický hemoglobin	



Grafické znázornění běžných hemoglobinů, v pořadí zleva: HbA, HbA<sub>2</sub>, HbF, HbS

Mutace genů kódujících řetězce  $\alpha$  a  $\beta$  mohou ovlivňovat biologickou funkci hemoglobinu. Těchto mutací existuje několik stovek a pokud vedou ke změně biologické funkce hemoglobinu, hovoří se o *hemoglobinopatiích* (v tabulce výš např. HbS). Typizace hemoglobinů se děje především *elektroforetickými metodami* (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu, dvourozměrná elektroforéza, izoelektrická fokusace aj.).

**Methemoglobinemie** - hemové železo není dvojmocné, ale trojmocné (oxidace  $\text{Fe}^{2+}$  na  $\text{Fe}^{3+}$  např. sulfonamidy, dusitany aj., snížená aktivita *methemoglobinreduktázy*, dědičné příčiny).

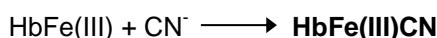
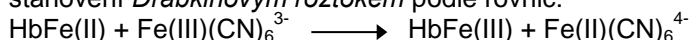
**HbM (methemoglobin)** nemůže vázat kyslík a nepodílí se na jeho transportu. **Poznámka:** HbM má hnědou barvu

**Karbonylhemoglobin** vzniká vazbou CO na hemoglobin. Oxid uhelnatý se váže (reverzibilně) silněji než kyslík, následkem je zdušení organismu. (Více podrobností v kreditním kurzu *Toxikologie*)

**Kyanhemoglobin** vzniká vazbou kyanidů na hem.

**Glykovaný hemoglobin** a jeho význam je podrobně rozebrán v kreditním kurzu *Hormony II*.

**Klasickou metodou stanovení hemoglobinu v plné krvi je stanovení Drabkinovým roztokem** podle rovnic:



**Vysvětlivky:**

HbFe(II) = hemoglobin

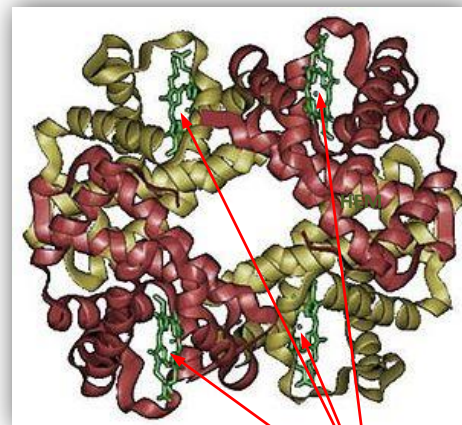
HbFe(III) = methemoglobin

HbFe(III)CN = kyanhemoglobin

**Reagencie:** ferrikyanid draselný  $\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$ , kyanid draselný KCN a hydrogenuhličitán sodný  $\text{NaHCO}_3$ .

Kalibruje se na kyanhemoglobinový kalibrátor.

KCN je prudký jed, ale koncentrace v roztoku je malá.



Na obrázku je znázorněna molekula hemoglobinu, kde jsou vidět 4 globinové řetězce (2 + 2 stejné) a 4 pyrolové kruhy (**hem**- zeleně).

Kyanhemoglobin se fotometruje při 340 nm. V rovnici jsou vynechány ionty, které se reakce nezúčastňují.

Někdy je důležité stanovit i *volný hemoglobin v plazmě*, který je indikátorem *akutní destrukce erytrocytů* (hemolýza) v cévním systému. U chronických hemolytických onemocnění nemá stanovení volného hemoglobinu v plazmě praktickou hodnotu, protože volný hemoglobin je rychle vyvázan haptoglobinem a odstraněn z krve a jakýkoliv volný nenavázaný hemoglobin je bezprostředně vyloučen ledvinami (molekulová hmotnost hemoglobinu je 64 456). Volný hemoglobin se stanovuje i v transfuzní službě při *kontrolě krevních konzerv*.

