

Biochemické metody využívané v lékařství 2.

V hlavním článku (na str. 73–76 tohoto čísla Živy) jsme se seznámili se základním vyšetřením vzorku krve, zde budeme pokračovat popisem vyšetření moči i méně obvyklých biologických materiálů, jako jsou stolice, vlasy nebo vydechaný vzduch.

Vyšetření moči

Již od dětského věku se při běžných prohlídkách u lékaře provádí základní chemické vyšetření moči. Je vhodné ho provést do dvou hodin od vymočení, proto probíhá většinou přímo v ambulanci lékaře. Základní vyšetření se provádí pomocí diagnostických proužků, které umožňují hodnotit různý počet analytů, většinou 7–11.

Diagnostický proužek tvoří plastový pásek, na kterém jsou nalepeny plošky z porézního materiálu. Na tyto plošky jsou fixovány reagenty v suchém stavu. Technologicky se na nosnou plastovou vrstvu nejprve umístí absorpční papírová vrstva (do níž se moč nasákne), pak následuje vrstva diagnostická. Pokud jde o vícevrstvou reakci, je třeba nanášet a sušit reagenty postupně, přičemž jednotlivé vrstvy jsou odděleny vrstvou polymeru rozpustnou ve vodě (obr. 1). Proužek se ponoří do vzorku na 1–2 s, při vytahování se přebytečná moč otře o okraj zkumavky nebo opatrně odsaje do buničiny. Po namočení začne tekutina difundovat vrstvami a rozpouští přítomné reagenty. Rozpuštěné činidlo reaguje s analyzovanou látkou za vzniku barevného produktu. Výsledné zbarvení povrchu se odečítá po reakční době stanovené výrobcem (většinou 30–120 s). Proužky je nutné chránit před vlhkostí, nepřímým teplem a světlem a neměly by se mrazit.

V ambulancích nebo doma při samovyšetření se výsledek odečítá zrakem, barva reakční zóny se porovnává s barevnou škálou na obalu proužků. V laboratořích hodnotí intenzitu zbarvení přístroj, a to

reflexním fotometrem. Při měření reflexe je zdrojem světla obvykle LED produkující barevné nebo bílé světlo. Jeho odraz od barevné zóny proužku vede soustavou zrcadel k filtrům a k fotonásobiči signálu. Měří se intenzita záření odraženého od neprůhledné podložky. Hodnotí se poměr intenzity dopadajícího světla a světla odraženého od barevné plochy.

Hodnocené analyty

● **pH moči** určujeme pomocí reagenčního políčka, které obsahuje směsný indikátor, např. bromtymolovou modř, fenolftalein a metylovou červeň. Prolínáním barev těchto indikátorů vzniká široké spektrum barevných odstínů – od oranžové pro kyselou moč (pH nižší než 5) přes žlutou, zelenou až k modré pro alkalickou moč (s krajní hodnotou pH 8). Kyselost moči můžeme ovlivnit i pouhou stravou, vyšší podíl masa vede ke kyslejší moči, naopak vegetariáni jí mají zásaditější. Také přítomnost některých mikroorganismů při močové infekci může vést k posunu k vyššímu pH, takové bakterie mají schopnost štěpit močovinu na čpavek a oxid uhličitý. Kyslejší moč naopak nacházíme u řady vzrostlých metabolických onemocnění, u dekompenzované cukrovky (u pacientů, kterým dosavadní dietní a medikamentózní léčba zatím nepomáhá k normalizaci hodnot glykemie), ale také při dehydrataci a hladovění. Fyziologické pH moči je v rozmezí 5,0 až 6,5.

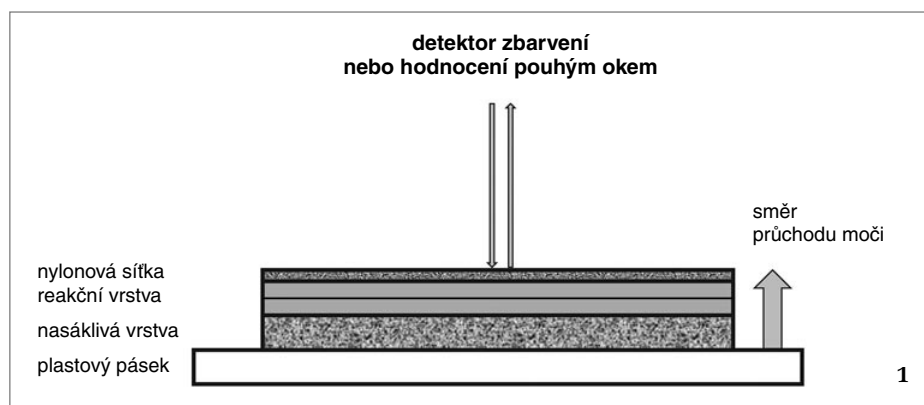
● **Specifická hustota moči** se pomocí diagnostických proužků odhaduje nepřímo podle koncentrace kationtů. Indikační zóna proužku obsahuje vhodný polyelektrolyt

