Datum:	Jméno: Skupina:

CVIČENÍ 12: Vybraná vyšetření trávícího traktu

12.1 Vybraná laboratorní vyšetření žaludku

postup trávení

Dutina ústní: slinná α-amyláza štěpí škrob z potravy (v žaludku se α-amyláza inaktivuje).
Žaludek: žaludeční šťáva pomocí HCl a pepsinu denaturuje a štěpí proteiny z potravy.
Pylorus (vrátník žaludku): natrávená potrava kašovité konzistence (chymus) jde do duodena.
Duodenum (dvanáctník): sem se secernuje pankreatická šťáva a žluč ⇒ trávení:
- bílkovin (pankreatické *endoproteinázy (trypsin, chymotrypsin, elastáza), exopeptidázy (karboxypeptidázy),* distálněji enterocytové *aminopeptidázy*),
- lipidů (žlučové kys. a fosflolipidy žluči - emulgace, pankreatické *lipáza, fosfolipázy, cholesterolesteráza*),
- polysacharidů (pankreatická *α-amyláza*, enterocytové *α- a β-glykosidázy*).

Denně se vytvoří 2 - 3 l žaludeční šťávy. V prázdném žaludku vzniká šťáva o neutrálním až slabě zásaditém pH složená z hlenu, vody a iontů. Po příjmu potravy jsou do žaludeční šťávy secernovány enzymy a kyselina chlorovodíková (0,5 M) ⇒ $pH_{žalud.šť.}$= 1 - 2 po smísení s ostatními sekrety.

tubulární žlázy
žaludeční sliznice
- buňky vedlejší - hlen (ochranná funkce), HCO_3^-
- krycí (parietální) - HCl (0,5 M), intrinsic (vnitřní) faktor (glykoprot., abs. B_{12})
- hlavní - pepsinogen (akt. HCl, autokat.), v pylorické části také vnitřní faktor

endokrinní buňky - gastrin a ostatní (para-)hormony

12.1.1 Stanovení výdeje HCl žaludeční sliznicí

Výdej HCl = množství HCl vyprodukované v určitém časovém intervalu.

BAO (basal acid output): bazální výdej kyseliny (nalačno v klidových podmínkách)
MAO (maximal acid output): maximální výdej kyseliny (po intenzivním podnětu)
PAO (peak acid output): vrcholový výdej kyseliny (po intenzivním podnětu)

Výdej HCl ovlivňuje aktuální aciditu žaludečního sekretu (hodnota pH), ale ta závisí i na dalších faktorech (objem žaludečního obsahu (nalačno = objem sekretu a spolknutých slin), vazba H^+ iontů konjugovanými bázemi, např. glykoproteiny v hlenovém sekretu). ⇒ Výdej HCl nelze určit z hodnoty pH žaludečního sekretu.

K určení výdeje HCl je nutné znát délku sběrného období, objem žaludečního sekretu a jeho titrační aciditu.

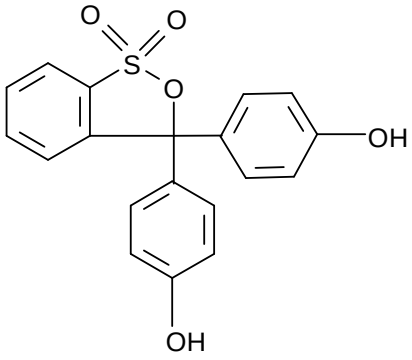
Doplňující údaje: pH žaludečního sekretu, u nedostatečné kyselosti přítomnost mléčné kyseliny.

Ionty H^+ plní svou funkci v žaludečním trávení pouze ve vyšších koncentracích ($pH<3 \sim [H^+]>10^{-3}M$).

Odběr žaludečního sekretu:

- pacient 12 h před odběrem nekouří, nejí, nepije
- zavést nazogastrickou sondu (při pH>5 a zbarvení sekretu bilirubinem - kontaminace duodenálním obsahem - špatná poloha sondy)
- odčerpat obsah žaludku - vylít
- odčerpat ve dvouminutových intervalech všechen žaludeční obsah - spojením porcí vytvořit čtyři patnáctiminutové frakce B1, B2, B3, B4

- podat podkožně pentagastrin (syntetický analog gastrinu) 6 μg/kg tělesné hmotnosti (pentagastrinový test)
- obdobně jako frakce B odebrat čtyři patnáctiminutové frakce S1, S2, S3, S4
- u všech frakcí určit: objem, pH (indikátorovým papírkem), titrační aciditu (roztokem NaOH)



fenolová červeň
fenolsulfonftalein

$HCl + NaOH \rightarrow NaCl + H_2O$

Titrace HCl v žaludeční šťávě odměrným roztokem NaOH v přítomnosti fenolové červeně.