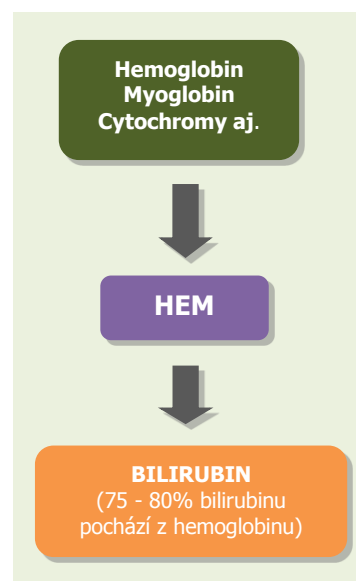
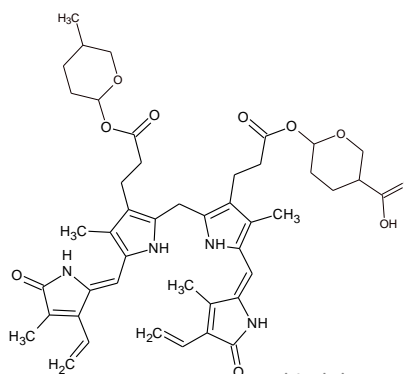
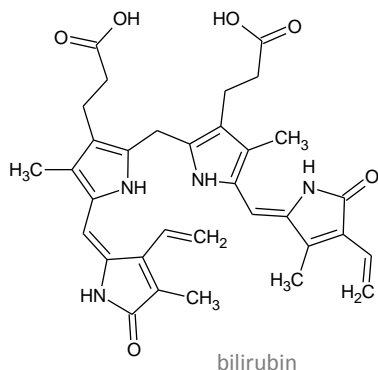
Vzhledem k nízkým koncentracím vyžaduje stanovení volného hemoglobinu citlivou metodu, dobře se osvědčuje *spektrofotometrie při třech vlnových délkách: 562, 578 a 598 nm*.

## Bilirubin

Bilirubin vzniká ze sloučenin, které obsahují **hem**:

- z hemoglobinu,
- cytochromů,
- katalázy,
- myoglobinu aj.

Obsahují čtyři pyrolová jádra spojená můstky (metinové a methylenové). Hlavním metabolitem hemu je **bilirubin**, ze kterého dalšími přeměnami vznikají další látky (žlučová barviva, srovnej též Kapitola 5, Analýza moči).

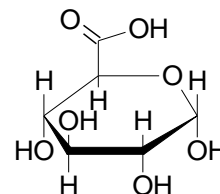


## Metabolismus bilirubinu

Hlavním zdrojem bilirubinu je *hemoglobin*, který se uvolňuje ze zanikajících erytrocytů především ve slezině. Prvním produktem rozpadu hemoglobinu (iniciovaného mikrozomálním enzymem *hemoxigenázou*) je zelený *biliverdin*, který se ještě ve slezině redukuje (*biliverdinreduktázou*) na žlutooranžový *bilirubin*.

Bilirubin je transportován portální krví do jater. Díky tvorbě vodíkových můstků uvnitř molekuly dochází k ukrytí hydrofilních skupin, takže je ve vodě nerozpustný a je přepravován hydrofilním nosičem, albuminem (90%), na který je vázán poměrně silnou vazbou, částečně (10%) i *apolipoproteinem D* v molekule HDL-lipoproteinu. (U pacientů s portální hypertenzí obchází poměrně velké množství portální krve játra, což může u těchto pacientů vést ke zvýšené hladině bilirubinu v séru). Díky v vazbě na albumin neproniká nekonjugovaný bilirubin do moči.

V jaterních buňkách se procesem zvaným *konjugace* tvoří estery bilirubinu, především s kyselinou glukuronovou. Vzniká *mono-* a hlavně *diglukuronid bilirubinu* (správný název je *bisglukuronozyl bilirubin*) čili *konjugovaný bilirubin* (konjugát s kyselinou glukuronovou). Enzym odpovědný za tvorbu konjugátů s kyselinou glukuronovou se jmenuje *UDP-glukuronozyltransferáza* (existuje jich více typů, pro bilirubin je to konkrétně UGT1A1). Touto úpravou (která je typická pro více látek, nejenom pro bilirubin) se stává bilirubin rozpustným ve vodě a může přecházet do žluči (případně může v této formě proniknout i do moči).



kyselina glukuronová

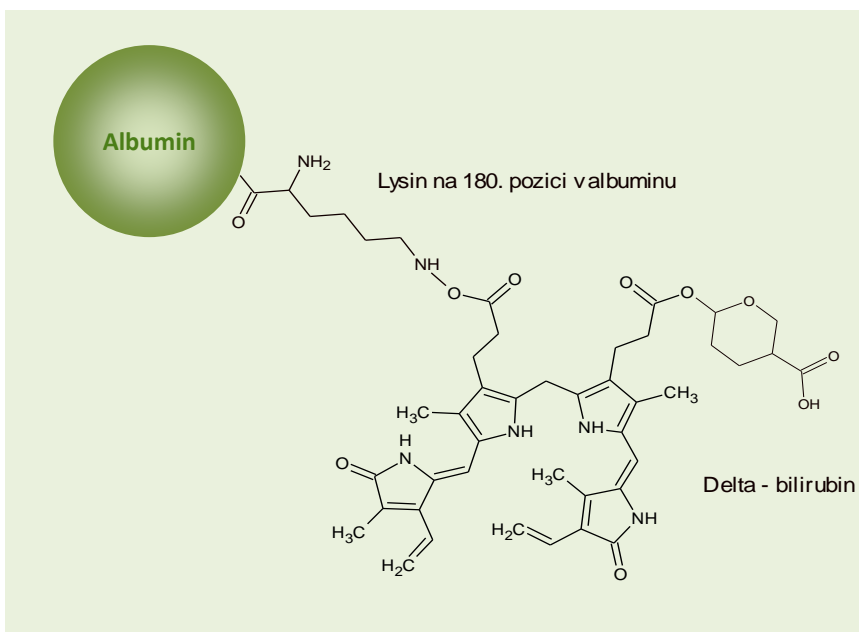
Konjugovaný bilirubin je na albumin vázán velmi slabě. Při déle trvající konjugované hyperbilirubinémii (viz dále) se tato slabá vazba přemění na vazbu kovalentní a vzniká tzv. ***δ-bilirubin***.

