Biochemie – Praktický zápočet

Tomáš P. Mirchi
2017, v1.0

Stanovení koncentrace hemoglobinu v krvi

Oxidace hemoglobinu na methemoglobin:

$HbFe^{II}$ + $[Fe^{III}(CN)_6]^{3-}$ → $HbFe^{III}$ + $[Fe^{II}(CN)_6]^{4-}$

Hemoglobin **Methemoglobin**

Přeměna methemoglobinu na kyanmethemoglobin:

$HbFe^{III}$ + CN^- → $HbFe^{III}CN$

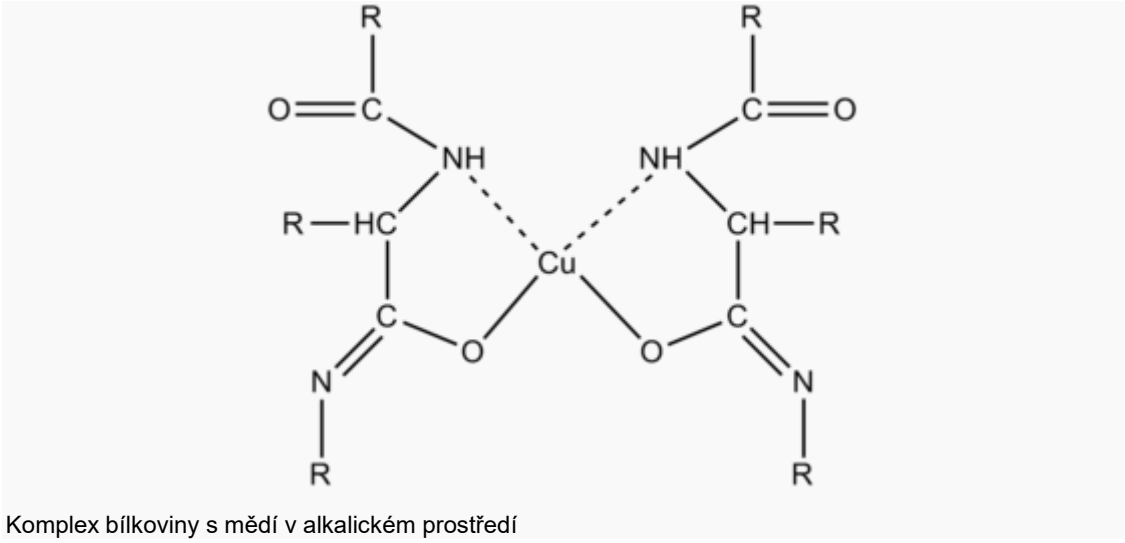
Methemoglobin **Kyanmethemoglobin**

Fotometrické stanovení je založeno na oxidaci dvojmocného železa v hemoglobinu hexakyanoželezitanem draselným na trojmocné železo. Vzniklý methemoglobin se v další reakci s kyanidem draselným přeměňuje na velmi stálý kyanmethemoglobin s jediným širokým absorpčním maximem ve viditelné oblasti při 540 nm.

Hodnocení: Referenční rozmezí koncentrace hemoglobinu v krvi(B hemoglobin)pro dospělého muže je 130–180 g/l a pro ženu 120–160 g/l.

1. Stanovení koncentrace celkové bílkoviny v séru

Celkovou bílkovinu v séru stanovujeme **biuretovou reakcí**



Komplex bílkoviny s mědí v alkalickém prostředí

V ***alkalickém prostředí v přítomnosti měďnatých solí*** dávají bílkoviny fialové zbarvení, vhodné k fotometrickému stanovení. Zjednodušeně se dá říci, že se vytvářejí komplexní sloučeniny Cu^{2+} s ionty

peptidových vazeb. Vzniklý komplex silně absorbuje světlo v oblasti 540–560 nm. Intenzita zbarvení komplexu se měří fotometricky a je přímo úměrná koncentraci bílkovin. Biuretovou reakci obecně poskytují látky obsahující v molekule alespoň dvě peptidové vazby (-CO-NH-) nebo dvě skupiny -CO-NH_2. Reakce tedy není specifická pouze pro bílkoviny. Nejjednodušší sloučeninou reagující s měďnatými solemi v alkalickém prostředí je **biuret** obsahující dvě peptidové vazby. Aminokyseliny a dipeptidy nereagují.

Součástí biuretového činidla je ***síran měďnatý***, který poskytuje Cu^{2+} pro tvorbu komplexů s peptidovými vazbami, a alkalizující složka (hydroxid), který převede peptidovou vazbu na enolformu a umožní tak účast atomů kyslíku v komplexu. Dalšími složkami činidla jsou ***vinan draselno-sodný***, který zabraňuje jako komplexotvorná látka srážení Cu^{2+} na $Cu(OH)_2$, a ***jodid draselný***, který chrání Cu^{2+} před autoredukcí. Citlivost biuretové metody se pohybuje kolem 1–10 g bílkoviny/l.

Referenční rozmezí: Koncentrace celkové bílkoviny v séru (S-celková bílkovina): **65–85 g/l**

2. Stanovení koncentrace celkového bilirubinu v séru

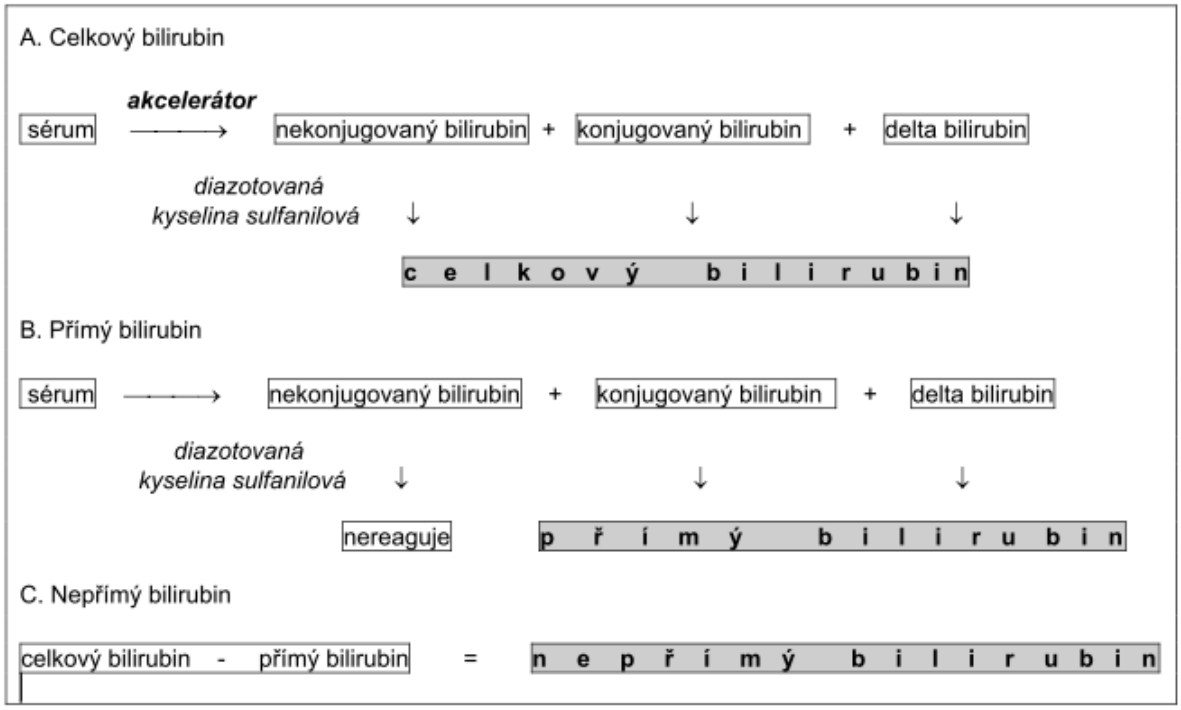
Téměř všechny metody používané ke stanovení bilirubinu jsou založeny na **azokopulační reakci** bilirubinu s některou **diazoniovou solí**. Nejčastěji se používá diazotovaná **kyselina sulfanilová**, která vzniká reakcí kyseliny sulfanilové s dusitanem sodným v nadbytku kyseliny chlorovodíkové - van den Berghova diazoreakce. Bilirubin reaguje s diazoniovými solemi za vzniku intenzivně zbarvených azosloučenin vhodných k fotometrickému stanovení. V přítomnosti diazotované kyseliny sulfanilové se bilirubin štěpí na dvě molekuly azobilirubinu. Vzniklý azobilirubin se chová jako acidobazický indikátor s několika barevnými přechody, ve slabě kyselém prostředí je červený a v silně alkalickém modrý.