Fenolová červeň je acidobazický indikátor, přechází ze žluté do červené při pH = 6,8 - 8,0. Jako odměrný roztok používáme 0,1 M NaOH (alkalimetrie). Během titrace dochází k neutralizaci HCl, jakmile se roztok jednou kapkou NaOH zalkalizuje, indikátor nabude trvale červeného zbarvení.

Provedení (viz skripta)

Výsledky, u BAO, MAO, PAO, BAO/PAO též hodnocení (viz pravidla níže):

Frakce	Objem sekretu (V=[ml])	Spotřeba 0,1M NaOH (V=[ml])	Titrační acidita (c =[mmol l^{-1}])	Látkové množství HCl (n=[mmol/15 min]; n=c*V)
B1				
B2				
B3				
B4				
S1				
S2				
S3				
S4				

BAO (mmol h^{-1}) (B1+B2+B3+B4)		MAO (mmol h^{-1}) (S1+S2+S3+S4)		PAO (mmol h^{-1}) $2*(S_{n(max)}+S_{n+1(max)})$		BAO/PAO	
Hodnota	N, ↑, ↓	hodnota	N, ↑, ↓	hodnota	N, ↑, ↓	hodnota	N, ↑
diagnóza		diagnóza		diagnóza		diagnóza	

Hodnocení

Porovnání výsledků s <u>fyziologickými hodnotami výdeje HCl u zdravých osob</u> (viz tab.).

Podmínky	Výdej HCl (mmol h^{-1})	Objem sekretu (ml h^{-1})	Titrační acidita (mmol l^{-1})	Aktuální acidita (pH)	BAO/PAO norma < 0,2
Bazální	1 - 4 (BAO)	10 - 100	~ 15	2	
Po stimulaci	10 - 20 (MAO)	150 - 260	~ 15	2	
	10 - 40 (PAO)		50 – 115	1,5 – 2	

↓ **BAO** - karcinom žaludku, příp. i žaludeční vředy (více viz níže)
↑ **BAO** - duodenální vředy, zvláště u Zollingerova-Ellisonova syndromu (recidivující vředová choroba + hypersekrece HCl + gastrinom (nádor produkující gastrin, lokalizován v D-buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu nebo v aberantních G-buňkách duodena, ze 60 % maligní, ze 40 % benigní))

Sekrece silně kyselého žaludečního sekretu parietálními buňkami žaludeční sliznice je způsobena celou řadou mechanických, látkových a nervových podnětů.
Pentagastrinový test: posouzení sekreční funkce sliznice žaludečního fundu po maximální stimulaci injekčním podáním pentagastrinu, výsledek testu odráží množství parietálních buněk.

↓ **MAO (<10mmol h^{-1})** - hypacidita, anacidita (achlorhydrie) - hodnota pH sekretu ani po maximální stimulaci není < 5 - 6, známka závažného poškození žaludeční sliznice, provází dosti pravidelně karcinomy žaludku a perniciózní anémii
↑ **PAO** - hyperacidita, častý průvodní znak vředové choroby dvanáctníku a Zollingerova-Ellisonova syndromu
BAO/PAO > 0,6 - Zollingerův-Ellisonův syndrom (poměr BAO/PAO je ↑, protože i v bazálním podmínkách je gastrin ↑ (produkce nádorem) a stimuluje parietální buňky žaludeční sliznice k sekreci)

12.1.2 Průkaz infekce *Helicobacter pylori* ureázovým testem

H. pylori - gramnegativní (G-) baktérie, ureázou štěpí močovinu na amoniak a oxid uhličitý, amoniak chrání baktérii proti silně kyselé žaludeční šťávě, etiopatogenetický faktor vředové choroby.

Test:
bioptický vzorek + močovina + fenolová červeň → červené zbarvení (↑ pH od NH_3, pozitivní výsledek)
→ žluté zbarvení (neutrální pH, negativní výsledek)

fenolová červeň je v kyselém a neutrálním prostředí žlutá, v alkalickém červená, viz výše

Provedení (viz skripta)

Výsledek (doporučeno hodnotit po 20 min, max. po 3 h):

pozn. falešně negativní výsledek - krvácející vředy, léčba antibiotiky, léčba antacidy
falešně pozitivní výsledek - jiné baktérie při překročení testovacího času 3 h

Další metody průkazu infekce *H. pylori*:
- Detekce specifických genů *H. pylori* (*cagA* nebo *ureC*) v žaludeční šťávě, v žaludeční biopsii, ve stolici pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce).
- Dechový test s ureou, úloha 12.3.
- Histologické vyšetření bioptických vzorků.
- Stanovení protilátek v séru.
- Vyšetření antigenu *H. pylori* ve stolici.