Jak bylo naznačeno, přechází konjugovaný bilirubin z jater do žlučových a žlučí se dostává do tenkého střeva a odtud do tlustého střeva. Zde dochází k postupným redukcím bilirubinu na řadu látek, žlučových barviv.

Důležitou roli v tomto procesu hrají střevní bakterie. Největší podíl tvoří *urobilinogen* a

*sterkobilinogen*, které se oxidují na *urobilin* a *sterkobilin*. Tyto látky pak způsobují hnědé zabarvení stolice. Část barviv se dostává portálním oběhem do jater. Při poškození jaterních buněk prochází urobilinogen do oběhu a objevuje se v moči.

Stručné schéma metabolismu bilirubinu je uvedeno na str. 33.



Nekonjugovaný bilirubin se vyskytuje v několika typech izomerů. Některé z nich nevytvářejí intramolekulární vodíkové můstky a jsou ve vodě rozpustné a pro vyloučení žlučí nevyžadují konjugaci. V dospělém organismu se vyskytují pouze ve stopových množstvích. U novorozenců je jeden z těchto izomerů zastoupen poměrně hodně, ale nezralými játry (omezená schopnost konjugace) se do žluči, díky popsaným vlastnostem, vylučuje poměrně snadno. Přirozený (konfigurační) izomer bilirubinu (4Z,15Z) se snadno mění fotoexcitací na izomery, které přecházejí na stabilní a částečně polární deriváty označované názvy *lumirubin*, *cyklobilirubin* nebo *fotobilirubin II*. Tyto látky se vylučují játry, aniž by musely být konjugovány, což je principem jedné z cest, jak odstranit nadměrný bilirubin z krevního oběhu – fototerapie patologické žloutenky, nejčastěji novorozenecké.

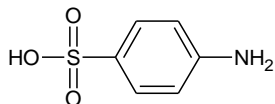
## Metody stanovení bilirubinu

1. Metody na bázi **azokopulace**
2. Metody na bázi **oxidace bilirubinu na biliverdin**

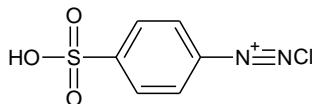
1. **Azokopulační metody** – princip: kopulace bilirubinu s *diazočínidlem* v kyselém prostředí na azobarvivo

### a. Jendrassik-Gróf

Diazočínidlem je diazotovaná kyselina sulfanilová, která se získá reakcí kyseliny sulfanilové s dusitanem sodným v kyselině solné



kyselina sulfanilová



diazotovaná kyselina sulfanilová

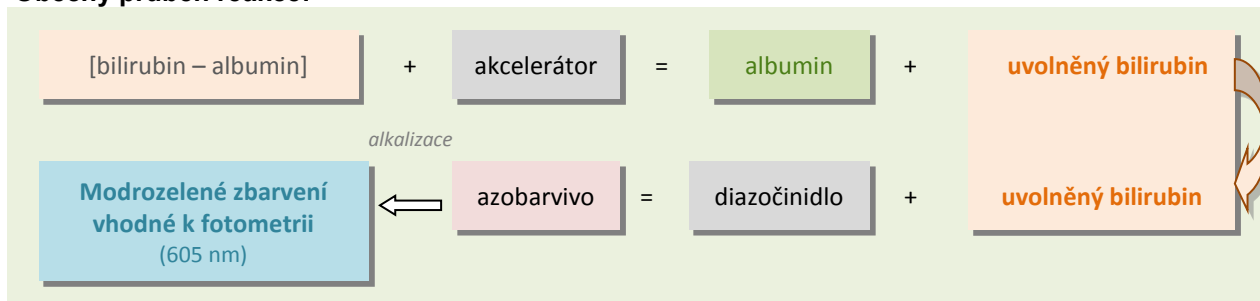
Konjugovaný bilirubin dává s diazočínidlem do 30 s červené zbarvení, čili reaguje *přímo* s čínidlem, odtud název *přímy bilirubin* (jak bylo zmíněno výš, *přímo* reagují s diazočínidlem i některé další formy bilirubinu, které se ovšem za normálních okolností vyskytují v zanedbatelném množství, takže nepřispívají významně k této reakci).

