

Stanovení hemoglobinu v krvi

Nejběžnější stanovení Hb ve venosní nebo kapilární krvi je založeno na reakci s kyanidem sodným a hexakynoželezitanem draselným.

Reakce se provádí v prostředí pufru N-methylglukaminu.

Principem této reakce je vznik derivátu hemoglobinu. Popište, o jaký derivát se jedná:

Měří se absorbance při 540 nm (proti roztoku činidla), obvykle po 5 minutách. Při této vlnové délce má vzniklý derivát jediné absorpční maximum ve viditelné oblasti při 540, molární absorpční koeficient $\epsilon_{540}=11\ 000\ \text{l}\cdot\text{mol}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Odvoďte vztah pro výpočet koncentrace hemoglobinu za předpokladu, že objem vzorku krve byl 0,02 ml a objem přidaného činidla 5 ml.

- Zvažte, že hemoglobin je tetrametr a posuďte, zda vztah, který jste odvodili pro výpočet, platí pro monomer nebo tetrametr.

Referenční hodnoty pro tetrametr:

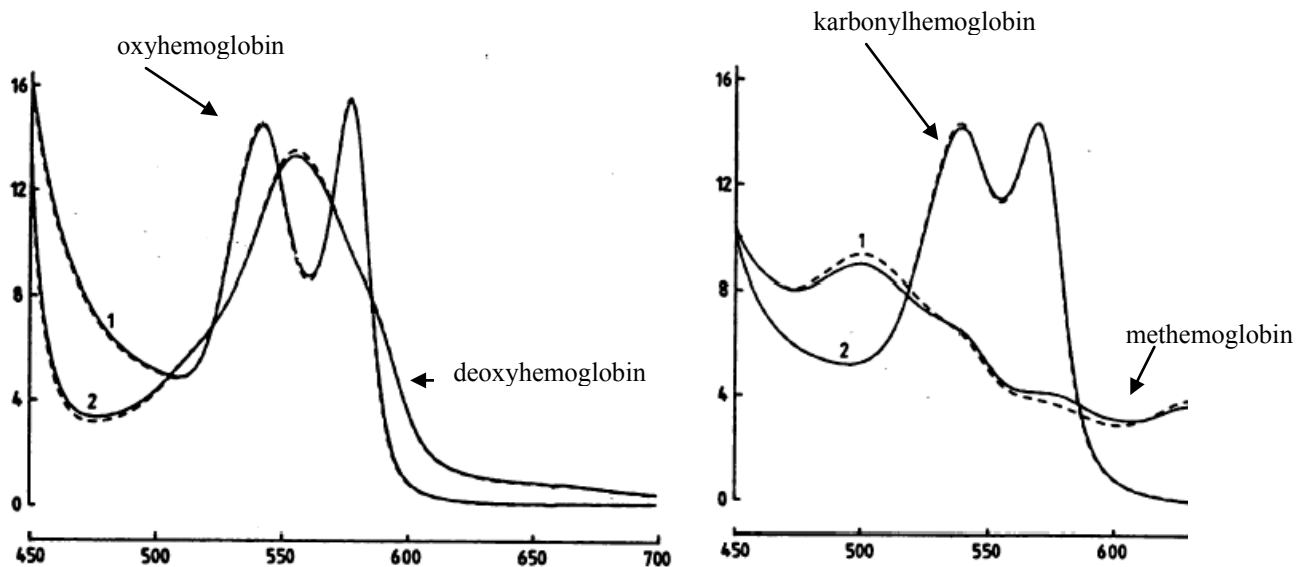
Muži 2,15-2,65 mmol/l

Ženy 1,86-2,35 mmol/l

- Jaké budou referenční hodnoty v g/l a) pro tetrametr b) pro monomer ?
- Znáte jinou metodu pro stanovení hemoglobinu ? Popište její princip.