Pro průkaz je optimální vyšetření nejméně dvěma metodami.

Ke studiu:
Další vyšetření žaludku
Vyšetření gastrinu v séru (normální hodnota nalačno 25 - 115 pg ml^{-1} = 25 - 115 ng l^{-1})
- stanovení metodou RIA (radioimunoanalýza)
mnohonásobně ↑ gastrin (>200 pg ml^{-1} často i >1000 pg ml^{-1}) - gastrinom (nádor pankreatu nebo duodena produkující gastrin), způsobuje Zollingerův-Ellisonův syndrom;
↑ gastrin → zmožení krycích buněk → ↑ sekrece HCl → četné vředy, ztížení neutralizace duodenálního obsahu → inaktivace pankreatických enzymů → osmotické průjmy způsobené nerozštěpenými složkami potravy

12.2 Laboratorní vyšetření u onemocnění pankreatu

Vyšetření při akutní pankreatitidě

Akutní pankreatitida je život ohrožující onemocnění, protože dochází k aktivaci proteolytických enzymů přímo v produkujících buňkách pankreatu, což vede k jeho destrukci.

Stanovované pankreatické enzymy v séru na potvrzení diagnózy:

- α-amyláza (AMS) - vzestup během 3 - 12 h po nástupu choroby, ≥5×↑ hodnoty, $t_{½}$* = 6 - 12 ⇒ hladina v krvi rychle klesá, AMS lze prokázat i v moči, ↑ hladiny se o několik hodin opožďuje za ↑ aktivity v séru
- pankreatická lipáza (LPS) - vzestup aktivity paralelně s aktivitou amylázy

Vyšetření při chronické pankreatitidě

Chronická pankreatitida je onemocnění při kterém postupně zaniká tkáň zajišťující funkce pankreatu a je nahrazována pojivem. Snížená činnost pankreatu se prokazuje přímými a nepřímými funkčními testy.

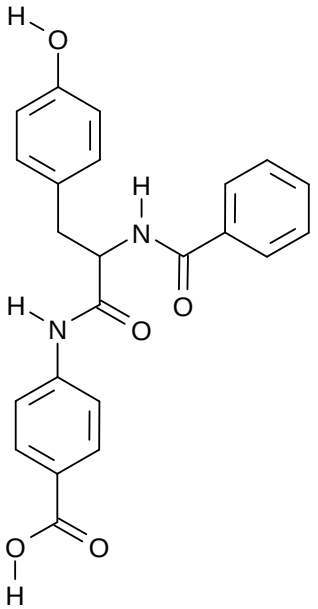
Přímý test: **sekretin-pankreozyminový test**

- 12 h lačnit
- zavést sondu do duodena a odčerpat obsah
- podat sekretin i.v. 1 j./kg tělesné hmotnosti (stimulace sekrece pankreatické šťávy, především jejího množství a produkce hydrogenuhličitanu)
- v krátkých intervalech odčerpat duodenální šťávu (1. sběrné období 30 - 60 min)
- na konci 1. sběrného období podat pankreozymin (=cholecystokinin), ↑ sekrece pankreatických enzymů, kontrakce žlučníku
- znovu odčerpat duodenální šťávu (2. sběrné období)
- stanovit v duodenální šťávě: 1. sběrné období - V, c(HCO_3^-)
  2. sběrné období - aktivita pankreatických enzymů
- c(HCO_3^-) < 90 mM - chronická pankreatitida

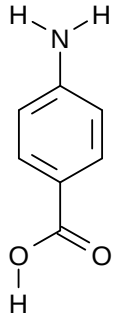
Nepřímý test: **NBT-PABA test (bentiromidový test)***

- podat NBT-PABA p.o. (chymotrypsin z něj v tenkém střevě odštěpí *p*-aminobenzoovou kyselinu (PABA))
- stanovit PABA po hydrolýze konjugátu s glukuronátem v 6h sběru moči (PABA se ve střevě resorbovala do krve a pak se vyloučila močí jako konjugát s glukur.)
- vyloučení močí <30 % podaného množství PABA - pankreatická insuficience

* $t_{½}$ = biologický poločas, NBT-PABA (=bentiromid) - chem. *N*-benzoyl-L-tyrosyl-*p*-aminobenzoová kys.