### Schéma reakce:

*Mono- a diglukuronidbilirubinu + diazočínidlo = azobarvivo* (červené zbarvení; vhodné k fotometrii: 535 nm)  
 Nekonjugovaný bilirubin je nejprve nutno uvolnit z vazby na albumin pomocí *akcelératoru*, kterým bývá např. *benzoan sodný s kofeinem*. Teprve potom je schopen reagovat s diazočínidlem za tvorby červeného zbarvení. Reaguje s čínidlem *nepřímo* (až po přidání akcelératoru), odtud název *nepřímý bilirubin*. Pro zvýšení citlivosti reakce se směs alkalizuje (vínan sodnodraselný v NaOH) a zbarvení se změnil na *modrozelené*.

**Poznámka:** *NEPŘÍMÝ bilirubin = CELKOVÝ bilirubin minus PŘÍMÝ bilirubin*

### Obecný průběh reakce:

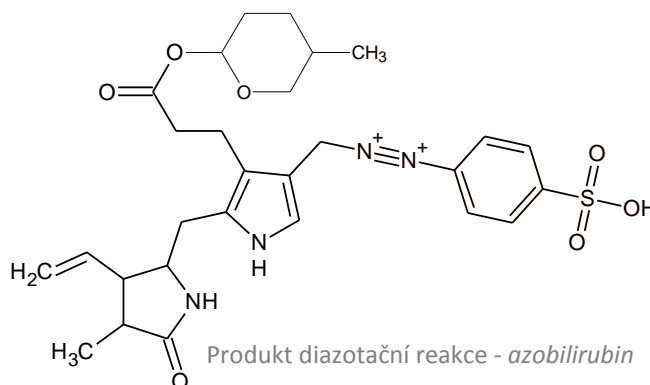


**Poznámka:** Je třeba si uvědomit, že touto metodou se stanovuje *CELKOVÝ bilirubin!*

Vzhledem k vlastnímu zbarvení séra je vhodné provádět vlastní slepý vzorek (porovnávací vzorek) a zbarvení séra od výsledné absorbance odečíst. Hemolýza snižuje výtěžek reakce!

**Diagnostická souprava PLIVA-Lachema Diagnostika s tímto principem reakce:** např. Bilirubin celkový Liquid 350 (BIL T L 350) nebo Bilirubin (BIL 100)

**Modifikaci metody** podle Jendrassika-Grófa je úprava podle *Doumase*: Hlavní změnou je, že do reakční směsi se na závěr přidává tzv. *STOP-reagencie*, která působí destrukci nadbytečného diazotačního čínidla a tím umožňuje stanovit *přímý bilirubin* v alkalické oblasti, kde je stanovení citlivější. V tomto provedení tedy pro obě formy bilirubinu (konjugovaný i nekonjugovaný) se používá jedna kalibrační křivka. Metoda je málo ovlivněna hemolýzou a je vhodná pro stanovení bilirubinu u novorozenců

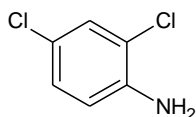


### Diagnostická souprava PLIVA-Lachema Diagnostika:

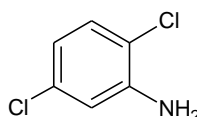
Bilirubin JG-TD (BIL TD 350)

**Poznámka I:** Někdy se bilirubin u novorozenců stanovuje tzv. *přímou fotometrií naředěného séra ve vhodném médiu* (např. ve fyziologickém roztoku) *při dvou vlnových délkách*. Tato metoda se v současnosti nedoporučuje, protože mnohá séra se při ředění zakalí a výsledky takto obdržené jsou nesprávné.

### a. Stanovení pomocí dichloranilinu



2,4-dichloranilin (BLT)



2,5-dichloranilin

V tomto uspořádání je diazotačním činidlem buď 2,4- nebo 2,5-dichloranilin, reakční směs navíc obsahuje detergent. Fotometrie při 540 – 560 nm.

**Diagnostický set s PLIVA-Lachema Diagnostika:** Bilirubin-T (s 2,4-dichloranilinem, fotometrie při 530-540 nm) byl vyřazen z výroby

Tuto metodu nelze použít ke stanovení konjugovaného (přímého) bilirubinu. Stanovení je ovlivněno vysokými koncentracemi močoviny a kreatininu, hemolýzou a chylozitou séra

**Poznámka:** Diazoniová sůl dichloranilinu je dichlorfenyl-diazonium-... Moderním kapalným činidlem pro stanovení bilirubinu je stabilizovaná diazoniová sůl 3,5-dichlorophenyl-diazonium-tetrafluoroborate (DPD), která jako US patent č. 5112769, byla navržena pro stanovení přímého (!) bilirubinu. Používá se zejména v automatických analyzátoch, např. soupravy Beckman-Coulter OSR 6112 a OSR 6212 pro použití na analyzátoch řady Beckman-Coulter AU.

