

3 BIOLOGICKÝ MATERIÁL A SPEKTROFOTOMETRIE

Pro správné posouzení zdravotního stavu je potřeba získat co nejvíce informací. Zdrojem validních informací, které v sobě odrážejí změnu metabolismu organismu a mohou být použity při posuzování zdravotního stavu pacienta, jsou výsledky laboratorních vyšetření. Lékař v různých fázích diagnostického a terapeutického procesu může využívat širokou škálu laboratorních metod používaných v klinicko-biochemických laboratořích nebo přímo u lůžka pacienta (či v ordinaci praktického lékaře) bez nutnosti analýzy v laboratoři (tzv. POCT-point of care testing).

Nejrozsáhlejší a nejvýznamnější část laboratorních vyšetření tvoří analýzy krve, krevního séra nebo plazmy. Krev je poměrně snadno dostupným materiálem a v jejím složení se odráží řada biochemických pochodů probíhajících v různých tkáních. Dalším poměrně často analyzovaným materiálem je moč. Analýzy ostatních tělesných tekutin (žaludeční sekret, duodenální obsah, plodová voda, mozkomíšní mok, sliny, pot aj.) jsou požadovány cíleně pouze u omezeného počtu vyšetřovaných, jejich četnost je podstatně nižší, často se provádějí jen na specializovaných pracovištích.

3.1 Odběr krve

Krev pro odběr se může získávat z žil, tepen nebo kapilár. Nejčastěji se odebírá žilní krev (většinou z kubitální žíly), méně často kapilární (např. z prstu, ušního lalůčku nebo z prohráté patičky u novorozence). Arteriální krev se odebírá pouze výjimečně, hlavně pro analýzy krevních plynů. Arteriální krev můžeme někdy nahradit arterializovanou kapilární krví, kterou získáme dlouhodobým zahříváním místa odběru. Kapiláry se teplem rozšíří, tím se zvýší se průtok krve kapilárami, z kterých provádíme odběr. Odběr se provádí do heparizovaných kapilár a odebraný vzorek musí být bez bublin.

3.1.1 Odběr žilní krve

Z hlediska postupu a vybavení při odběru žilní krve rozlišujeme dva způsoby odběru:

- **otevřený odběrový systém** – pracovník provádějící odběr je v přímém styku s biologickým materiálem

Odběr se provádí:

- *jehlou přímo do zkumavky*

- *do stříkačky natažením pomocí pístu; pro další zpracování přenesení krve do zkumavky*

- **uzavřený odběrový systém** – manipulace se vzorkem po odběru se provádí přímo v odběrové stříkačce/zkumavce. Pracovník je tak při odběru chráněn před kontaminací krví pacienta, samotný biologický materiál je chráněn před možnou kontaminací zvenčí a proti případnému rozbití během transportu a centrifugace. Jednotlivé uzavřené stříkačky/vakuované zkumavky jsou barevně označeny podle druhu uvnitř přítomné preparační látky (akcelerátory

hemokoagulace, separační gel, heparin, EDTA, aj.). Separací gel umožňuje po centrifugaci (vytvořením mezivrstvy) dokonalé oddělení séra od krevního koagula. Odběrovou stříkačku/zkumavku je tak možné přímo nasadit do analyzátoru. Použitý materiál se snadno likviduje spálením.

3.1.2 Zpracování krve

Krev odebraná bez použití protisrážlivých prostředků se po kratší době sráží, v důsledku přeměny rozpustného fibrinogenu na vláknitou síť fibrinu. Odstředěním sražené krve se získá **sérum**. Doba srážení musí být dostatečná (při pokojové teplotě po 15–30 min). Předčasné oddělení séra od krevních elementů může vést k dodatečné tvorbě fibrinu a koagulaci séra.

Pro některá klinicko-biochemická vyšetření je třeba získat **nesrážlivou krev**. Krev je odebírána do nádobek s přídatkem antikoagulačních (protisrážlivých) činidel. Odstředěním nesrážlivé krve se získá **plazma**. Krev je možno odstředít ihned po odběru, čímž lze ušetřit čas u akutních stavů.

Plazma nebo sérum mají být odděleny co možná nejdříve, nejpozději však do 2 hodin od odběru (pro stanovení draselných iontů do 1 hodiny od odběru).

K oddělení krevních elementů od plazmy, resp. krevní sraženiny od séra, se používají **centrifugy** (odstředivky). K dokonalému odstředění plné či sražené krve se používá přetížení přibližně 1000krát větší než je zemská gravitace. Centrifugace krve se vždy provádí v uzavřených zkumavkách (zamezení vzniku aerosolu, příp. kontaminace vzorku) po dobu asi 10–15 minut při pokojové teplotě nebo při teplotě 4 °C. Delší doba centrifugace nebo zvýšení centrifugačního přetížení vede často k částečné či úplné hemolýze.

3.1.3 Příprava krevní plazmy

Při odběru se odebíraná krev ve zkumavce opatrným kroužením dobře smíchá s protisrážlivou látkou (**antikoagulačním činidlem**), která se v krvi rozpustí a udrží ji po určitý čas nesrážlivou (objem krve se přitom nemění). Protisrážlivý prostředek se dává do zkumavky ve formě roztoku, který se nechá odpařit. Nesrážlivou krev s heparinem lze získat také tak, že z ampulky nasajeme roztok heparinu do stříkačky a opakovanými pohyby pístu vytvoříme na povrchu jemný heparinový film. Do takto připravené stříkačky pak odebereme krev.