Konjugovaný bilirubin reaguje s diazotovanou kyselinou sulfanilovou přímo a rychle - přímá van den Berghova reakce . Tato frakce bilirubinu se označuje jako **„přímý" bilirubin**.

Nekonjugovaný bilirubin, který je špatně rozpustný ve vodě a je nekovalentně vázán na albumin, reaguje s diazočinidlem podstatně pomaleji a zbarvení se vyvíjí až po přidání tzv. **akcelerátoru** - nepřímá van den Berghova reakce. Jako akcelerátoru se obvykle využívají alkoholy (methanol, ethanol) či jiné látky (benzoan sodný, kofein, močovina). Akcelerátor usnadňuje reakci s diazočinidlem tím, že napomáhá uvolnění bilirubinu z vazby na albumin a rozrušením vnitřních vodíkových můstků činí bilirubin rozpustnější. Frakce bilirubinu, která vyžaduje akcelerátor, je označována jako **„nepřímý" bilirubin**.

V přítomnosti akcelerátoru reagují všechny formy bilirubinu. Tímto způsobem stanovíme celkový bilirubin. Množství nekonjugovaného (nepřímého) bilirubinu můžeme vypočítat jako rozdíl celkového a konjugovaného bilirubinu. Fotometrické stanovení celkového bilirubinu je vhodné provádět v alkalické oblasti, kde je nejcitlivější a nejméně rušeno jinými látkami obsaženými v krevním séru. Zásadité prostředí je zajišťováno silně alkalickým vinanem.

V současnosti je doporučenou rutinní metodou modifikace dle **Jendrassik-Grófa**, využívající jako akcelerátor kofein a benzoan sodný. Pro stanovení celkového bilirubinu lze použít i přímou spektrofotometrii, neboť absorbance séra při 454 nm je úměrná koncentraci bilirubinu. Využívá se toho např. při stanovení bilirubinu v některých biologických tekutinách jako je plodová voda nebo mozkomíšní mok. Existuje ještě orientační způsob stanovení bilirubinu, tzv. transkutánní ikterometrie, která našla uplatnění v neonatologii při vyšetřování novorozeneckých žloutenek. Pro měření se používá ruční přístroj bilirubinometr, který se přikládá na čelo novorozence. Bilirubin je silně fotosenzitivní, proto je nutno vzorky uchovávat ve tmě a zpracovávat co nejdříve



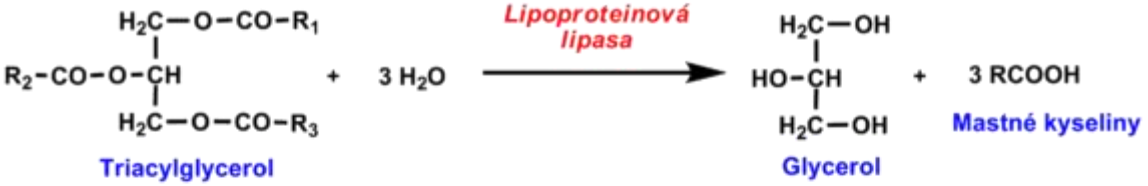
Fyziologické hodnoty: Koncentrace celkového bilirubinu v séru (fS - celkový bilirubin): do 17 µmol/l

3. Stanovení koncentrace triacylglycerolů v séru

Doporučené rutinní metody stanovení triacylglycerolů využívají několika enzymových reakcí.

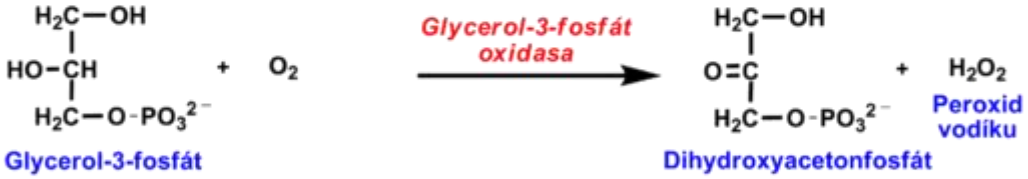
- Lipoproteinová lipáza katalyzuje hydrolýzu triacylglycerolů na glycerol a mastné kyseliny.
- Uvolněný glycerol se převádí působením glycerolkinázy v přítomnosti ATP na glycerol-3-fosfát, který je pomocí glycerol-3-fosfátoxidázy oxidován na dihydroxyacetonfosfát.
- Současně vzniklý peroxid vodíku je využíván v další reakci katalyzované peroxidázou k oxidační kopulaci 4-aminoantipyrinu s derivátem fenolu. Vzniká chinoniminové barvivo, jehož absorbance se odečítá.