ve funkci iontoměniče a acidobazický indikátor – bromtymolovou modř. Princip diagnostických proužků je založen na výměně kationtů z moči, zejména sodných, draselných a amonných, za vodíkové ionty polyelektrolytu v indikační zóně. Uvolněné vodíkové kationty okyselí slabě pufovaný acidobazický indikátor, který je v alkalické formě. Okyselení je doprovázeno změnou zbarvení. Nevýhodou je, že vyšetření diagnostickými proužky nebere v úvahu látky neelektrolytové povahy, jako jsou glukóza, bílkoviny, močovina nebo kreatinin. Za fyziologických podmínek se hustota ranní moči pohybuje v rozmezí 1,015–1,025 kg/l. Zpravidla platí, že čím je větší objem moči, tím je její hustota nižší (zředění) a naopak při menším objemu moči (koncentrovaná moč) je vyšší. Z tohoto pravidla ale vybočují stavy, při nichž dochází k osmotické diuréze, např. při cukrovce je objem moči větší s vyšší specifickou hmotností (glukóza, které je v moči zvýšené množství, na sebe váže vodu, tu pak ledviny nedokážou z primární moči vstřebat zpět).

● **Princip stanovení bílkovin** (proteinurie) pomocí diagnostických proužků je založen na tzv. bílkovinné chybě acidobazického indikátoru. Tyto indikátory při určitém pH mění svou barvu – při pH nižším než 3,5 jsou žluté, při vyšším jsou zelené až modré. V reakční zóně testovacího proužku je kromě indikátoru i pufr, který udržuje pH v rozmezí 3,0 až 3,5 (výrazně nižší než pH moči), a indikátor má žlutou barvu. Jsou-li ve vzorku bílkoviny, naváží se na indikátor. Tím změní jeho vlastnosti – přechodová oblast se posune směrem ke kyslejšímu pH. Znamená to, že při uvedeném konstantním pH mezi 3,0 až 3,5 bude mít indikátor s navázanou bílkovinou zelenou barvu, jako kdyby byl v alkaličtějším prostředí. Intenzita zbarvení závisí na koncentraci bílkoviny, kolísá od zelené až po modrou. U výrazně alkalických močí (pH nad 8) nebo u moči s vysokou specifickou hustotou může test dávat falešně pozitivní výsledky (dojde k vyčerpání pufru v reakční zóně), stejně tak při kontaminaci odběrové nádoby dezinfekčními prostředky. Určitou nevýhodou testovacích proužků je jejich rozdílná citlivost vůči různým bílkovinám. Nejcitlivější jsou k albuminu – nejvýrazněji zastoupené bílkovině v krvi. Pokud při orientačním vyšetření proužkem vyvine podezření na proteinurii, vždy doplňujeme vyšetření v laboratoři klasickými chemickými metodami ve vzorku z 24hodinového sběru moči.

● **Glukózu** v moči (glykosurii) diagnostikujeme pomocí enzymových reakcí s glukózaoxidázou a peroxidázou, popsanych blíže v článku na str. 73–76. Poslední reakcí je přeměna chromogenu na barevný produkt. Světlo žluté zbarvení reakční plošky se při pozitivitě mění na modrozelené. Test je specifický pro D-glukózu, jiné cukry neposkytují pozitivní reakci. Vysoké koncentrace redukujících látek, jako je vitamín C

1 Konstrukční řešení zóny močového proužku. Na plastový pásek jsou postupně nanášeny absorpční a diagnostická vrstva. Po uplynutí stanovené doby od namočení proužku do moči se odečítá zbarvení pouhým okem při porovnání se škálou, nebo přístrojově.