NBT-PABA (=bentiromid)
(*N*-benzoyl-L-tyrosyl-*p*-aminobenzoová kyselina)



PABA (=*p*-aminobenzoová kyselina)

(konjuguje s glukuronovou kyselinou v játrech pomocí amino nebo karboxylové skupiny, po hydrolýze konjugátu v kyselém prostředí je možno PABA stanovit v moči fotometricky diazotační a kopulační reakcí)

12.3 Dechové testy v gastroenterologii

Stanovují poměr $^{13}CO_2/^{12}CO_2$ (dCO_2) ve vydechovaném vzduchu po perorálním podání látky značené izotopem ^{13}C*. Podávaná značená látka je specifickým substrátem enzymu, jehož aktivita je mírou detekované funkce.

Metody stanovení dCO_2:

- IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry) - izotopová poměrová hmotnostní spektrometrie, stačí několik μl vzduchu, drahá metoda
- NDIRS (Nondispersive Isotope-selective Infrared Spectroscopy) - bezrozptylová izotopově selektivní infračervená spektroskopie, založená na rozdílném absorpčním maximu obou izotopů uhlíku v oblasti 4350 nm infračerveného spektra, je třeba 10 - 100 ml vzduchu, analyzátory jsou řádově levnější, menší, nevyžadují speciální obsluhu, vyšetření se prování v režimu POCT (Point Of Care Testing) - vyšetřování v místě péče o nemocného
- optogalvanický jev (využívá analyzátor LARA) - plyn v trubici s elektrodami je ozařován laserem, současně se plynule mění vlnová délka světla, v okamžicích absorpce světla plynem prudce narůstá proud procházející obvodem, průběh proudu v závislosti na vlnové délce je absorpční spektrum plynu, které se u $^{12}CO_2$ a $^{13}CO_2$ liší

Dechové testy pro testování funkce pankreatu

Substráty jsou látky štěpitelné pankreatickou lipázou, např. [^{13}C]MTG ([^{13}C]mixed triglycerid) je triacylglycerol s [^{13}C]oktanoátem v poloze 2 a stearátem v poloze 1 a 3. Po rozštěpení pankreatickou lipázou podléhají mastné kyseliny β-oxidaci a $^{13}CO_2$ pocházející z [^{13}C]oktanoátu je vylučován ve vydechovaném vzduchu.

* ^{12}C a ^{13}C jsou stabilní izotopy uhlíku, jejich zastoupení v uhlíku je 98,892 % a 1,108 %.

Provedení testu:

- nalačno, vysadit pankreatickou substituci nejméně 24 h před začátkem testu
- odebrat vzorek vzduchu před podáním testovacího pokrmu
- nepřímá stimulace testovacím pokrmem (kukuřičný chléb s 50 g tuku do kterého je přidáno 100 mg [^{13}C]triacylglycerolu)
- odebírat vzorky vzduchu po dobu 6 h ve 30 min nebo 60 min intervalech
- vyhodnocení: kumulativní výdej za 6 h, který v procentech k podanému substrátu vyjadřuje míru pankreatické insuficience

Detekce *Helicobacter pylori* dechovým testem

[^{13}C]UBT ([^{13}C]Urea Breath Test) - dechový test s močovinou značenou uhlíkem ^{13}C je dnes považován za zlatý standard průkazu infekce způsobené *Helicobacter pylori*. Detekuje se značený oxid uhličitý vzniklý štěpením značeného substrátu (močoviny) povrchovým enzymem ureázou baktérie *Helicobacter pylori*. Metoda z roku 1987 má řadu modifikací lišících se množstvím podaného substrátu (50 - 100 mg), podáním roztoku citronové kyseliny nebo přírodního pomerančového džusu, časovým intervalem odběru vzorků vydechovaného vzduchu.