1. Hydrolýza triacylglycerolů

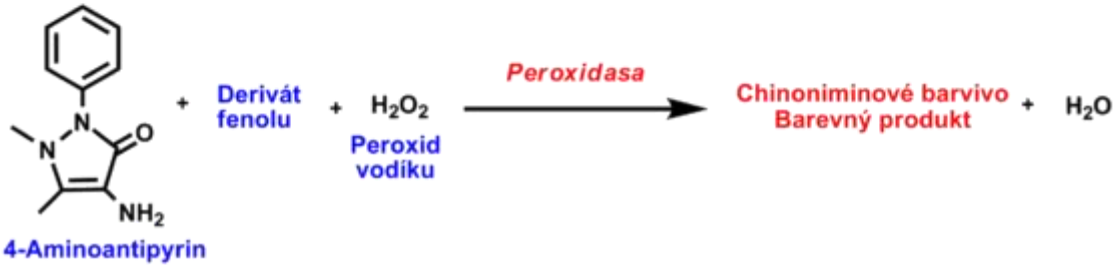


2. Fosforylace glycerolu

3. Oxidace glycerol-3-fosfátu a vznik peroxidu vodíku



4. Oxidační kopulace a vnik barevného produktu



Hodnocení

- Zvýšená koncentrace triacylglycerolů je nezávislým rizikovým faktorem aterosklerózy. Česká a evropská doporučení považují za normální koncentraci triacylglycerolů v séru hodnotu ***< 1,7 mmol/l***.
- Koncentrace TG > 1,7 mmol/l (nalačno) je považována za ukazatel zvýšeného kardiovaskulárního rizika. Vyšší triacylglyceroly bývají spojené se sníženými hladinami HDL a předpovídají vysoké koncentrace remnantů bohatých na cholesterol a malých hustých částic LDL typu B.
- Koncentrace triacylglycerolů se zvyšuje během 2 hodin po jídle a maxima dosahuje za 4–6 hodin, proto musí být krev na stanovení triacylglycerolů odebírána po 12–14 hodinovém lačnění. Vzorky plazmy s koncentrací TG vyšší než 3,4 mmol/l opaleskují, při hladinách TG nad 11,3 mmol/l jsou přítomny chylomikrony a plazma je mléčně zakalená.

- Při terapii se klade velký důraz na dietu s nízkým obsahem tuků a cukrů, na zvýšenou tělesnou aktivitu, dostatek antioxidantů v potravě a na celkovou hypolipidemickou léčbu.

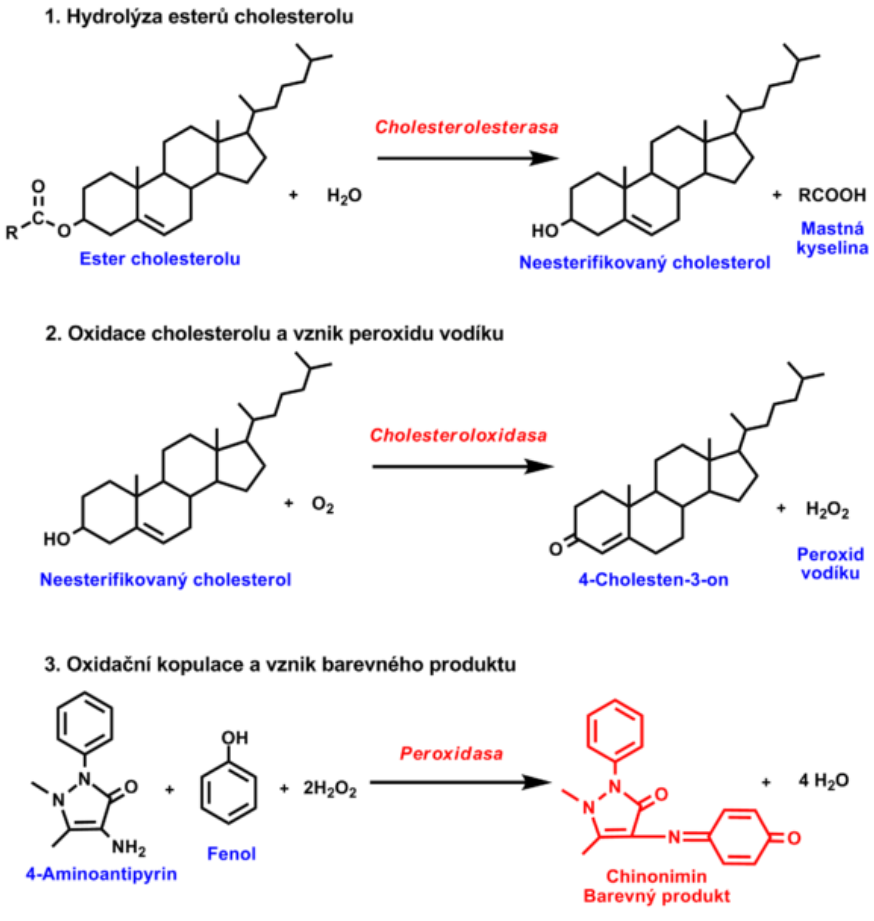
Hodnotící meze: Koncentrace triacylglycerolů v séru (fS-triacylglyceroly): 0,45–1,7 mmol/l

4. Stanovení koncentrace celkového cholesterolu v séru

Princip

Cholesterol je v krevní plazmě transportován jako součást lipoproteinů, z největší části ve frakci LDL, méně v HDL a VLDL. Z tohoto cholesterolu jsou přibližně dvě třetiny esterifikovány vyššími mastnými kyselinami, zbytek je neesterifikován.

- Běžně je v séru (plazmě) stanovován **celkový cholesterol**. Proto vlastnímu stanovení celkového cholesterolu předchází hydrolýza esterů cholesterolu na volný cholesterol a mastné kyseliny pomocí enzymu cholesterolesterázy (CE).
- Následuje oxidace neesterifikovaného cholesterolu na 4-cholesten-3-on za současného vzniku peroxidu vodíku v reakci katalyzované cholesteroloxidázou (CHOD).
- Poslední reakce využívá peroxidu vodíku k oxidační kopulaci 4-aminoantipyrinu a fenolu v přítomnosti dalšího enzymu peroxidázy (POD). Vzniká barevný produkt, jehož absorbance je úměrná množství cholesterolu



Hodnocení

- Se stoupající koncentrací celkového cholesterolu se ***zvyšuje riziko aterosklerózy***. Podle českých a evropských doporučení má být koncentrace celkového cholesterolu **< 5,0 mmol/l**. Celkový cholesterol by měl být stanoven u všech osob nad 18 let v rámci prevence. Vyšetření by mělo být i v případě normálního výsledku t.j. do 5,0 mmol/l opakováno za 5 let.

- Pokud je koncentrace vyšší a dále u nemocných s ischemickou chorobou srdeční a dalších rizikových osob, přistupujeme k podrobnějšímu vyšetření lipidového spektra stanovením LDL- a HDL cholesterolu a triacylglycerolů.

- U pacientů se zvýšeným rizikem kardiovaskulárního onemocnění (např. diabetici) by celkový cholesterol měl být nižší < 4,5 mmol/l a u osob s již manifestním kardiovaskulárním onemocněním dokonce < 4,0 mmol/l.

- Zvýšená koncentrace cholesterolu se dále často nachází u diabetiků nebo u hypotyreózy. Ke snížení koncentrace celkového cholesterolu dochází např. u pokročilých jaterních cirhóz nebo hypertyreózy nebo malnutrici.