Stanovení karbonylhemoglobinu

Srovnání spekter oxyhemoglobinu a karbonylhemoglobinu



Název	symbol	Absorpční pík 1 λ	Absorpční pík 1 λ	Absorpční pík 1 λ
Hemoglobin	Hb	431	555	
Oxyhermoglobin	HbO ₂	415	542	577
Karbonylhemoglobin	HbCO	420	539	568,5
Methemoglobin	Hi	406	500	630
Kyanomethemoglobin	HiCN	421	540	

Princip stanovení: ke krvi je přidán hydrogensířičitan sodný (redukční činidlo), který přemění oxygenovaný Hb na deoxygenovanou formu. Koncentrace CO-Hb se zjistí fotometricky.

➤ Při jaké vlnové délce může probíhat měření ?

(Moderní fotometry provádí měření automatizovaně při několika vlnových délkách a vypočítají koncentrace jednotlivých forem hemoglobinu).

Stanovení glykovaného hemoglobinu HbA₁

Glykovaný hemoglobin vzniká neenzymovou reakcí mezi hemoglobinem a glukosou v krvi. Jeho tvorba je ireverzibilní. Hladina glykovaného hemoglobinu proto odráží koncentraci glukosy v krvi po celou dobu existence erytrocytu, tj. asi 120 dní, a využívá se k posouzení úspěšnosti léčby/kompenzace diabetu v období 4–8 týdnů před vyšetřením. Nejčastěji se stanovuje forma HbA_{1c}.

Terminologie:

Glykovaný hemoglobin - suma sacharidových aduktů na *N*-terminálním konci aminokyselin nebo ϵ -aminoskupině lysinu v hemoglobinu.

HbA₁ - suma různých minoritních frakcí hemoglobinu (glykovaných), včetně HbA_{1c}, HbA_{1a1/a2}, HbA_{1b1/b2/b3}, HbA_{1d1/d2/d3} a HbA_{1e}.

HbA_{1c} - glukosový adukt valinu na *N*-terminálním konci β -řetězce hemoglobinu; odpovídá *N*-[1-deoxyfruktosyl]hemoglobinu, tzv. stabilnímu ketoaminu.

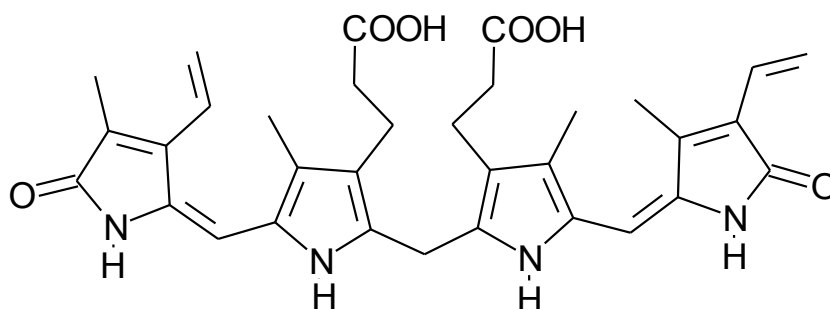
Princip testů

Koncentrace celkového Hb a HbA_{1c} je stanovena po hemolyzování vzorků plné krve s antikoagulantem.

- Uved'te principy stanovení HbA_{1c} používané ve vaší laboratoři.

Stanovení bilirubinu

Bilirubin reaguje s diazoniími solemi (podobně jako aromatické aminy a fenoly) za vzniku intenzivně zbarvených azosloučenin, vhodných k fotometrickému stanovení. Reakce nekonjugovaného bilirubinu probíhá velmi pomalu, značně ji urychlí přidávek alkoholu nebo jiných látek (benzoát sodný, kofein, močovina atd.), které se souhrnně označují jako *akcelerátory* reakce.



Nekonjugovaný bilirubin

- Proč je reakce s nekonjugovaným bilirubinem pomalá ?
- Jak vypadá konjugovaný bilirubin? Proč je rozpustnější ?