Uzavřené odběrové systémy jsou plněny antikoagulačními činidly již při výrobě.

Přibližné dávky antikoagulačního činidla zabraňující srážení 1 ml krve:

Oxalát sodný (též lithný, draselný)	1–2 mg
Citrát trisodný*	3 mg
EDTA.Na ₂ (též K ₂ , K ₃)	1–2 mg
Heparin ⁺	4–6 IU (roztok), 40–60 IU (suchý)

*na hematologická vyšetření se používá ve formě roztoku, který se mísí s krví v poměru 1:10, 1:5

⁺jedná se o heterogenní směs sulfonovaných mukopolysacharidů produkovanou žírnými buňkami ve tkáních savců. Heparin vazbou na plazmatický antithrombin III zvyšuje jeho aktivitu – inaktivaci aktivovaných faktorů srážení, především thrombinu a faktoru Xa. Množství heparinu závisí na materiálu, z něhož je zhotovená odběrová zkumavka (sklo, plast).

Při použití antikoagulačních činidel je nutno počítat s tím, že může dojít ke změně složení odebrané krve. Rovněž je nutno počítat s tím, že během koagulace se nejen aktivují koagulační faktory, ale dochází též k uvolňování některých složek z rozpadlých trombocytů.

3.2 Fyzikální a chemické vyšetření moči

Dalším snadno dostupným biologickým materiálem, který slouží k posuzování stavu pacienta je moč.

3.2.1 Odběr moči

Pro základní chemické vyšetření moče se využívá *první ranní moč* (střední proud moči). Pro kvantitativní stanovení se využívá vzorek moči *sbírané určitý časový interval* (obvykle 3,6,12 nebo 24 hodin).

Pokud je to možné, je doporučeno pro kvantitativní stanovení využít kratší sběrný interval nebo korigovat množství stanoveného analytu v první ranní moči na exkreci kreatininu (množství analytu/mol kreatininu).

Pokud odběr moče provádí pacient sám, je nutné ho poučit a správné technice odběru moče a klást důraz na jejich dodržování. Protože nedodržení správného postupu může vést k hrubým chybám, které zcela znehodnotí analýzu.

Pokyny pro správný sběr moči v delším časovém intervalu:

Vyšetřovaný se vymočí např. v 7:00 h ráno a tato moč se vylije do odpadu. Od tohoto okamžiku začíná sběrné období a shromažďuje se veškerá moč (v zakryté nádobě v temnu a chladu, příp. s přídatkem konzervačního činidla). Poslední odběr je v okamžiku, kdy končí sběrné období. Celý sběr moči se dobře promíchá, v odměrném válci změří objem a poznamená do průvodky. Pak zpravidla postačí k vyšetření vzorek 10–20 ml.

3.2.2 Fyzikální vyšetření moči

Mezi základní fyzikální vyšetření moče patří zhodnotit její objem, barvu, zápach a zákal. Důležitou součástí fyzikálního vyšetření je stanovit pH moče, její osmolalitu a hustotu.

Objem moči

Denní diuréza představuje objem moči vyloučený za 24 hodin. Nejčastěji denní diuréza představuje 1000 až 2000 ml/den (u dospělých).

Snížená diuréza (*oligurie*): pod 400 ml/den. (funkční nedostatečnost u ledvinových poruch, nadměrné pocení, těžké průjmy). Závažná je *anurie*, diuréza pod 100 ml/den.

Zvýšená diuréza (*polyurie*): nad 2500 ml/den je běžná při nadměrném příjmu tekutin, po podání diuretik, někdy i z psychických vlivů, neléčená porucha regulace vazopresinem (*diabetes insipidus*) se projevuje diurézou až 10–20 litrů denně.

Barva

Normální barva moči je podle její koncentrace světle až zlatě žlutá, velmi bledá moč je typická pro polyurii, stáním moč tmavne,

Zbarvení působí buď přirozená močová barviva (urochrom, uroerythrin, stopy koproporfyriu, aj.), exogenní složky (léčiva), rostlinná barviva (červená řepa, borůvky) nebo patologické součásti (bilirubin, biliverdin, hemoglobin).

Zápach

Pach normální moči je svérázný, připomíná pach hovězí polévky nebo bujónových kostek.

Mění se použitím některých druhů potravin (např. chřest, česnek, káva), léků nebo vdechovaných těkavých látek (chloroform, toluen); výrazný pach acetonu bývá při ketonurii, čpavkový při infekcích močových cest (bakterie obsahující ureázu) nebo hnilobný (sulfan, methanthiol, bakteriální rozklad při proteinurii, jaterní kóma). Zápach koňské stáje je při fenylketonurii (fenyloctová kyselina).

Zákal

Moč ihned po vymočení má být čirá. Zákal v teplé, čerstvě vymočené moči je patologickým nálezem.