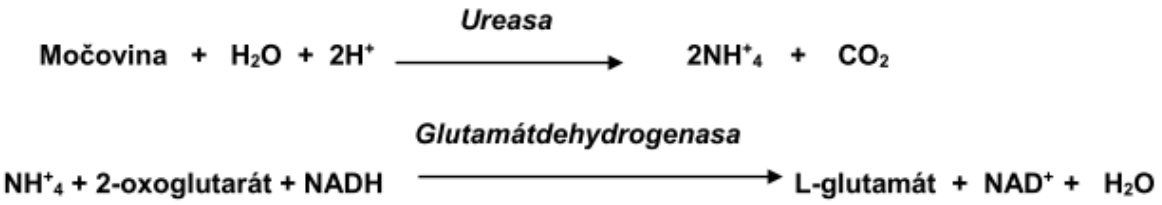
- Je markerem pro celkovou mortalitu a pro KVO rizikovým faktorem. Vztah cholesterolu k celkové mortalitě je nelineární, má tvar písmene J nebo U, který lze vysvětlit mechanismem reverzní kauzality.

Hodnoticí meze

Koncentrace celkového cholesterolu v séru (S-cholesterol celkový): **2,9–5,0 mmol/l**.

5. Stanovení koncentrace močoviny v séru

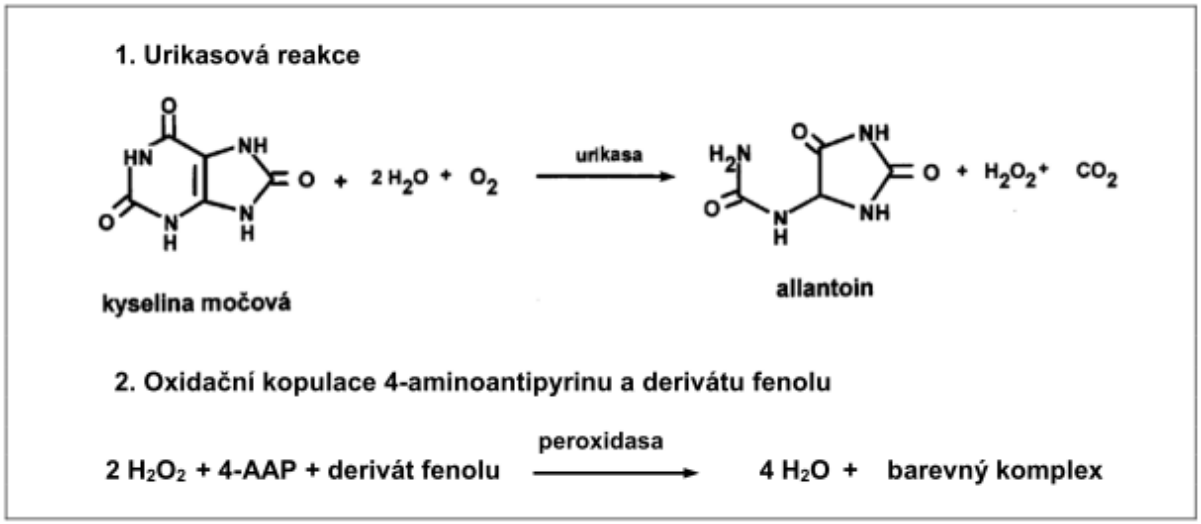
Močovina se v biologických tekutinách stanovuje buď přímo nebo nepřímo jako amoniak. Při nepřímém stanovení je močovina nejprve působením enzymu **ureasy** katalyticky rozštěpena na oxid uhličitý a amoniak, který ve vodném prostředí přechází na amonný ion. Množství vzniklého amoniaku je poté stanoveno **reakcí podle Berthelota**. Amonný ion s chlornanem sodným a fenolem nebo salicylanem za katalýzy nitroprussidu sodného vytváří barevný produkt. Doporučená rutinní metoda využívá pro stanovení amonných iontů vzniklých v ureasové reakci přeměnu α-ketoglutarátu na glutamát. Reakce je katalyzována **glutamátdehydrogensou**, která je spřažena s oxidací NADH na **NAD+ (Warburgův optický test)**.



Močovina v séru dobrým **indikátorem hypoperfuze ledvin** – kromě poklesu glomerulární filtrace se totiž zvýší zpětná resorpce urey v tubulech a její sérová hladina tak roste mnohem rychleji, než např. koncentrace kreatininu.

6. Stanovení koncentrace kyseliny močové v séru

Většina moderních metod na stanovení koncentrace kyseliny močové využívá enzym **urikasu**, která přeměňuje kyselinu močovou na allantoin, peroxid vodíku a oxid uhličitý. Pokles koncentrace kyseliny močové v reakční směsi lze stanovit **přímo měřením úbytku absorbance při 290 – 293 nm**. Tento způsob vychází z rozdílných absorpčních spekter allantoinu a kyseliny močové. Allantoin vznikající v urikasové reakci nevykazuje na rozdíl od kyseliny močové absorpční vrchol při 290 – 293 nm. Jinou možností je **nepřímé stanovení** využívající vznikajícího peroxidu vodíku k další spřažené reakci, katalyzované **peroxidasou**. Při ní **oxidační kopulací** obvykle 4-aminoantipyrinu s vhodným derivátem fenolu [(v našem případě N-ethyl-N-(2-hydroxy-2-sulfopropyl)-m-toluidin)] **vznikne chinoniminové barvivo**, jehož intenzita zbarvení je úměrná koncentraci kyseliny močové ve vzorku. Při stanovení ruší kyselina askorbová. Její vliv je potlačován přítomností askorbátoxidasy v reakční směsi.



Koncentrace kyseliny močové v plazmě závisí na příjmu purinů potravou, intenzitě vlastní tvorby a na jejím vylučování. Klinický význam mají především zvýšené plazmatické koncentrace kyseliny močové.

Hyperurikemie nastává **při nadprodukci nebo při sníženém vylučování kyseliny močové**. Při hyperurikemii může koncentrace urátů přesáhnout jejich rozpustnost.

Nadprodukce kyseliny močové

• S nadprodukcí syntézy purinů de novo spojené se zvýšenou hladinou kyseliny močové se setkáváme u některých **geneticky podmíněných defektů purinového metabolismu** jako je parciální či kompletní **deficit hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasy (Lesch-Nyhanův syndrom)**. Při něm je snížená reutilizace purinových bází, které jsou proto ve zvýšené míře odbourávány na kyselinu močovou. Jiným genetickým defektem vedoucím ke zvýšené tvorbě kyseliny močové je **zvýšená aktivita fosforibosyldifosfátsynthetasy**.

• **Zvýšená tvorba** kyseliny močové doprovází **protinádorovou léčbu** (chemoterapie cytostatiky, ozařování), při níž dochází k intenzivnějšímu rozpadu buněk. Purinové báze uvolňované při degradaci nukleových kyselin se metabolizují na kyselinu močovou. Podobně některá hematologická onemocnění spojená s nadměrnou novotvorbou (polycytemia vera) nebo zvýšeným rozpadem buněk (leukémie, hemolytické anémie) jsou doprovázeny hyperurikemií.