## 2. Oxidace bilirubinu na biliverdin

- a. Použitím *bilirubinoxidázy*, enzymu oxidujícího bilirubin na biliverdin, lze stanovit specificky bilirubin. Měří se pokles absorbance způsobený změnou barvy (ze **žlutooranžové** na zelenou). Metoda je vhodná i pro stanovení bilirubinu u novorozenců.

**Poznámka:** diagnostickou soupravu dodává např. francouzská firma CHEMELEX

- b. Místo bilirubinoxidázy se používá *vanadát* v prostředí detergentu. Stanovení není prakticky ovlivněno ani hemolýzou ani chylozitou séra.

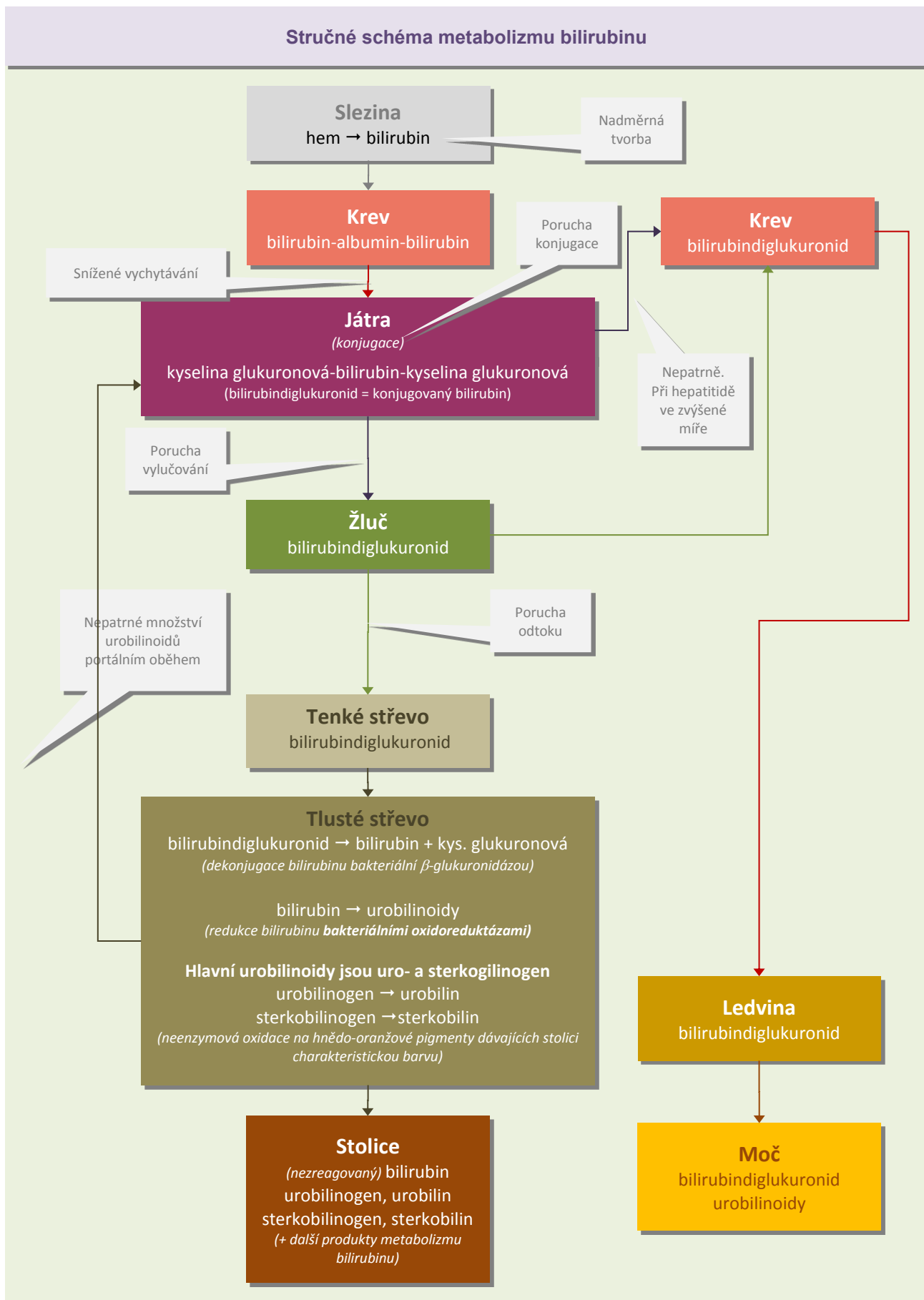
**Poznámka:** diagnostickou soupravu vyrábí japonská firma WAKO; obdobnou metodu českého původu vyrábí a dodává firma SKALAB Svitavy; v původní variantě byla místo vanadu použita měď, v poslední verzi metody je použit ferrikyanid

### Referenční hodnoty:

Celkový bilirubin (T-Bil, t-Bil, total bilirubin): většina metod uvádí horní limit do 17,1  $\mu\text{mol/l}$ .