Zákal nebo větší sedlina však může vznikat při odstavení a chladnutí i v normální moči. Nejběžnější je jemný obláčkový zákal (nubecula) tvořený glykoproteiny a větší sedlina vyloučených solí (fosfáty v alkalických močích, močová kyselina nebo uráty v kyselých).

pH moči

Ledviny se podílejí na udržování acidobazické rovnováhy v organismu tím, že do moči vylučují většinu H^+ iontů pocházejících z některých kyselin vzniklých v metabolismu živin nebo přímo přijatých potravou. Jen zanedbatelná část z nich jsou volné H^+ ionty, projevující se aktuální kyselostí (hodnotou pH moči nižší než pH krevní plazmy). Asi 2/3 H^+ iontů vyloučených do moči je vázáno v NH_4^+ iontech (30–50 mmol/den), zbytek na různé báze, zvláště na hydrogenufosfát (10–30 mmol/den, tzv. titrační acidita moči).

Hodnota pH moči se pohybuje obvykle v rozmezí **5,5–6,5**; s krajními mezemi 4,5–8,0.

Snížené pH moči (**acidurie**, pH < 5,5) způsobuje např. masitá strava (vyšší produkce fosfátů a sulfátů, stoupá vylučování močové kyseliny), metabolická nebo respirační acidóza, hladovění (současně ketonurie), dekompenzovaný diabetes (současně glukosurie a ketonurie).

Zvýšené pH moči (**alkalurie**, pH > 6,5) bývá zapříčiněno např. vegetariánskou stravou, infekcí močových cest, metabolickou nebo respirační alkalózou.

Hodnota pH moči se určuje acidobazickými indikátory. Nelze použít ty, které vykazují proteinovou chybu v přítomnosti proteinů. V praxi se ke stanovení pH moči užívá indikační zóny na diagnostických prouzcích albuPHAN, heptaPHAN, aj. Reakci moči určujeme co nejdříve po

vymočení. Není-li moč konzervována, dochází k rozmnožení mikroorganismů spojené s hydrolyzou močoviny na NH_3 a posunu pH k vyšším hodnotám.

Osmolality moči a test na koncentrační schopnost ledvin

Osmolalita moči závisí na koncentraci vylučovaných látek, obvykle je nepřímě úměrná diuréze. Nejčastější hodnoty u zdravých jsou **500–850 mmol/kg H_2O** , s extrémy 30–1200 mmol/kg.

Známkou dostatečné koncentrační schopnosti je při omezení příjmu tekutin osmolalita aspoň 600 mmol/kg, při ztrátě schopnosti koncentrovat nebo zředit moč v nefronu se udržuje bez větších výkyvů osmolalita moči na úrovni osmolality ultrafiltrátu krevní plazmy, cca 290 mmol/kg. Porucha koncentrační schopnosti ledvin patří k prvním známkám renálního onemocnění.

Osmolalita moči se stanovuje osmometry založenými většinou na kryoskopickém principu, kdy se měří snížení teploty tuhnutí vzorku (1 mol rozpuštěných látek sníží bod tuhnutí vodného roztoku o 1,86 °C).

Vyšetření osmolality se provádí v několika vzorcích moči sbíraných během dne. Přesáhne-li osmolalita v kterémkoli vzorku hodnotu 600 mmol/kg, je to známkou dobré koncentrační schopnosti ledvin a vyšetření tím končí. V opačném případě je indikováno provedení koncentračního pokusu.

Specifická hmotnost moči (Hustota)

Namísto měření osmolality lze pomocí diagnostických proužků stanovit specifickou hmotnost, která dává informaci o iontové koncentraci moči (hmotnostní koncentrace všech rozpuštěných látek vyloučených do moči). Na rozdíl od osmolality je závislá kromě počtu rozpuštěných částic také na jejich molekulové hmotnosti. Vysokomolekulární látky ovlivňují hustotu ve větší míře než elektrolyty. Referenční hodnoty jsou při běžném příjmu tekutin a potravin během dne mezi **1015–1030 g/l**, což odpovídá osmolalitě asi 600–1100 mmol/kg.

3.2.3 Chemické vyšetření moči

K základnímu chemickému vyšetření moči náleží zjištění přítomnosti proteinů, krve resp. hemoglobinu, glukosy, ketolátek, bilirubinu a urobilinogenu. Vyjmenované součásti se označují též jako "**patologické**". Při analýze zvláště citlivými metodami je nalezneme v nepatrných koncentracích i v moči zdravého člověka. *Chemické vyšetření moči* proto používá takové kvalitativní zkoušky, jejichž výsledek je *pozitivní teprve tehdy, přestoupí-li koncentrace hledané látky jisté fyziologické rozmezí*. Vyšetření se obvykle provádí pomocí diagnostických proužků. Výhodné pro tento účel jsou kombinované diagnostické proužky, které umožňují současnou detekci několika látek. Při pozitivitě těchto zkoušek teprve mluvíme o proteinurii, hematurii, atd., a je nutné nález korelovat s jinými faktory a případně žádat další vyšetření na potvrzení výsledku.

Kromě diagnostických proužků na zjištění „patologických“ součástí v moči jsou vyráběny různé další screeningové testy založené většinou na imunochromatografických metodách, např. pro průkaz *drog* nebo *hormonů* v moči.