• **Zvýšený příjem stravy bohaté na puriny** (např. vnitřnosti, maso) vede k nadprodukci kyseliny močové. Zdravé ledviny nemusí stačit kompenzovat nadměrnou zátěž kyselinou močovou intenzivnější exkrecí a urikemie potom stoupá.

• Požívání **alkoholu** zvyšuje urikemii tím, že laktát vznikající ve zvýšené míře inhibuje sekreci kyseliny močové ledvinami. Snížené vylučování kyseliny močové je později vystřídáno zvýšenou urikosurií.

Snížené vylučování kyseliny močové

Snížené vylučování kyseliny močové patří mezi častější příčiny hyperurikemie.

• U pacientů s hyperurikemií bývá často snížena tubulární sekrece kyseliny močové; příčina je neznámá.

• Pokles vylučování kyseliny močové ledvinami doprovází stavy spojené se snížením glomerulární filtrací a poruchou funkce tubulů (např. soutěž kyseliny močové o tubulární exkreční mechanismy s laktátem nebo ketokyselinami).

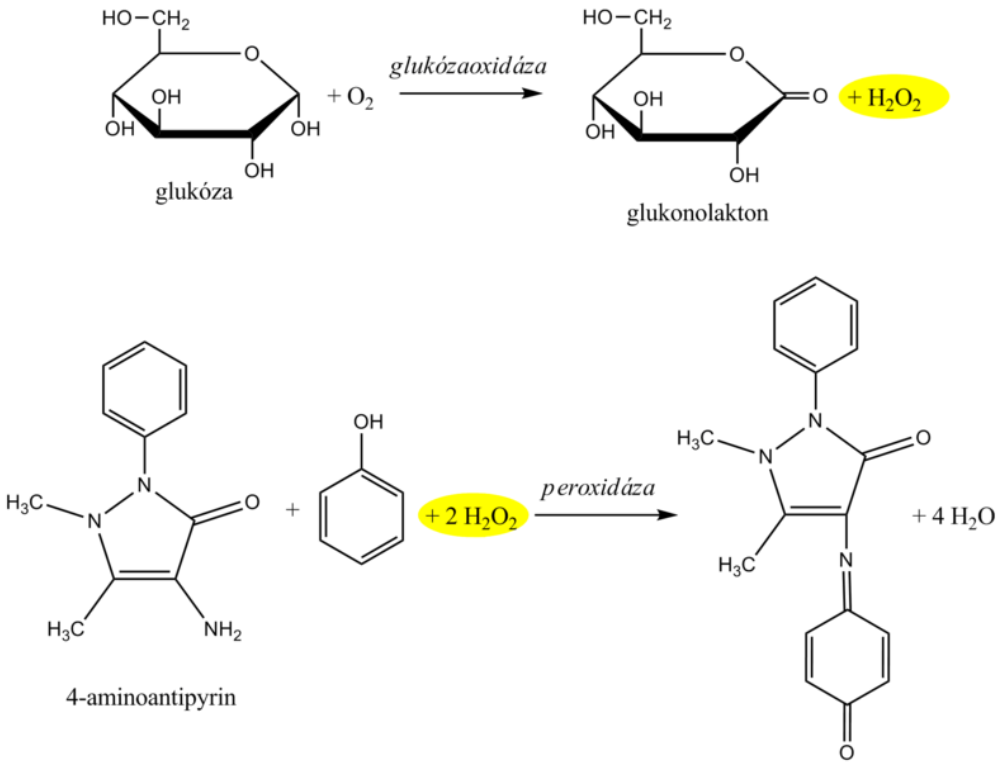
Referenční hodnoty: Koncentrace kyseliny močové v séru (fS-kyselina močová):
ženy 140 – 340 µmol/l
muži 220 – 420 µmol/l

7. Stanovení koncentrace glukózy v séru enzymaticky

Doporučená rutinní metoda využívá *spřažených enzymových reakcí* ***glukózaoxidázy*** *(**GOD**, EC 1.1.3.4) a* ***peroxidázy*** *(**POD**, EC 1.11.1.7)*. V první reakci enzym **glukózaoxidáza** katalyzuje oxidaci glukózy vzdušným kyslíkem za vzniku kyseliny glukonové, která přechází ve vnitřní ester glukonolakton. Je známo, že v roztoku je 36 % glukózy ve formě α-anomeru a 64 % ve formě β-anomeru. GOD je vysoce specifická pro β-D-glukopyranosu. Aby se mohly oxidovat oba anomery, je nutná mutarotace α- na β-

anomer, ke které dojde spontánně v průběhu dostatečně dlouhé inkubace. Jako vedlejší produkt glukózaoxidázové reakce se vytváří ekvimolární množství **peroxidu vodíku**.

V další reakci katalyzované **peroxidázou** reaguje vznikající peroxid vodíku s vhodným chromogenem, který se oxiduje na reaktivní meziprodukt, a ten s další látkou kopuluje na stálé rozpustné barvivo. Příkladem může být oxidační kopulace derivátu fenolu se 4-aminoantipyrinem na červené barvivo, jehož absorbance se po ustálení reakční rovnováhy měří.



8. Stanovení koncentrace vápníku v séru

Referenční metodou pro stanovení celkového kalcia je atomová absorpční spektrofotometrie. Pro rutinní stanovení jsou doporučovány metody založené na **spektrofotometrickém měření barevných komplexů**, které vznikají reakcí komplexotvorných látek s kalciem. Jako komplexotvorné látky se používá o-kresolftalexon, který v alkalickém prostředí s vápenatými ionty poskytuje fialově zbarvený komplex, jehož **intenzita zbarvení je úměrná koncentraci** vápenatých iontů. Jiným používaným komplexotvorným činidlem je arsenaso III.

Stanovení celkového vápníku v krvi patří mezi metody často zatížené poměrně velkou chybou měření. To je dáno tím, že komplexotvorné činidlo použité pro měření nevyváže z krve veškerý vápník – **soutěží** o něj **s plazmatickými bílkovinami** a ostatními chelátory vápníku v krvi. Výraznější odchylky ve složení krve (např. těžší dysproteinemie) může proto vést k falešně nižším či naopak vyšším hodnotám.

9. Stanovení koncentrace železa v séru

Pro stanovení železa v séru se používají kolorimetrické metody, atomová absorpční spektrofotometrie a další speciální techniky. Nejužívanější jsou fotometrické metody, založené na reakci železa s komplexotvornou látkou. Všechny postupy zahrnují následující kroky:

1. Uvolnění Fe^{3+} z vazby na transferin pomocí kyselin nebo tenzidů (např. HCl).
2. Redukce Fe^{3+} na Fe^{2+}, která je nezbytná pro reakci s komplexotvorným činidlem. K redukci se používá např. kyselina askorbová.
3. Reakce Fe^{2+} s komplexotvorným činidlem obsahujícím reaktivní skupiny –N=C–C=N– za vzniku barevného komplexu. Ionty kovu vytvářejí cheláty s dvěma atomy dusíku. V současnosti se využívají především dvě komplexotvorné látky – **bathofenentrolin** a **ferrozin** (3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-sulfofenyl)-1,2,4-triazin – PST, chráněný název FerroZine®), který má vyšší absorpční koeficient a je lépe rozpustný ve vodě.