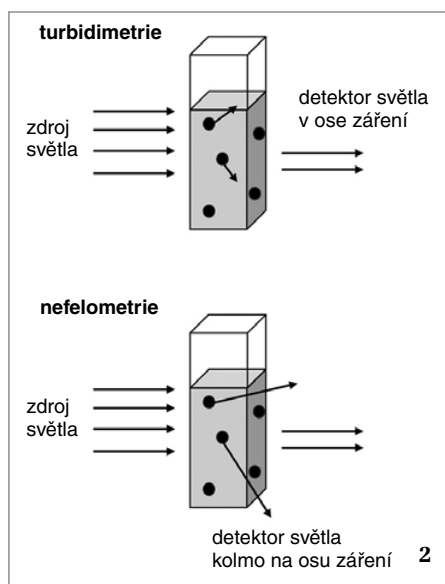
(kyselina askorbová), zpomalují vývin zbarvení a mohou vést k falešně nižším výsledkům. Naopak falešně pozitivní výsledky mohou být způsobeny přítomností peroxidu vodíku nebo oxidačních činidel (některé dezinfekční prostředky) v odběrové nádobě. Diagnostické proužky pro vyšetření moči od některých výrobců mají detekční zónu pro vitamín C, která na možnost falešné negativy upozorní. Glykosurie (přítomnost glukózy v moči) nejčastěji provází vzestup glykemie (hladina glukózy v krvi) nad renální práh glukózy (kolem 10 mmol/l). Glukóza, která se normálně filtruje přes glomerulární membránu (částečně propustnou strukturu v ledvinném glomerulu, propouští do moči jen některé látky na základě jejich velikosti a elektrického náboje), je v primární moči v tak vysoké koncentraci, že nestačí být resorbována v tubulech, tedy vstřebána zpět do krve, a dostává se do definitivní moči.

● Průkaz **ketolátek** je založen na reakcích kyseliny acetoctové a acetonu s nitroprusidem sodným v alkalickém prostředí, kdy vzniká červenofialové zbarvený komplex. Bohužel kyselina β -hydroxymáselná (nejhojněji zastoupená ketolátka) reakci neposkytuje, a proto negativní výsledek ketoacidózu zcela nevylučuje. Stanovení ketolátek v moči má význam především u diabetiků. U správně léčeného diabetika ketolátky v moči nenacházíme. Jejich přítomnost svědčí pro metabolickou ketoacidózu a je provázena hyperglykemií. Malé množství ketolátek v moči se může objevit při hladovění, redukčních dietách a v těhotenství.

● Průkaz **bilirubinu a urobilinogenu** (což jsou látky, které v těle vznikají při odbourávání hemu – červeného krevního barviva) v moči pomocí diagnostických proužků, je založen na azokopulačních reakcích, při nichž vzniká růžové až růžovočervené barvivo. Při těchto reakcích se mění trojná vazba dvou dusíků na dvojnou, zbývající vazba pak váže aromatickou sloučeninu. Nižší až falešně negativní výsledky mohou být opět způsobeny vysokými koncentracemi vitamínu C. Vzorek moči je také nutno chránit před přímým slunečním světlem, které vyvolává oxidaci bilirubinu s následným falešně negativním nálezem. Zvýšené hodnoty nacházíme při žloutence a dalších jaterních chorobách.

● K průkazu **červených krvinek a hemoglobinu** v moči využíváme schopnosti hemoglobinu katalyzovat (pseudoperoxidázovou) reakci, při níž dochází ke změně barvy indikátoru, nejčastěji tetrametylbenzidinu na benzidinovou modř. Celé červené krvinky vidíme na diagnostickém proužku jako jednotlivé modré tečky, z rozpadlých krvinek vylitý hemoglobin reaguje s celým polem zóny proužku. Nález celých červených krvinek provází infekce močových cest, nádory v dané oblasti a přítomnost močových kamenů. Hemoglobinurie svědčí pro rozpad červených krvinek buď ještě v cévách pacienta, nebo až v definitivní moči, např. při její nízké specifické hmotnosti. Stejnou reakci vyvolá i myoglobin při rozsáhlém poškození svalů.