Konjugovaný bilirubin (D-Bil, d-Bil, direct bilirubin): horní limit se pohybuje okolo 5  $\mu\text{mol/l}$ .





## Klinické poznámky

Při hodnotách bilirubinémie nad 35  $\mu\text{mol/l}$  dochází ke žlutému zbarvení kůže a sliznic – vzniká **ikterus** neboli **žloutenka**. Žloutenky vypadají různě, takže původní dělení bylo do tří základních typů - ikterus:

- **flavinový** (jasně žlutý, nejčastěji doprovází hemolytické stavy, subjektivní stav nemocného bývá dobrý),
- **rubínový** (zbarvení dočervena, doprovází onemocnění jaterní tkáně) a
- **verdinový** (žlutozelený, doprovází cholestázu, bývá tmavá moč, což je způsobeno přítomností konjugovaného bilirubinu).

Toto dělení velmi dobře koresponduje s následujícím dělením podle *vztahu k játrům*.

### Dělení žloutenek podle vztahu k játrům:

1. Prehepatální (hemolytická, předjaterní)
2. Hepatální (jaterní)
3. Posthepatální (obstrukční, z uzavěru žlučových cest)

### 1. Hemolytická žloutenka (viz schéma)

**Příčina:** jakýkoliv stav, který zvyšuje destrukci erytrocytů (zvýšená tvorba a odbourání hemoglobinu).

#### Biochemické nálezy:

- krev – vyšší hodnota nekonjugovaného bilirubinu
- moč – pozitivní Ehrlichova reakce, zkouška na bilirubin negativní

### Hemolytické onemocnění novorozenců (HON):

**Příčina:** neslučitelnost v AB0 Rh systému. Za určitých okolností může dojít v případě inkompatibility v AB0 Rh systému dítěte a matky k tvorbě protilátek v těle matky proti krvinkám plodu. Nejčastěji se tvoří protilátky proti antigenu D (Rh inkompatibilita). Dalšími příčinami HON mohou být anti-c, Kell (K a k), Duffy (Fya), Kidd (Jka a Jkb), MNS (M, N, S a s), anti-C a anti-E.

Ke styku matčiny krve a krve plodu dochází při porodu (potratu, mimoděložním těhotenství, předčasném odlučování placenty, amniocentéze aj.). Vytvořené protilátky při dalším těhotenství pronikají přes placentu do oběhu plodu a způsobují hemolýzu, která vyústí v novorozeneckou žloutenku a dochází k ohrožení plodu.

Neslučitelnost v Rh systému vyžaduje podání *Rh antiséra IgG anti-D* do 48 hodin po porodu, potratu a umělém přerušení Rh-negativním ženám, aby krvinky plodu D-pozitivní, které případně pronikly do matčina krevního oběhu, byly zničeny a nemohly vést k tvorbě protilátek.

**Biochemický nálezy:** bilirubin v pupečnickové krvi nad 70  $\mu\text{mol/l}$ , pokles hemoglobinu, důležitá je *dynamika* procesu. Stoupá-li nekonjugovaný bilirubin, může dojít až k přestupu do mozkové tkáně (bazální ganglia – jádrový ikterus) rezultující v trvalé poškození až smrt dítěte! Indikace k tzv. výměnné transfuzi.

**Bilirubinoidy v plodové vodě:** zbarvení plodové vody žlučovými barvivy (tzv. *bilirubinoidy*) – stanovují se na základě analýzy absorpční křivky.

### 2. Hepatální žloutenka (parenchymální – viz schéma)

**Příčina:** poškození jaterních buněk (jaterního parenchymu)

**Příklad:** žloutenky po různých jaterních jedech (chloroform, fosfor, chlorid uhličitý), žloutenky způsobené toxiny, virem infekční hepatitidy, městnáním v jaterních cévách u srdečního selhání, žloutenky při cirrhózách

#### Biochemické nálezy:

- krev – zvýšeny hodnoty konjugovaného i nekonjugovaného bilirubinu, zvýšena hodnota urobilinogenu
- moč – vzestup urobilinogenu, Ehrlichova reakce pozitivní, bilirubin pozitivní

**Poznámka:** je-li narušena schopnost jaterní buňky konjugovat bilirubin, nestoupá hladina konjugovaného bilirubinu ani v krvi ani v moči

### 3. Obstrukční žloutenka (viz schéma)

**Příčina:** ucpání jaterního nebo společného žlučovodu. Barvivo se resorbuje do jaterních žil a lymfatických cest.

#### Biochemické nálezy:

- krev – vzrůst konjugovaného bilirubinu, později i nekonjugovaného (příčinou je zpomalení konjugace vlivem městnání)
- moč – bilirubin pozitivní, urobilinogen negativní