3.2.3.1 Vyšetření moči polyfunkčními diagnostickými proužky

Polyfunkční diagnostické proužky s několika indikačními zónami jsou založeny na principu suché chemie. Tzn., že činidla použité pro průkaz analytu jsou nanášeny na filtrační papír a následně odpařeny. Po navlhčení indikačních zón ve vzorku moči je aktivována chemická reakce, která se projeví zbarvením zóny. Vyhodnocení se provádí většinou vizuálně srovnáním indikačních zón s barevnými stupnicemi na pouzdech pro proužky. Intenzita zbarvení je úměrná množství analytu v moči a při dodržení výrobcem předepsaného času je možné semikvantitativní stanovení určovaných látek. Intenzitu zbarvení je též možné vyhodnotit u proužků k tomu určených elektronicky, obvykle měřením reflektance. K tomuto účelu se využívají malé přístroje (reflektanční fotometry různých výrobců, např. Laura Smart firmy Erba Lachema, Urisys firmy Roche apod.)

Výhodou polyfunkčních proužků je možnost rychlého vyšetření moči kdekoli, i přímo u lůžka pacienta, neobyčejně snadným a jednoduchým způsobem. Vždy je nutno mít na paměti, že výsledek může být ovlivněn interferujícími léky nebo jejich metabolity. Mezi nevýhody lze počítat omezenou skladovatelnost (všímejte si proto data expirace uvedeného na obalu). Nutno je také dodat, že semikvantitativní stanovení diagnostickými proužky není dostačující pro stanovení diagnózy a následnou léčbu pacienta a vždy je nezbytné provést další vyšetření.

Při vyšetření moči pomocí proužků se vyšetřuje vždy jen **čerstvá** moč (nejpozději do 2 h po odběru), sbíraná do zcela **čistých** nádob, dobře **promíchaná**, necentrifugovaná.

Polyfunkční proužky obsahují různý počet indikačních zón. K parametrům, které lze v moči vyšetřovat (jak bylo v předchozích kapitolách uvedeno), patří: **pH**, **glukóza**, **proteiny**, **ketony**, **bilirubin**, **urobilinogen**, **krev** a **specifická hmotnost**. Některé polyfunkční proužky obsahují též indikační zóny na detekci **dušitanů** a **leukocytů**.

Glukóza

Indikační zóna proužku obsahuje enzymy (glukosaoxidázu a peroxidázu) a vhodný substrát, který se v přítomnosti vzniklého peroxidu oxiduje na barevný produkt. Zkouška je dosti citlivá, výsledek je zřetelně pozitivní přibližně od koncentrace 2 mmol/l. Zároveň je velmi specifická, jiné cukry než D-glukosa nereagují.

Falešně negativní výsledky vznikají při vysokých koncentracích redukujících látek (askorbová kyselina nebo některá spazmolytika zpomalují vývin zbarvení).

Falešně pozitivní výsledky může způsobit přítomnost substrátů peroxidázy v nádobách na moč (běžný dezinfekční prostředek Persteril /peroxooctová kyselina/ nebo peroxid vodíku). Nádoby se proto po dezinfekci musí důkladně vypláchnout čistou vodou.

Proteiny

K důkazu se využívá tzv. proteinové chyby některých acidobazických indikátorů. Tyto indikátory mění své zbarvení v přítomnosti proteinů a vykazují zdánlivě jinou hodnotu pH, než odpovídá skutečnosti. Příkladem jsou indikátory sulftaleinového typu. Indikační zóna na konci proužku je nasycena uvedeným indikátorem a kyselým pufrům o hodnotě pH 3. Po smočení v roztoku obsahujícím proteiny indikátor nabude zbarvení odpovídající podstatně vyšší hodnotě pH, než které v indikační zóně zajišťuje pufr (indikátor vykazuje proteinovou chybu).

Vyšetření proteinurie se provádí v náhodném vzorku moče, nejlépe v prvním ranním vzorku moče. Testovací proužky detekují bílkovinu v moči pouze tehdy, je-li její koncentrace vyšší než 0,1–0,3 g/l (záleží na výrobci proužku, na kvalitě barevné stupnice) a vykazují mnohem vyšší citlivost na albumin než na globuliny, glykoproteiny a Benceův Jonesův protein.

Ketony

Princip stanovení spočívá v reakci ketonových látek s nitroprusidem sodným v alkalickém prostředí za vzniku fialového zbarvení. Zkouška dokazuje v čerstvé moči zvláště acetoacetát, který při delším stání spontánně dekarboxyluje na aceton (na něj je zkouška méně citlivá).

Za normálních okolností je vylučování ketolátek nepatrné, nedosahuje hodnoty 0,5 mmol/den. Ke zvýšené produkci ketolátek dochází v důsledku zvýšené utilizace tuků a při současné poruše nedostatečnosti utilizace glukózy (např. při vyčerpávající fyzické námaze bez dodávky glycidů, několikadenním hladovění, redukční dietě s převahou proteinů, u diabetes mellitus). V těchto případech se zvyšuje koncentrace ketolátek v krvi nad 200 $\mu\text{mol/l}$ a močí se jich vylučuje i více než 100 mmol/den. Aceton je poměrně těkavý a je poměrně rychle vylučován expirací.

Bilirubin

Moč k důkazům bilirubinu musí být čerstvá, bilirubin se na vzduchu snadno oxiduje. K důkazu se využívá kopulační reakce bilirubinu s vhodnou diazoniovou solí v kyselém prostředí za vzniku azobarviva. V moči zdravého člověka se může vyskytovat nepatrné množství konjugovaného bilirubinu (až 0,5 $\mu\text{mol/l}$), které běžnými zkouškami není prokazatelné. 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.