Hodnocení

Koncentrace sérového železa podléhají cirkadiánnímu rytmu a jsou ovlivněny i dalšími faktory. To omezuje diagnostický význam tohoto parametru. Je špatným ukazatelem tkáňových zásob železa a je nutné ho vždy posuzovat v kombinaci se sérovým transferinem a vazebnou kapacitou pro železo. Snížené koncentrace doprovázejí nedostatek železa, způsobený např. velkými nebo opakovanými krevními ztrátami, nedostatečným příjmem železa potravou nebo narušenou absorpcí. Nález není specifický, neboť se sníženými hladinami se setkáváme rovněž u akutní infekce nebo chronických zánětlivých onemocněních (přesun železa do tkání). Vysoké hladiny železa se vyskytují u hemochromatózy, při předávkování nebo intoxikaci železem, při zvýšeném rozpadu erytrocytů a u některých jaterních onemocnění.

Referenční hodnoty

muži: 9–29 µmol/l

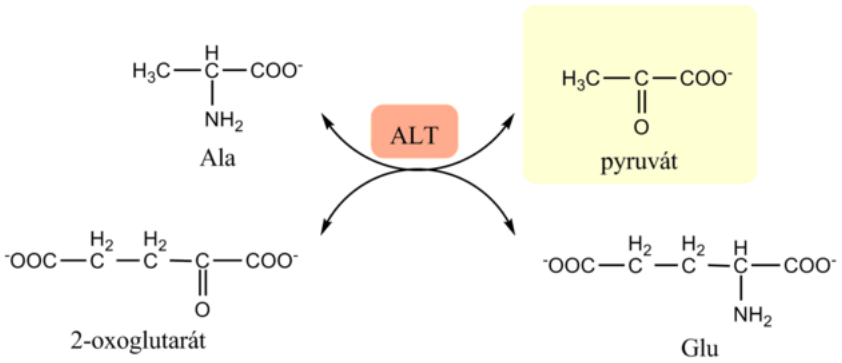
ženy: 7–28 µmol/l

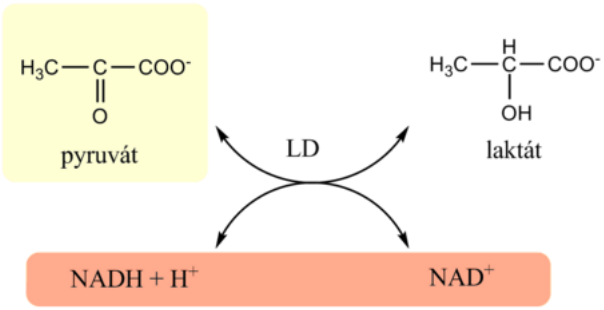
10. Stanovení katalytické koncentrace ALT v séru

Stanovení ALT je podobně jako stanovení AST založeno na dvoustupňové reakci. Princip je stejný jako u AST, pouze jako donor aminoskupiny slouží místo aspartátu alanin a jako enzym pro indikační reakci je použita laktátdehydrogenáza (LD), která zároveň plní funkci enzymu zabezpečujícího redukci endogenních oxokyselin.

Postup

- V první enzymové reakci, katalyzované alaninaminotransferázou přítomnou ve vzorku, vzniká z alaninu pyruvát.
- Vznikající pyruvát je redukován na laktát v indikační reakci katalyzované laktátdehydrogenázou přidanou společně s NADH do reakční směsi. Redukce pyruvátu na laktát je doprovázena úbytkem NADH, který se projeví poklesem absorbance při 334, 340 nebo 365 nm. Katalytická koncentrace ALT je úměrná poklesu absorbance.
- Podobně jako v případě AST vyžaduje pracovní postup 5–15 minutovou preinkubaci séra v reakční směsi bez 2-oxoglutarátu. Reakce je startována 2-oxoglutarátem.

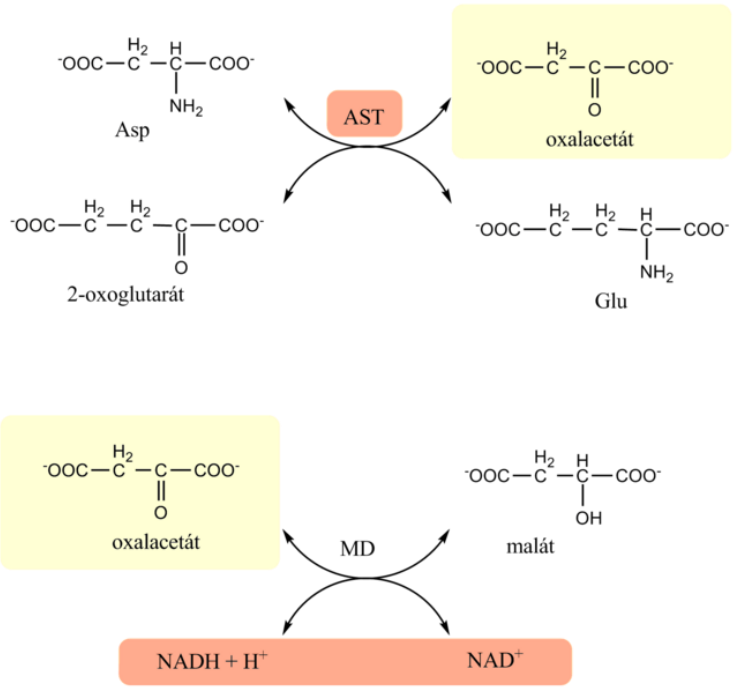




11. Stanovení katalytické koncentrace AST v séru

Stanovení aktivity AST využívá dvoustupňové reakce:

- V první enzymové reakci, katalyzované AST, která je přítomna ve vyšetřovaném vzorku, se tvoří oxalacetát.
- Vzniklý oxalacetát je v další **indikační reakci** účinkem enzymu malátdehydrogenázy (MD) redukován na malát za současné oxidace NADH na NAD^+. Aktivitu AST stanovíme kineticky na základě rychlosti úbytku NADH v průběhu reakce měřením absorbance při 334, 340 nebo 365 nm. Katalytická koncentrace AST je úměrná poklesu absorbance.
- V reakční směsi pro stanovení AST je kromě substrátu (L-aspartát a 2-oxoglutarát), malátdehydrogenázy a NADH přítomen pyridoxal-5´-fosfát a laktátdehydrogenáza. Přídavek pyridoxal-5´-fosfátu zabezpečuje dostatečnou saturaci AST a tím zajišťuje plnou aktivitu enzymu. Přítomnost laktátdehydrogenázy je nezbytná k tomu, aby se zajistila redukce endogenního pyruvátu (přítomného ve vzorku), která rovněž spotřebovává NADH, a tím se zabránilo získání falešně vyšších výsledků. Tyto reakce probíhají během 5–15 minutové preinkubace séra v reakční směsi bez 2-oxoglutarátu.
- Po preinkubaci startujeme reakci katalyzovanou AST přidáním 2-oxoglutarátu. Po krátké lag fázi je monitorována ΔA odečítáním absorbance v minutových intervalech po dobu několika minut nebo kontinuálním sledováním. Protože počáteční absorbance reakční směsi má vyšší hodnotu, doporučuje se provádět odečet proti slepé zkoušce, kterou může být např. roztok dvojchromanu draselného.