**Poznámka:** v tomto případě je acholická stolice (tj. chybí zbarvení žlučovými barvivy)

## Přehled laboratorních nálezů u jednotlivých typů žloutenek

Ikterus	S-bilirubin nekonjugovaný	S-bilirubin konjugovaný	U-bilirubin	U-urobilinogen
prehepatální	↑	-	-	+
hepatální	↑	+	+	+
posthepatální	N	+	+	-

Legenda k tabulce: ↑ = zvýšeno; N = normální/fyziologický; - = negativní; + = pozitivní (volně podle Racek a kolektiv: *Klinická biochemie, Galén, Praha 1999*)

**Dělení žloutenek podle typu bilirubinu nacházejícího se v krvi.**

V tomto se spíše než o dělení žloutenek mluví o dělení hyperbilirubinemií, a to na nekonjugované, smíšené a konjugované.

**1. Hyperbilirubinémie nekonjugované - příčina:**

- Nadměrný vznik bilirubinu** (všechny hemolytické anémie, vrozené i získané, včetně hemolytické nemoci novorozence; fyziologický ikterus novorozence); další příčinou je vznik bilirubinu přímo v kostní dřeni (defektní erythropoéza), extravaskulární hemolýza, nadprodukce bilirubinu z nehemoglobinových zdrojů
- Porucha vychytávání bilirubinu a jeho konjugace** (nezralost transportních systémů - podíl na fyziologické žloutence novorozenců, získané či vrozené defekty transportu bilirubinu na sinusoidálním pólu hepatocytu, přechodné familiární hyperbilirubinémie, Gilbertův syndrom, nezralost konjugačního systému u novorozenců, vrozené či získané defekty konjugace bilirubinu)

**Poznámka:** Gilbertův syndrom je způsoben mutací genu pro UGT1A1 (viz str. 7-23), která vede ke snížení aktivity této transferázy, tudíž i ke snížení procesu konjugace (tj. glukuronozylace nekonjugovaného bilirubinu) a tak ke vzniku nekonjugované hyperbilirubinémie. Také se snižuje poměr bis- a monoglukuronozyl bilirubinu ve žluči, tzn. ve prospěch monoglukuronozyl bilirubinu, a protože monoglukuronozyl bilirubin se ve žluči snáze dekonjuguje, je snížení tohoto poměru příčinou vyššího výskytu žlučových kamenů z vypadávajícího nekonjugovaného bilirubinu (pigmentové cholelitiázy) u jedinců s Gilbertovým syndromem.

**2. Hyperbilirubinémie konjugované - příčina:**

Porucha odtoku žluči - obstrukce žlučových cest (kámen zaklíněný v koncové části choledochu [žlučovodu], nádor žlučových cest nebo hlavy pankreatu, porucha střevního metabolismu aj).

**Poznámka:** Stejný laboratorní nález se nachází i u některých onemocnění, které nemají za příčinu obstrukci žlučových cest (např. dědičně způsobená porucha exkrece konjugovaného bilirubinu jaterní buňkou)

**3. Hyperbilirubinémie smíšené - příčina:**

Poškození hepatocytů ⇒ porucha vychytávání a konjugace (virová hepatitida, jiná virová či bakteriální onemocnění, toxická poškození jater – bakteriální toxiny při sepsi, chloroform, tetrachlórmetan, toxiny muchomůrky zelené)

V literatuře najdeme i další dělení hyperbilirubinemií, např. **podle místa vzniku hyperbilirubinémie na úrovni buněčných organel.** Konjugace bilirubinu nastává na *jaterních mikrozomech*, pokud tedy dochází k poruše v metabolismu bilirubinu před jeho konjugací, dochází k typické nekonjugované hyperbilirubinemii (která ovšem může nastat i z jiných příčin, např. při snížení biotransformace bilirubinu střevní mikroflórou aj.). Pokud je porucha v metabolismu bilirubinu až za místem konjugace bilirubinu, za mikrozomy, dochází k hyperbilirubinemii konjugované. Kombinací obou typů vzniká smíšená hyperbilirubinémie. Jak vidno, je toto dělení prakticky totožné s předcházejícím typem dělení.