Frakce bilirubinu, která vyžaduje akcelerátor, se označuje jako „*nepřímý bilirubin*“. Konjugovaný bilirubin reaguje i bez akcelérátorů rychle („*přímý bilirubin*“). Nekonjugovaný bilirubin se vypočítá jako rozdíl mezi celkovým a konjugovaným bilirubinem.

V metodě se používá nejčastěji diazotace sulfanilové kyseliny, jako akcelérátor kofein a benzoát, barevný produkt se měří v silně alkalickém prostředí. V přítomnosti akcelérátoru reagují všechny formy bilirubinu, stanovujeme celkový bilirubin.

➤ **Jakou metodu stanovení bilirubinu používá vaše laboratoř ?**

Referenční interval koncentrace celkového bilirubinu v krevním séru pro novorozence starší 1 měsíce a dospělé je 5–20 $\mu\text{mol/l}$.

Koncentrace konjugovaného bilirubinu je nejvýše 5 $\mu\text{mol/l}$.

Hodnoty nekonjugovaného bilirubinu 17–70 $\mu\text{mol/l}$ spolu s normálním nálezem ostatních vyšetření jsou charakteristické pro *chronickou* hemolýzu (hemolytická anémie) a pro *benigní* hyperbilirubinemii *Gilbertova* typu (pokles aktivity UDP-glukuronyltransferázy).

Do určité míry je fyziologická *postnatální* hyperbilirubinemie (donošení novorozenci ve 2.-3. dnu života mohou mít v séru až 135 $\mu\text{mol/l}$ nekonjugovaného bilirubinu, do 170 $\mu\text{mol/l}$ celkového bilirubinu), rychle se upravující na hodnoty obvyklé u dospělých.

Zjištění bilirubinu v moči

V moči zdravého člověka se může vyskytovat nepatrné množství konjugovaného bilirubinu (až 0,5 $\mu\text{mol/l}$), které běžnými zkouškami není prokazatelné.

Moč k důkazům bilirubinu musí být **čerstvá**, bilirubin se na vzduchu snadno oxiduje.

K důkazu se obvykle používá některý z diagnostických proužků obsahující zónu pro detekci bilirubinu. Tato zóna je nasycena vhodnou diazoniovou solí, s níž bilirubin poskytne barevnou azosloučeninu.

Hodnocení

Zkoušky na bilirubin v moči jsou pozitivní, zvýší-li se koncentrace *konjugovaného* bilirubinu v krevní plazmě asi nad 30 $\mu\text{mol/l}$. *Nekonjugovaný bilirubin je v plazmě vázán na albumin a do glomerulárního filtrátu proto neproniká.* Zjištění bilirubinu v moči je tedy známkou neschopnosti hepatocytů vyloučit konjugovaný bilirubin do žluče nebo známkou uzávěru žlučových cest, patří proto k příznakům hyperbilirubinemie hepatocelulární nebo obstrukční. Při déletrvajících poruchách však nemusí být v moči prokazatelný ani konjugovaný bilirubin, neboť se v séru přeměňuje na delta formu.

Zjištění urobilinogenů v moči

Zkoušky na přítomnost urobilinogenů se provádějí jen v **čerstvé (a zchlazené) moči** (vhodná polední nebo odpolední moč), během prvních dvou hodin po vymočení; delším stáním se urobilinogeny přeměňují na své oxidační produkty - *urobiliny*.

Princip: Průkazem Ubg je specifická barevná kopulační reakce urobilinogenů s vhodnou diazoniovou solí v kyselém prostředí. Srovnání s barevnou stupnicí → možná semikvantitativní vyhodnocení. Slabě růžové zabarvení zóny, odpovídající prvnímu políčku srovnávací stupnice (přibližně 17 $\mu\text{mol/l}$), lze považovat za horní mez fyziologických koncentrací urobilinogenů v moči v průběhu dne.