12. Stanovení katalytické koncentrace γ-glutamyltransferázy v séru

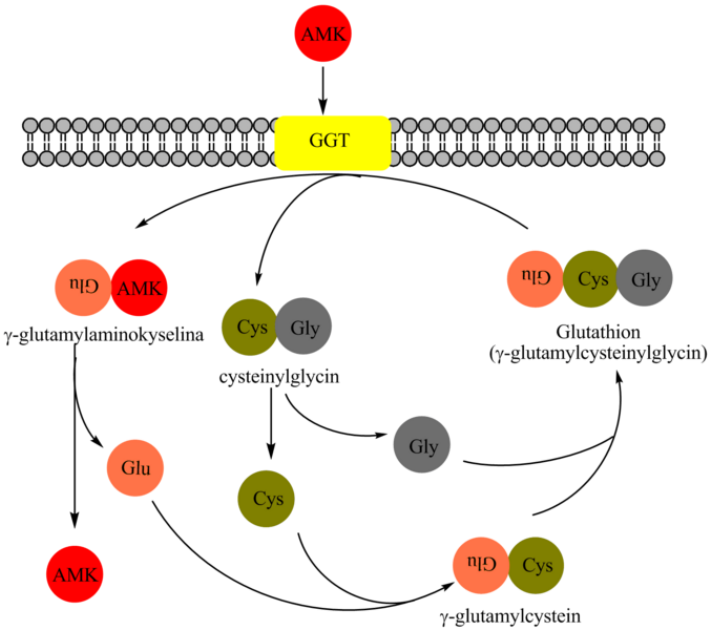
Princip stanovení vychází z reakce, kterou GGT katalyzuje fyziologicky v organismu. Sleduje se přenos γ-glutamylového zbytku ze substrátu na akceptor, kterým je glycylglycin. Jako substráty se používají L-γ-glutamyl-p-nitroanilid nebo L-γ-glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid. V průběhu reakce se po přenosu γ-glutamylového zbytku na akceptor uvolňuje barevný p-nitroanilin (ze substrátu L-γ-glutamyl-p-nitroanilidu) nebo 5-amino-2-nitrobenzoát (ze substrátu L-γ-glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilidu), jejichž přírůstek je přímo úměrný aktivitě GGT ve vyšetřovaném vzorku.

Fyziologické hodnoty fS-GGT

muži 0,14–0,84 μkat/l

ženy 0,14–0,68 μkat/l

Fyziologicky jsou vyšší hodnoty GGT u mužů vzhledem k vyššímu obsahu v prostatě.



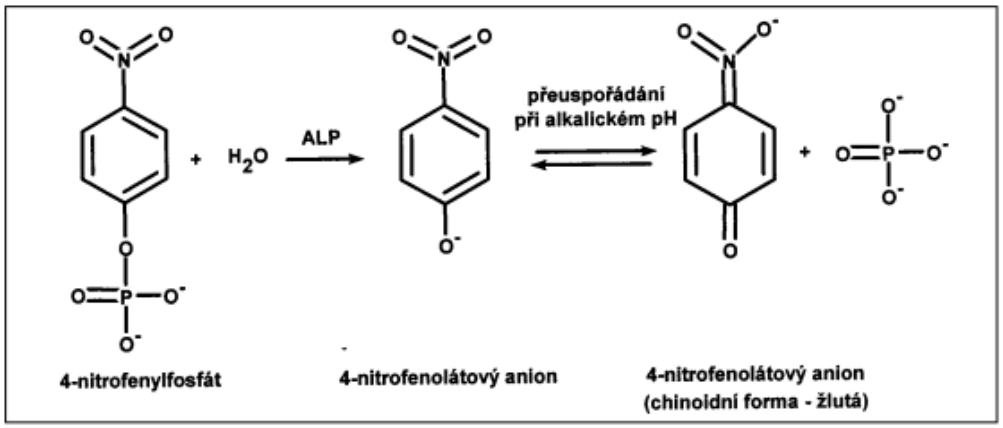
13. Stanovení katalytické koncentrace alkalické fosfatázy v séru

Fosfatasy mohou katalyzovat **hydrolýzu** různých typů organických fosfomonoesterů na fosforečnanový anion a příslušný alkohol nebo fenol. Vedle hydrolýzy zprostředkuje ALP i **transfosforylační reakci**, při níž je fosfátová skupina přenesena na vhodný akceptor. Při použití substrátu 4-nitrofenylfosfátu katalyzuje alkalická fosfatasa tyto reakce:

1. hydrolýza

2. transfosforylace (přenos fosfátové skupiny)

Obr. 6 Princip stanovení katalytické aktivity alkalické fosfatasy



V první reakci se ze substrátu hydrolyticky odštěpuje fosforečnan. (obr. 6). Ve druhé reakci se uplatní transfosforylační aktivita ALP, kdy N-methyl-D-glukamin působí jako akceptor fosforečnanových aniontů a zároveň jako pufr. Tímto způsobem je urychlován průběh reakce. Enzymová reakce je startována substrátem.

Substrát **4-nitrofenylfosfát** je v alkalickém prostředí téměř **bezbarvý**. Produkt jeho hydrolýzy vznikající působením ALP **4-nitrofenolátový ion** má při alkalickém pH chinoidní formu, charakterizovanou **žlutým** zbarvením. Množství uvolněného 4-nitrofenolu, které je mírou aktivity ALP, se stanovuje fotometricky buď kinetickým způsobem nebo metodou konstantního času po zastavení enzymové reakce inhibitorem. ALP je aktivována chloridem sodným.

Referenční hodnoty: Celková katalytická koncentrace ALP v séru μkat/l (S-ALP): dospělí 0,66 – 2,2 μkat/l

14. Spektrofotometrie mozkomíšního moku

Spektrofotometrie mozkomíšního moku se využívá v diagnóze náhlých cévních mozkových příhod především při podezření na krvácení do subarachnoidálního prostoru. Má význam především u těch mozkových hemorrhagií, které se těžko prokazují zobrazovacími metodami. Je cenná především v časných stádiích onemocnění. Poskytuje informaci o stáří krvácení a o protrahovaném či opakovaném krvácení. Spektrofotometrické vyšetření mozkomíšního moku ve viditelné části spektra

umožňuje charakterizovat na základě rozdílných absorpčních maxim oxyhemoglobin (při 415 nm), methemoglobin (při 405 nm) a bilirubin (při 420–460 nm).