Urobilinogen

Zvýšené množství těchto látek je velmi citlivou známkou funkčního zatížení nebo nedostatečnosti hepatocytů, výrazem neschopnosti vyloučit z krve a přeměnit většinu z urobilinogenů resorbovaných v tlustém střevě. Jednoduchost zkoušky již při orientačním vyšetření moči je cenná, pozitivní nález může být první objektivní známkou funkčního zatížení jater (značná fyzická

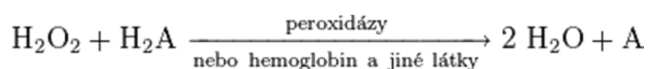
zátěž, jednorázové požití větší dávky etanolu, nadměrná hemolýza) nebo poškození jaterních buněk, např. při virovém zánětu, toxickém poškození (též u horečnatých stavů) nebo u nádorů jater. Nález je nutno zpřesnit rozborů krevního séra – jaterními testy.

Průkazem urobilinogenů je specifická barevná kopulační reakce urobilinogenů s vhodnou diazoniovou solí v kyselém prostředí. Srovnání s barevnou stupnicí umožní 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. Z vyšetření moči je naprosto nezbytné provést zkoušky na bilirubin.

Krev

Močí zcela zdravých lidí se vyloučí až milión erytrocytů za den. Toto velmi malé množství nelze prokázat běžnými chemickými zkouškami. Výskyt většího množství erytrocytů (**hematurie**) nebo průnik volného hemoglobinu, příp. svalového myoglobinu, do definitivní moči (**hemoglobinurie**, resp. myoglobinurie) je téměř vždy patologickým nálezem. Moč s nadměrnou příměsí hemoglobinu má narůžovělé až masové zbarvení a spektroskopicky v ní lze prokázat hemoglobin; u masivní hemoglobinurie může nabýt až zbarvení černého piva (degradace hemoglobinu na hematin).

Principem chemického zjištění hemoglobinu nebo erytrocytů v moči je tzv. pseudoperoxidázový účinek hemoglobinu. Některé látky, jako např. hemoglobin, hem a jeho deriváty (i chlorofyl), méně též ionty Fe^{3+} , katalyzují neenzymovou oxidaci (dehydrogenaci) vhodných organických sloučenin peroxidem vodíku:



Výhodné je ke sledování reakce použít chromogenní substrát, tj. látku poskytující dehydrogenací výrazně zbarvený produkt (zde aminofenazon, často též benzidin nebo jeho nekancerogenní deriváty). Diagnostické proužky hemoPHAN obsahují v indikační zóně o-tolidin (3,3'-dimethylbenzidin) a kumenhydroperoxid v kyselé pufované směsi.

Stejnou reakci katalyzují enzymy – peroxidázy, které slouží k odstraňování peroxidu vodíku vznikajícího v průběhu některých oxidoredukčních dějů v buňkách. Z poznaných krevních elementů mají vysokou peroxidázovou aktivitu leukocyty. Katalytická aktivita enzymu se ztrácí jeho tepelnou denaturací.

Pozitivita zkoušky na pseudoperoxidázový účinek hemoglobinu v moči může tedy být způsobena i peroxidázami leukocytů nebo některých bakterií. V tomto případě opakování zkoušky s povařeným vzorkem dá negativní výsledek, zatímco pseudoperoxidázová aktivita neenzymových katalyzátorů zůstává i po povaření vzorku zachována.

Při negativní reakci zůstává indikační zóna žlutá, v přítomnosti hemoglobinu (nebo četnějších leukocytů) se barví žlutě zeleně až modře. Jsou-li v moči intaktní erytrocyty, může být zbarvení zóny nerovnoměrné. Hematurii potvrdí nález četných erytrocytů v močovém sedimentu.

Citlivost důkazu se snižuje, je-li v moči přítomno větší množství redukcujících látek (např. askorbátu po vysokých dávkách vitamínu C, urátu v příliš koncentrovaných močích, gentisátu). Falešně pozitivní výsledek může vzniknout za přítomnosti železitých solí, jodidů nebo stop silných oxidačních činidel (dezinfekčních prostředků obsahujících chlor, chlornan, chloramin).

Dusitany

Detekce dusitanů slouží pro průkaz bakteriurie. Princip detekce dusitanů v moči je stejný jako při stanovení dusitanů v pitné vodě. Indikační zóna obsahuje aromatickou aminosloučeninu (např. sulfanilovou kyselinu) a pufr udržující silně kyselé pH. V přítomnosti NO_2^- vzniká diazoniová sůl, která následně reaguje s vhodnou aromatickou sloučeninou za vzniku azobarviva. Detekce dusitanů v moči slouží jako rychlá metoda na odhalení asymptomatické infekce močových cest. V přítomnosti některých patogenních bakterií v močovém systému dochází k redukci dusičnanů (normální složka moči) na dusitany. Aby tato redukce mohla proběhnout, musí být splněny další předpoklady:

- dostatečné množství dusičnanů v moči (předchozí den je dodržena normální dieta zahrnující zeleninu),
- dostatečně dlouhá doba retence moči v močovém měchýři (aspoň 4 h),
- vyloučení možné antibakteriální léčby (inhibice bakteriálních enzymů).

Při pozitivním nálezu dusitanů je v čerstvé moči přítomno kolem 107 zárodků/ml. Negativní nálezu dusitanů však nevylučuje bakteriurii (možná infekce mikroorganismy neredukující dusičnany).