● Chemické stanovení přítomnosti **bílých krvinek** (leukocytů) je založeno na průkazu jiných enzymů – esteráz, které jsou hojné v granulocytech. Tyto esterázy katalyzují hydrolyzu esteru indoxylu na volný indo-



2 Laboratorní metody pro stanovení zákalu. Při turbidimetrickém stanovení měříme množství světla prošlého zakaleným roztokem v ose záření (nahore), při nefelometrickém měření zákalu detekujeme světlo rozptýlené, např. ve směru kolmém na osu záření (dole).

xyl, který pak reaguje se stabilní diazoniovou solí na příslušné azobarvivo. Při negativní reakci je zóna zbarvena krémově žlutě, při pozitivní reakci se mění do růžového až fialového odstínu. Leukocyturie je příznakem zánětu ledvin nebo močových cest.

● **Dusitany** se v moči stanovují jako nepřímá známka bakteriurie. Normální moč je v měřitelných koncentracích neobsahuje. Některé, především gramnegativní bakterie, jako jsou *Escherichia coli*, rody *Proteus* a *Klebsiella*, stafylokoky a další, mají schopnost redukovat dusičnany přítomné v moči na dusitany. Diagnostické proužky využívají dusitanů v Griessově reakci, jejíž podstatou je diazotace sulfanilamidu dusitany ve vzorku za vzniku diazoniové soli. Následuje azokopulace vzniklé soli s kopulačním činidlem za vývinu růžového až fialového zbarvení. Vyšetření moči na dusitany se provádí v první ranní moči, což zaručuje dostatečně dlouhou dobu nezbytnou pro bakteriální redukci dusičnanů na dusitany v moči potvrzuje bakteriurii, zatímco negativní ji nevylučuje. Pokud je test na přítomnost bílých krvinek nebo na dusitany pozitivní, vždy se doplňuje mikrobiologické vyšetření moči.

● Ze vzorku moči můžeme pomocí specifických, většinou imunochemických reakcí orientačně vyšetřit i přítomnost dalších látek. Hojně se toho využívá např. při samovyšetření na začátku těhotenství, kdy v moči roste koncentrace lidského choriového gonadotropinu, nebo ve sportovní medicíně, kdy se ve vzorku moči hledá přítomnost nedovolených látek a hormonů.

Testovací kazeta nebo proužek na přítomnost **lidského choriového gonadotropinu** (hCG) v moči pracuje na principu sendvičové imunochemické reakce. Membrána je prosycena myšími protilátkami proti hCG v testovací oblasti a protilátkami proti myší bílkovině v kontrolní oblasti. Během testování vzorek moči nejprve reaguje s ba-

revním konjugátem (myší protilátka proti hCG, koloidní zlatý konjugát). Směs pak migruje nahoru po membráně, aby reagovala s protilátkami proti hCG v testovací oblasti a vytvořila červenou linku. Přítomnost červené linky značí pozitivní výsledek, nepřítomnost znamená negativní výsledek. Bez ohledu na detekci hCG v testovací zóně směs pokračuje v migraci přes kontrolní oblast, kde se vždy objeví červená linka. Její přítomnost slouží k ověření funkčnosti a správného provedení testu.

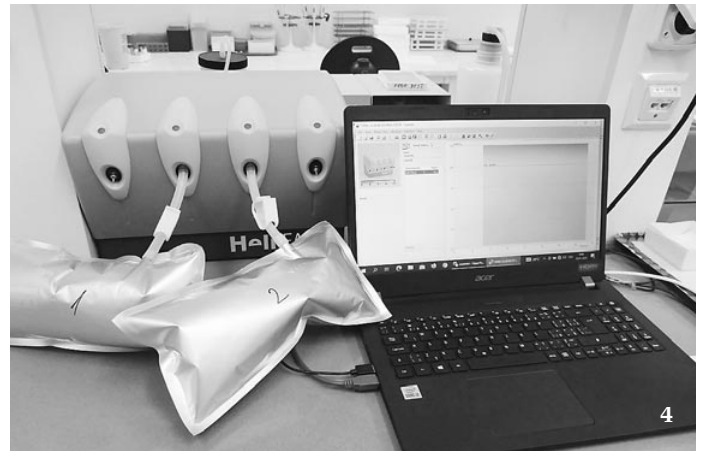
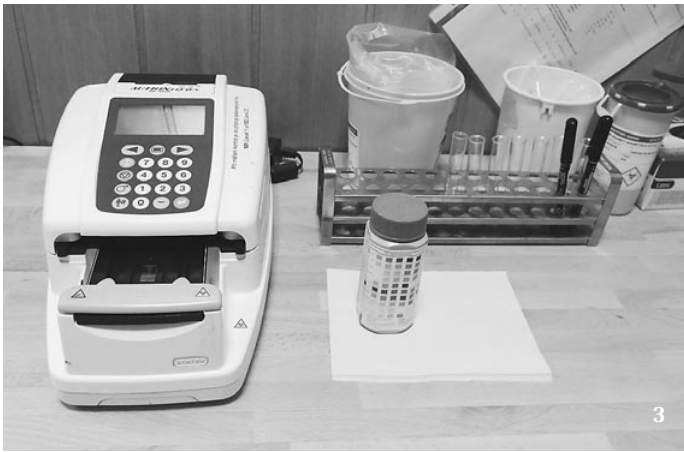
Na podobném principu imunochemické reakce pracují i testy na **virové infekce**, jako jsou chřipky nebo covid-19, prováděné většinou ze slin nebo výtěru z nosu či nosohltanu.