Na začátku mozkového krvácení je v mozkomíšním moku především oxyhemoglobin, později vykazuje spektrofotometrie sumační křivku oxyhemoglobinu, popř. methemoglobin a bilirubinu. Stupeň degradace hemoglobinu na bilirubin je individuálně velmi variabilní. Izolovaná bilirubinová xantochromie se objevuje nejdříve za 5 dnů.

Metody stanovení

Spektrofotometrie mozkomíšního moku se provádí na registračním spektrofotometru v rozsahu vlnových délek 370–600 nm. Pro spektrofotometrické vyšetření se doporučuje centrifugovat likvor do 1 hodiny po odběru.

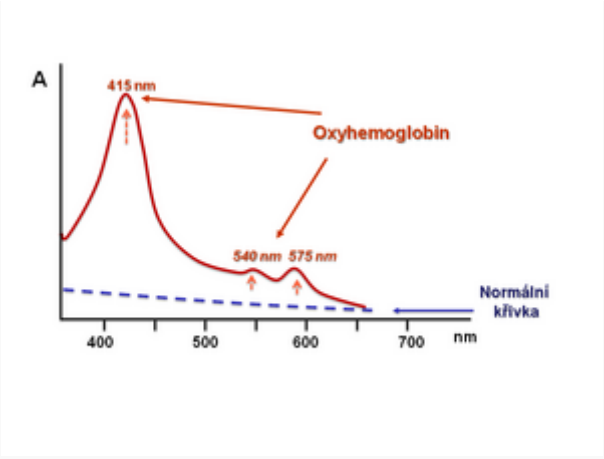
Hodnocení

Fyziologický nález

Spektrofotometrická křivka likvoru za fyziologických podmínek je plochá nebo mírně zvýšená směrem od 600 nm do 370 nm. V oblasti viditelné části spektra jsou absorbance nižší než 0,02.

Patologické nálezy

Průkaz oxyhemoglobinu



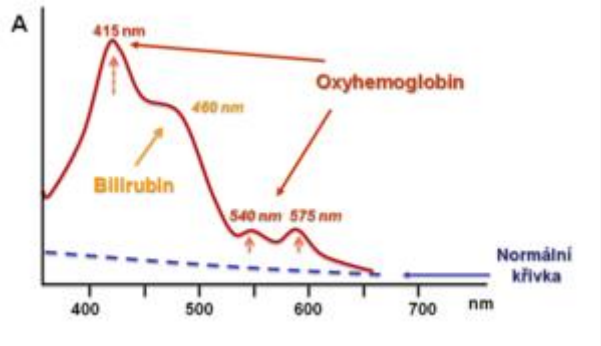
Obr. 5: Spektrofotometrická křivka oxyhemoglobinu (např. čerstvé subrachnoidální krvácení – po několika hodinách)

- Erytrocyty, které pronikly do komor nebo subarachnoidálního prostoru, začnou podléhat hemolýze asi za 2 hodiny a uvolněný hemoglobin podmiňuje vznik absorpčních maxim charakteristických pro oxyhemoglobin. Přítomnost oxyhemoglobinu se projevuje *absorpčním maximem při 415 nm* a *dvěma menšími vrcholy při 540 a 575 nm.* Jeho průkaz v likvoru je

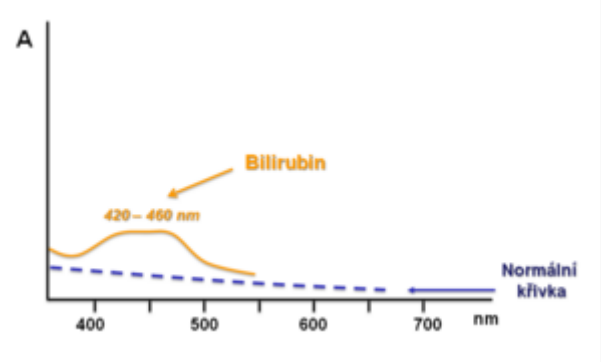
známkou čerstvého krvácení do mozku. Maxima dosahuje za 4–5 dnů a vymizí po 7–10 dnech (obr. 5, 6). Stejnou křivku můžeme získat i u arteficiální příměsi krve, jestliže nebyl likvor po odběru včas zcentrifugován.

Průkaz methemoglobinu

- Přítomnost methemoglobinu je známkou starších změn hemoglobinu. Maximum při 415 nm se posouvá směrem ke kratším vlnovým délkám s maximem při 406 nm. Nalézáme ho jako součást sumačních křivek, kde se absorbance jednotlivých pigmentů překrývají. Dá se však prokázat přídavkem KCN do vzorku. Pokud je přítomen methemoglobin, vznikne kyanmethemoglobin s absorpčním maximem v oblasti 419 nm; v případě, že se nevyskytuje, ke změně nedojde. Průkaz methemoglobinu ve směsi s oxyhemoglobinem potvrzuje, že příměs krve v moku je zapříčiněna mozkovým krvácením a nikoli arteficiální kontaminací při lumbální punkci.



Obr. 6: Spektrofotometrická sumační křivka oxyhemoglobinu a bilirubinu



Obr. 7: Spektrofotometrická křivka bilirubinu (pozdější fáze subarachnoidálního krvácení)

Průkaz bilirubinu

- Přítomnost bilirubinu v mozkomíšním moku svědčí pro starší krvácení do likvorových cest. Po hemolýze erytrocytů vzniká přeměnou hemoglobinu *nekonjugovaný bilirubin* s *absorpčním maximem při 460 nm*, tzv. long bilirubin. V likvoru se objevuje asi za 10–12 hodin po krvácení,

maximum se zaznamenává 3. den a přetrvává 3–4 týdny. Typický spektrofotometrický záznam potvrzující subarachnoidální krvácení zachycuje křivku oxyhemoglobinu s hlavním vrcholem při 415 nm, na jehož sestupné straně je patrný další široký vrchol náležící bilirubinu (obr. 6). Postupně, jak pokračuje hemolýza erytrocytů, se poměr oxyhemoglobinu a bilirubinu snižuje. Bilirubin se může později v CSF konjugovat s volnými mastnými kyselinami a aminokyselinami. *Konjugovaný bilirubin* má absorpční maximum posunuto do oblasti *420 nm*, tzv. short bilirubin. Spektrum samotného bilirubinu lze pozorovat nejdříve 5. den po subarachnoidálním krvácení (obr. 7).

- V mozkomíšním moku je možno prokázat i bilirubin sérového původu. Do likvoru může pronikat fyziologicky u novorozenců nezralou hematoencefalickou bariérou, u dospělých porušenou hematoencefalickou bariérou nebo u výrazných ikterů. *Konjugovaný bilirubin* pochází většinou ze séra.