Snížené hodnoty nebo **falešně negativní výsledky** mohou být získány při polyurii a častém močení, nadměrném lačnění či hladovění, nadměrných dávkách vitamínu C.

Falešně pozitivní nálezu je způsoben bakteriální kontaminací vzorku.

Leukocyty

Chemické potvrzení leukocyturie diagnostickými proužky je založeno na průkazu esteráz, které se hojně vyskytují v granulocytech a histiocytech. Indikační zóna proužku obsahuje indoxylester, který je hydrolyzován indoxylesterázou na indoxyl (3-hydroxyindol). Tento je u některých typů proužků oxidován vzdušným kyslíkem na indigo (modř) nebo reaguje v následné reakci s diazoniovou solí za tvorby azobarviva (béžově-fialové zbarvení). Test zachytí jak intaktní, tak rovněž lyzované leukocyty, které unikají mikroskopickému vyšetření.

Symptomem zánětlivého onemocnění ledvin (pyelonefritidy) a dolních močových cest (cystitida, uretritida) je zvýšená exkrece leukocytů močí. Zatím není standardizována hranice mezi normální a patologickou exkrecí leukocytů. Jako patologický nálezu se hodnotí > 20 leukocytů/ μl moči; při nálezu 10–20 leukocytů/ μl je nutné provést další vyšetření s novou čerstvou močí.

Při pozitivním nálezu je třeba další vyšetření na proteinurii, hematurii, nitriturii, pH a mikroskopické vyšetření močového sedimentu.

Při zánětech způsobených toxickými látkami, infekcích trichomonadami, viry, plísněmi můžeme nalézt tzv. „abakteriální“ leukocyturii.

Kyselina askorbová

Při stanovení některých látek (glukosa, krev, nitrity) interferuje askorbová kyselina, která může být v moči přítomna ve velkých koncentracích. Proto některé polyfunkční proužky obsahují zónu pro stanovení kyseliny askorbové. Indikační zóna pro askorbovou kyselinu obsahuje kyselinu fosfomolybdenovou, která je redukována askorbovou kyselinou na molybdenovou modř. Test není specifický pro askorbovou kyselinu, protože pozitivní reakce (šedozelenomodré až zelené zbarvení) vzniká i při působení dalších redukujících látek přítomných v moči (např. gentisové kyseliny a dalších metabolitů salicylové kyseliny).

3.3 Spektrofotometrie

Metody kvantitativní analýzy se často zakládají na určení absorpce elektromagnetického záření z oblasti ultrafialové (vlnová délka $\lambda < 380$ nm) nebo viditelné části spektra ($\lambda = 380\text{--}780$ nm) stanovovanou látkou. Molekuly absorbují elektromagnetické záření pouze takové energie (kvantum energie), která je přivede do vyššího (excitovaného) energetického stavu. Tuto energii lze vyjádřit pomocí vztahu:

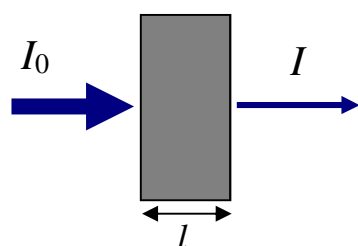
$$\Delta E = h \nu = h c / \lambda$$

kde h je Planckova konstanta, ν frekvence absorbovaného záření, c rychlost světla ve vakuu, λ vlnová délka absorbovaného záření.

Vlnová délka absorbovaného elektromagnetického záření je tedy určena vzdáleností dvou sousedních energetických hladin (ΔE) molekul dané látky, mezi kterými elektrony přechází.

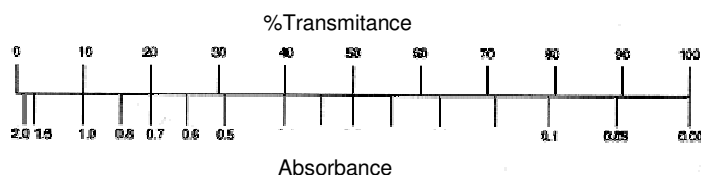
Pokud monochromatické záření o intenzitě I_0 prochází vrstvou absorbující látky l , dochází k částečné absorpci záření, takže vycházející elektromagnetické záření má intenzitu I nižší než I_0 .

Množství absorbovaného záření může být vyjádřeno dvojnásobem:



- jako **transmittance** (propustnost): $T = I / I_0$
- často se udává jako procento prošlého záření $T(\%) = 100 \cdot I / I_0$
- jako **absorbance**: $A = \log(I_0 / I) = \log(1 / T) = -\log T$
- zastaralé pojmy jsou optická hustota (OD , angl. *optical density*), extinkce (E)

Vztah mezi transmittancí a absorbancí vyjadřuje následující schéma:



Pokud nedochází k absorpci záření při jeho průchodu látkou, tak transmittance je rovna 100 % a absorbance je nulová. Pokud veškeré záření je pohlceno roztokem, tak transmittance je nulová a absorbance je nekonečno.

Velikost absorpce elektromagnetického záření závisí na třech faktorech: na vlnové délce záření, koncentraci absorbující látky v roztoku a na tloušťce měřené vrstvy.