● Kombinací vyšetření analytu v moči a krvi můžeme spočítat jeho tzv. clearance. Využíváme toho např. pro orientační posouzení funkce ledvin. K tomuto účelu stanovujeme v krvi i moči kreatinin, případně v kombinaci s močovinou a albuminem, nebo bílkovinu cystatin C. Podle typu vyšetření se analýza provádí z jednotlivého vzorku moči nebo z moči sbírané 24 hodin. Hodnoty je možné vztáhnout na tělesný povrch (ten lze vypočítat z výšky a hmotnosti a odráží, jak je jedinec mohutný) a zohlednit věk a pohlaví vyšetřované osoby. Klasickou clearance kreatininu vypočteme podle vzorce koncentrace kreatininu v moči \times objem moči za 24 hodin / koncentrace kreatininu v krvi.

Vyšetření stolice, slin a vlasů

Součástí preventivního vyšetření u osob starších 50 let je rovněž pátrání po přítomnosti krve ve stolici. Provádí se v rámci screeningu nádorů tlustého střeva. Dnes se doporučuje provádět vyšetření kvantitativní, tedy určení množství červeného krevního barviva (hemoglobinu) vztaženého na gram stolice. I malé analyzátoři často využívají imunoturbidimetrickou detekci míry zákalu vzorku po reakci se specifickou protilátkou. Jaký je rozdíl oproti spektrofotometrii popsané již v článku na str. 73–76? Při spektrofotometrii měříme intenzitu zbarvení čirého roztoku při určité vlnové délce v kyvetě o známé délce. U turbidimetrie pracujeme se vzorkem zakaleným, na částicích dochází k rozptylu světla do různých směrů, analyzátor měří množství světla prošlého vzorkem. Větší zákal tak znamená menší množství prošlého světla a odpovídá vyšší koncentraci zkoumaného analytu. Také je možné snímat pod určitým úhlem světlo rozptýlené, takovému principu stanovení se pak říká nefelometrie (obr. 2).

V případech pátrání po krvi ve stolici používáme specifickou protilátku proti bílkovině části hemoglobinu, která reaguje s úseky typickými pouze pro člověka. Vyšetření proto nevyžaduje žádnou dietní přípravu s vynecháním masa zvířat. Tato protilátka je navázána na latexové mikrokuličky. Pokud je hemoglobin ve vzorku přítomen, protilátka s ním reaguje, dojde k „zesíťování“ kuliček a zákal vzorku v kyvetě vzroste. Když krev ve stolici není, roztok zůstane čirý. Nález patologického množství krve ve stolici vede k doporučení podstoupit endoskopické vyšetření tlustého střeva – kolonoskopii. Populační plošný screening kolorektálního karcino-



mu již v České republice přispívá k časnější diagnóze přednádorových a časných nádorových změn na tlustém střevě a ke snížení úmrtnosti na toto onemocnění.

Ze stolice můžeme, většinou pomocí různých imunochemických metod, zjistit orientačně informace o produkci enzymů slinivkou břišní (stanovení pankreatické elastázy), infekci žaludku a dvanáctníku bakterií *Helicobacter pylori* (specifické povrchové antigeny), která se podílí na tvorbě žaludečních vředů a je zařazena mezi karcinogeny, diagnostikovat a monitorovat průběh idiopatických (neznámého původu nebo autoimunitních) střevních zánětů (kalprotektin) nebo sledovat dodržování bezlepkové diety (gliadin a jeho štěpné produkty).