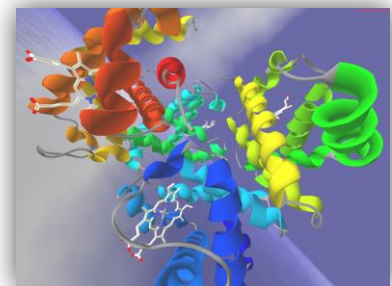
**Poruchy metabolismu bilirubinu a z toho vyplývající hyperbilirubinémie**

Premikrosomální hyperbilirubinémie	Postmikrosomální hyperbilirubinémie	Smíšené hyperbilirubinémie
nadprodukce bilirubinu	familiární konjugované hyperbilirubinémie	difuzní poškození jaterní tkáně
porucha vychytávání bilirubinu játry	získané konjugované hyperbilirubinémie sdružené s intrahepatální cholestázou	kombinace příčin pre- a postmikrosomální hyperbilirubinémie
porucha konjugace bilirubinu	získané konjugované hyperbilirubinémie sdružené s extrahepatální cholestázou porucha střevního metabolismu bilirubinu	

(Libor Víték, *Bilirubin a interní choroby, Význam pro kliniku a praxi*, GRADA Publishing, a.s., 2009, ISBN 978-80-247-2351-8)  
(Libor Víték, prof. MUDr. Ph.D., MBA)

## Kontrolní otázky

- 1 Formulujte průběh dvou základních reakcí pro stanovení glukosy.
- 2 Uvědomte si, jaké jsou dva principy amperometrického stanovení glukosy a jaký je mezi nimi rozdíl.
- 3 Znáte nějaké zástupce (přístroj) pro POCT v rámci měření glukosy?
- 4 Jaký význam má glukóza pro organismus? Co se dá z naměřených (sérových) hodnot koncentrace glukosy vyvodit?
- 5 Kde, jak a proč se tvoří v těle močovina? Je tomu tak u všech živočichů?
- 6 Enzymová metoda na stanovení močoviny obsahuje dva enzymy. Které to jsou a co katalyzují?
- 7 Co říká výsledek stanovení (sérové) močoviny?
- 8 Jaký je princip stanovení kreatininu metodou podle M. Jaffé?
- 9 Co je (obecně) velkou nevýhodou Jaffého metody?
- 10 Co to je a k čemu slouží kreatininová clearance? Jaké všechny údaje potřebujete pro výpočet korigované kreatininové clearance? Za jakých podmínek výpočty neplatí?
- 11 Dá se odhadnout glomerulární filtrace jinak?
- 12 Je kyselina močová pouze odpadním produktem nebo má i nějaký fyziologický význam?
- 13 Jaký je princip enzymového stanovení kyseliny močové?
- 14 Existují stavy z nadbytku či nedostatku kyseliny močové?
- 15 Jak se stanovují aminokyseliny?
- 16 Jak se dělí poruchy metabolismu aminokyselin? Uveďte příklady!
- 17 Co jsou to dědičné metabolické poruchy?
- 18 Co jsou to porfyriny? Jaké mají vlastnosti?
- 19 Kde (v přírodě) se porfyriny uplatňují?
- 20 Co jsou to porfyrie?
- 21 Jaká je metabolická cesta hemu?
- 22 Co je to bilirubin, v jakých formách existuje a jak a kde vzniká? Je vám jasný rozdíl mezi přímým, konjugovaným, nepřímým a celkovým bilirubinem? A co vztah k mikrosomům?
- 23 Uvědomte si rozdílnost principů různých metod pro stanovení bilirubinu. Zkuste je formulovat.
- 24 Uvědomte si principy dělení (typů) hyperbilirubinemií. Zkuste hyperbilirubinemie rozdělit podle různých hledisek. Svě závěry konzultujte se schématem metabolismu bilirubinu.
- 25 Je každá hyperbilirubinemie provázena žloutenkou?



Umělecké ztvárnění molekuly hemoglobinu, molekuly hemu jsou tentokrát vyvedeny bíle.  
<http://www.komsta.net/chemwalls/hemoglobin.jpg>

## OBSAH:

Glukóza, látky s nebiřkovinným dusíkem a porfyriny .....	1
Sacharidy .....	1
Glukóza.....	1
Metody stanovení glukózy.....	1
Klinické poznámky.....	4
Dusíkaté látky nebiřkovinné povahy.....	5
Močovina.....	5
Metody stanovení močoviny .....	6
Klinické poznámky.....	7
Kreatin a kreatinin .....	8
Metody stanovení kreatininu .....	9
UV test.....	13
Klinické poznámky.....	13
Clearance endogenního kreatininu .....	14
Kyselina močová.....	17
Metody stanovení .....	18
Klinické poznámky.....	19
Některé další dusíkaté látky .....	19
Amoniak .....	19
Metody stanovení .....	19
Aminokyseliny .....	20
Metody stanovení aminokyselin .....	21
Poruchy metabolismu aminokyselin a jejich příčiny .....	21
Dědičné metabolické poruchy.....	23
Principy laboratorní diagnostiky dědičných poruch metabolismu .....	24
Ostatní látky s nebiřkovinným dusíkem.....	25
Porfyriny, hemoglobin, bilirubin .....	25
Porfyriny.....	25
Klinické poznámky .....	25
Hemoglobin.....	28
Bilirubin .....	29
Metody stanovení bilirubinu.....	31
Klinické poznámky.....	34
Kontrolní otázky .....	36