Při dané vlnové délce záření existuje mezi koncentrací absorbující látky a absorbancí přímá úměra. Tuto závislost vyjadřuje **Lambertův-Beerův zákon** (někdy označovaný pouze jako Beerův zákon):

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda l c$$

Kde ϵ_λ je **molární absorpční koeficient** (neboli molární absorptivita), jehož hodnota odpovídá absorbanci látky o koncentraci 1 mol l⁻¹ a tloušťce měřené vrstvy $l = 1$ cm, c je látková koncentrace (mol l⁻¹) a l tloušťka měřené vrstvy (cm).

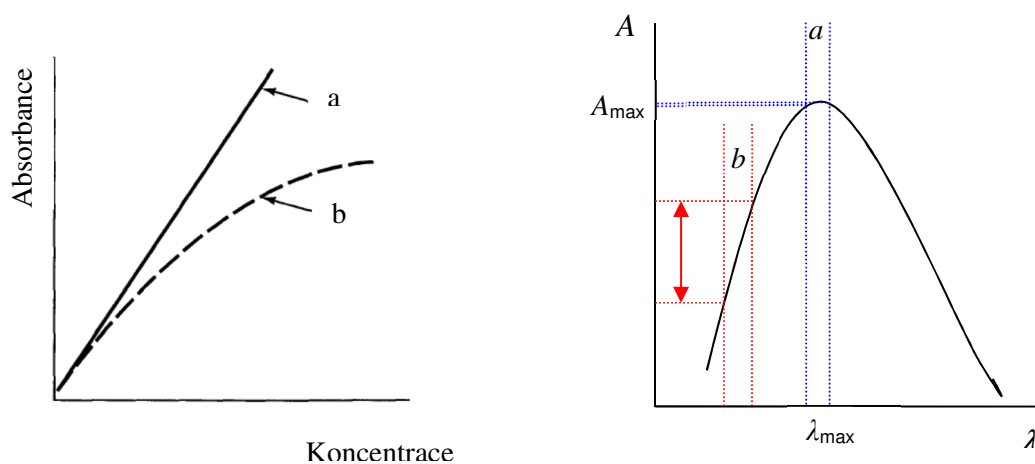
Absorbance je aditivní veličina, tj. pokud je v roztoku přítomno více látek, které absorbují při dané vlnové délce, tak celková absorbance roztoku je dána vztahem:

$$A_{\text{celková}} = A_1 + A_2 + \dots = \epsilon_1 l c_1 + \epsilon_2 l c_2 + \dots$$

Lambertův-Beerův zákon platí pouze pro:

- monochromatické záření
- zředěné roztoky ($< 10^{-2}$ mol l⁻¹)
- homogenní roztoky (nedochází k rozptylu záření na částicích vzorku)
- vzorky, které nefluoreskují ani nefosforeskují při dané vlnové délce
- monomerní látky, které v roztoku neasociují

Závislost absorbance na vlnové délce nazýváme **absorpční spektrum** (absorpční křivka). Absorpční spektrum je charakteristické pro danou sloučeninu. Praktický význam mají absorpční maxima křivky a jim příslušející vlnové délky. Ke stanovení koncentrací absorbujících látek se volí zpravidla vlnové délky těchto maxim, poněvadž stanovení je nejpřesnější (viz obrázek) a současně i nejcitlivější (viz Lambertův-Beerův zákon).



Z absorpční křivky lze též vypočítat hodnoty molárních absorpčních koeficientů, známe-li koncentraci absorbující látky, pro kterou byla absorpční křivka sestrojena:

$$\epsilon_{\lambda_{\text{max}}} = A_{\text{max}} / (l * c)$$

Protože hodnota molárního absorpčního koeficientu závisí na konkrétních experimentálních podmínkách, tak se téměř vždy při spektrofotometrických stanoveních koncentrace vychází z kalibračního grafu. K jeho zhotovení se připraví z nejčistšího preparátu stanovované látky (standardu) standardní roztok a jeho ředěním řada kalibračních roztoků. Každý kalibrační roztok se zpracuje stejným postupem jako vzorky s neznámou koncentrací. Poté se změří jejich absorbance proti rozpouštědлу nebo činidlu bez měřené látky (slepému vzorku/pokusu, angl. *blank*). Naměřené hodnoty se vynesou do grafu jako závislost absorbance kalibračních roztoků na

jejich koncentraci. Závislost je lineární pro rozsah koncentrací, ve kterém platí Lambertův-Beerův zákon. Odchylky od přímky jsou běžné u vysokých koncentrací. Body ležícími v lineární části grafu se proloží přímkou (jejíž obecná rovnice je $y = kx + q$).

Pokud se měří absorbance proti slepému vzorku, tak kalibrační přímka prochází počátkem souřadnic:

$$A = kc$$

k je směrnice přímky (tj. tangenta úhlu, který svírá přímka s osou x):