Z dalších, méně obvyklých biologických materiálů bych zmínila sliny, vhodné pro neinvazivní měření aktuální míry stresu (hormon kortizol), nebo vlasy pro vyhodnocení nakumulovaného stresu s možností jít až měsíce zpět (1 cm vlasů odpovídá přibližně jednomu měsíci jejich růstu a měří se opět kortizol).

Analýza vydechaného vzduchu

Posledním biologickým materiálem, který uvedeme, je vydechaný vzduch. Všichni známe jednoduché alkoholtestery při policejních silničních kontrolách, ale ve vydechaném vzduchu je možné detekovat více než 1 000 těkavých organických látek (VOC – Volatile Organic Compounds)

3 Močový analyzátor – přístroj hodnotí zbarvení moči a jeho intenzitu v jednotlivých zónách diagnostického proužku reflektometricky.

4 Analyzátor vydechaného vzduchu určuje poměr $^{12}\text{CO}_2$ a $^{13}\text{CO}_2$ pomocí infračervené spektroskopie. Blíže v textu. Všechny orig. a snímky: Z. Vaníčková

v koncentracích ppm (parts per million, 10^{-6}) až ppt (parts per trillion, 10^{-12}). V klinických laboratořích se používají analyzátoři vydechaného vzduchu schopné odlišit molekuly oxidu uhličitýho s uhlíkem ^{12}C a ^{13}C (stabilní izotop uhlíku se zastoupením přibližně 1,1 %). Většinou jde o detekci v infračerveném spektru (NDIRS – Non-dispersive Infrared Spectroscopy), využívající rozdílná absorpční maxima v oblasti kolem 4 350 nm, s měřením na optoakustickém detektoru. Takto můžeme snadno ověřit přítomnost infekce *H. pylori* v žaludku, kde využíváme schopnost této bakterie štěpit močovinu. Pacient nadýchá vstupní vzorek vzduchu a vypije roztok močoviny značené izotopem uhlíku ^{13}C . Po 30 minutách nadýchá druhý vzorek, a pak porovnáme poměr $^{12}\text{CO}_2$ a $^{13}\text{CO}_2$ s poměrem těchto plynů ve vstupním a následném vzorku. Pokud dojde ke štěpení močoviny, vzroste množství $^{13}\text{CO}_2$ ve vydechaném vzduchu, tím prokážeme přítomnost infekce.

Další možností je použití přirozených substrátů, jako jsou glukóza, laktóza nebo

fruktóza. Ve vydechaném vzduchu měříme vodík, metan a oxid uhličitý. Vodík a metan nejsou produktem lidských buněk, ale vznikají činností bakterií v našem trávicím traktu, především tlustém střevě. Pomocí roztoku glukózy testujeme přítomnost bakteriálního přerůstání v tenkém střevě, kdy ke vzestupu jednoho nebo obou plynů dojde v prvních dvou hodinách po jejím podání. Naopak při testování malabsorpce laktózy nebo fruktózy očekáváme vzestup až po více než dvou hodinách po podání cukerného roztoku, pokud se podané cukry nevstřebaly v tenkém střevě a dochází k jejich trávení až bakteriemi ve střevě tlustém. Detekce metanu probíhá většinou pomocí infračervené spektroskopie, vodíku pomocí elektrochemického detektoru.

Závěrem

Při vyšetření nejruznějšího biologického materiálu vydává laboratoř žádajícímu lékaři výsledky. Ty jsou nedílnou součástí jeho rozhodování o zdraví nebo povaze nemoci pacienta. Aby byly výsledky dobře posouditelné, je nutná spolupráce vyšetřované osoby (např. dodržení doby lačnění před odběrem), rychlý transport vzorků v určených podmínkách, správná laboratorní práce a interpretace výsledků.

Použité internetové zdroje a doporučenou literaturu uvádíme na webu Živý.



ARACHNE

Letní biologické soustředění pro středoškoláky



Jsi středoškolák lačnící po nevšedních biologických zážitcích a chceš si vyzkoušet vědu na vlastní kůži?

POTOM JE ARACHNE TÍM, CO HLEDÁŠ!

Čtrnáct dní nabitých odbornými přednáškami, experimenty, terénními exkurzemi a v neposlední řadě mořem zábavy.

POJEĎ S NÁMI!

Přihlášku najdeš na www.arach.cz