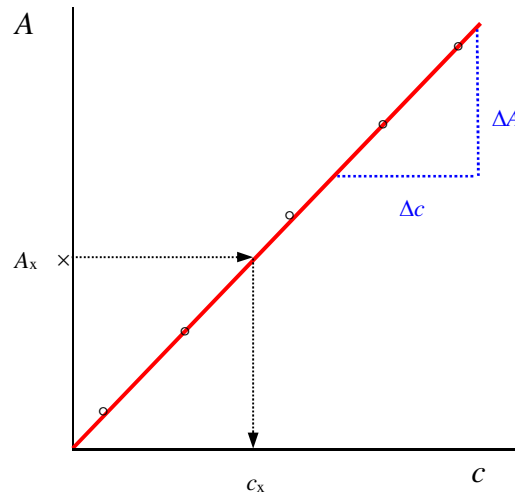
$$k = \Delta A / \Delta c$$

Převrácená hodnota směrnice přímky $1/k$ se nazývá **kalibrační faktor** (F):

$$F = 1/k = \Delta c / \Delta A$$

Pro výpočet koncentrace analytu v neznámém vzorku potom platí:

$$c_x = A_x F$$



Poněvadž standard i analyzovaná látka mají za daných experimentálních podmínek stejnou hodnotu molárního absorpčního koeficientu, tj. $\epsilon_{\text{std}} = \epsilon_x$, získáme po dosažení z Lambertova-Beerova vztahu za ϵ rovnici $A_{\text{std}}/(l c_{\text{std}}) = A_x/(l c_x)$, z které pro koncentraci analytu v neznámém vzorku vyplývá:

$$c_x = \frac{A_x}{A_{\text{std}}} c_{\text{std}}$$

Koncentraci analyzované látky c_x lze vypočítat ze změřených absorbancí analyzovaného vzorku A_x a kalibračního roztoku A_{std} o koncentraci c_{std} , která je blízká koncentraci analytu v neznámém vzorku c_x . Absorbance jsou měřeny proti slepému vzorku.

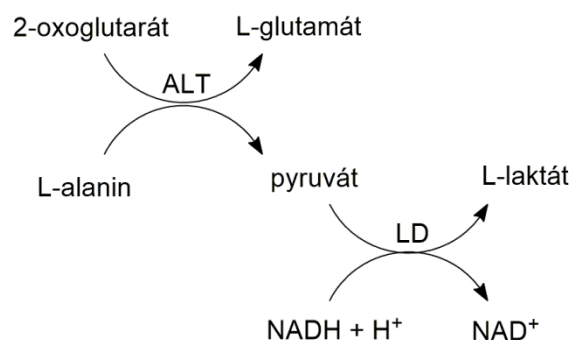
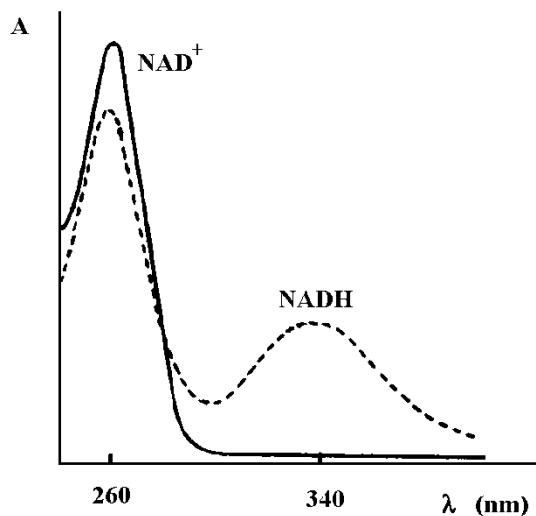
Látky barevné (tj. látky výrazně absorbující viditelné záření) lze spektrofotometricky stanovit přímo. Látky bez výrazného absorpčního maxima ve VIS/UV oblasti je třeba nejprve reakcí s vhodným činidlem (**derivatizací**) převést na zbarvený produkt. Podmínkou je, aby množství barevného produktu bylo úměrné koncentraci stanovované látky. Intenzita zbarvení roztoku tímto barevným produktem je pak přímo úměrná koncentraci analytu v původním analyzovaném roztoku a lze ji změřit spektrofotometrem.

Schopnost substrátu nebo produktu absorbovat světelné záření se využívá také ke stanovení aktivity enzymů v biologickém materiálu. Používají se 2 základní metody měření enzymové aktivity:

- a) kinetická metoda
- b) metoda konstantního času („end point“)

Kinetická metoda se používá častěji a je založena na *kontinuálním* sledování změny absorbance roztoku v kyvetě spektrofotometru v absorpčním maximu substrátu nebo produktu. Rychlost nárůstu nebo poklesu absorbance je pak úměrná enzymové aktivitě. Při metodě konstantního času se enzym inkubuje se substrátem po předem určený čas, po jehož uplynutí je reakce zastavena přidávkem inhibitoru a koncentrace produktu nebo substrátu je stanovena fotometricky.

Při stanovení aktivity enzymů se často používá tzv. optického (Warburgova) testu, který je založen na tom, že redukované kofaktory NADH a NADPH absorbují UV záření při 340 nm, zatímco oxidované formy NAD(P)⁺ při této vlnové délce neabsorbují. Nárůst nebo pokles absorbance při 340 nm ukazuje na zvýšení nebo snížení koncentrace NADH a tím i na rychlost enzymové reakce.



Optického testu lze využít i ke stanovení aktivity enzymů, které nepatří mezi NAD(P)-dependentní oxidoreduktasy. V tomto případě je produkt první reakce přeměněn v následné enzymové reakci, která je katalyzována NAD(P)-dependentní oxidoreduktasou.

Např. enzymová aktivita alaninaminotransferasy (ALT) se stanovuje pomocí dvou spřažených reakcí, kdy produkt první reakce pyruvát je v následné reakci katalyzované laktatdehydrogenasou (LD) redukován pomocí NADH na laktát.