Evropský standardní protokol provedení testu:

- nalačno (nejméně 2 h nejíst, nepít, nekouřit)
- odebrat 2 nebo 3 vzorky vydechovaného vzduchu do zkumavek (nutno zachytit vzduch z konečné fáze vydechnutí)
- vypít 200 ml roztoku citronové kyseliny nebo přírodního neslazeného pomerančového džusu
- za 5 - 10 min podat 100 mg [^{13}C]močoviny (dětem poloviční dávku 50 mg)
- přesně za 30 min odebrat 2 nebo 3 vzorky vydechovaného vzduchu do zkumavek stejným způsobem jako na začátku testu
- analýza vzorků technikou IRMS
- varianta protokolu pro IR-POCT* analyzátory se liší pouze v tom, že vzorky vydechovaného vzduchu jsou odebírány do sáčků z hliníkové fólie a jsou analyzovány ihned v ambulanci nebo laboratoři a výsledek testu je znám již během 10 minut

12.4 Test na okultní krvácení v zažívacím traktu

Okultní (skryté) krvácení je ranným příznakem závažných onemocnění tlustého střeva. Umožňuje včasné odhalení kolorektálního karcinomu v počátečních stádiích choroby, kdy mikroskopické krvácení může být dlouho jediným příznakem tohoto závažného onemocnění.

Princip detekce stop krve ve stolici:

Detekce hemoglobinu vzniklého hemolýzou krve přítomné ve stolici. Barevná reakce je stejná jako u proužků hemoPHAN, viz CVIČENÍ 9: Vyšetření funkce ledvin II.

* IR = infračervený (infrared), ve spojení IR-POCT se IR myslí infračervená spektroskopie v provedení NDIRS (zkratky POCT a NDIRS jsou vysvětleny na začátku kapitoly 12.3)

Pacient provádí sám odběr vzorků stolice. Drží se striktně návodu pro použití.

Provedení

- 3 dny před odběry nejíst syrové a nedovařené maso, salámy, krev, játra, banány, listovou zeleninu, rajčata, ředkvičky, křen, kedlubny, neužívat vitamin C nebo acetylsalicylovou kyselinu
- 4. den po zahájení diety odebrat 1. vzorek, odebírá se celkem 3 dny po sobě, vzorky se dávají na vyznačená místa odběrových karet, které se uloží do polyethylenových sáčků (vše dle přiloženého návodu)
- v laboratoři zvlčit označenou rubovou část karty kapkou vody, přiložit proužek okPHAN, zbarvení detekční zóny porovnat s barevnou stupnicí (semikvantitativní hodnocení)

Hodnocení

pozitivní nález - <u>může</u> signalizovat skryté stádium kolorektálního karcinomu, nutno provést podrobnější vyšetření gastrointestinálního traktu

<u>Test na okultní krvácení je určen pro bezpříznakové jedince</u> (nemají potíže svědčící pro rakovinu tračníku a konečníku).
U pacientů s příznaky není třeba vyšetřovat test na okultní krvácení, je třeba provést další vyšetření, protože se nemusí jednat o rakovinu tračníku a konečníku.

U kterých rizikových skupin se u praktického lékaře provádí test na okultní krvácení?

- bezpříznakoví jedinci nad 50 let věku - 1× za 2 roky
- bezpříznakoví jedinci nad 40 let věku, příbuzní I. stupně (tj. rodiče, děti a sourozenci) pacientů se zjištěným karcinomem tračníku a konečníku - 1× ročně
- pacientky se zjištěným nádorem prsu, dělohy nebo vaječníku nezávisle na věku - 1× ročně

V případě, že je test negativní, je třeba provést ho znovu za jeden nebo dva roky podle rizikové skupiny, ve které se daný jedinec nalézá a to za předpokladu, že je v průběhu tohoto jedno- nebo dvouročního období i nadále bezpříznakový.

Pravidelné provádění testu u rizikových skupin obyvatelstva v rámci prevence vede ke snížení úmrtnosti na kolorektální karcinom, jehož výskyt v civilizovaných zemích stále stoupá.

Problémy související s tímto tématem

4 1. Která látka je podávána při dechovém testu na průkaz *Helicobacter pylori*? Proč dochází k jejímu štěpení v případě pozitivního testu?

-
-

4 2. Jaký nález (zvýšení, snížení, pozitivní, negativní) byste očekávali u pacientky paní F. s vředovou chorobou duodena? Uvažujte pouze o hodnocení žaludeční šťávy, *Helicobacter pylori* a gastrinu v séru.

- žaludeční šťáva
- *Helicobacter pylori*
- sérový gastrin

4 3. Uveďte, jaká biochemická vyšetření jsou indikována při podezření na akutní pankreatitidu.

-
-

4 4. Uveďte příklady biochemických testů používaných při monitorování chronické pankreatitidy.

-
-

4 5. Při vstupní prohlídce (nástup do nového zaměstnání) byl vyšetřen 30letý muž. Má být součástí prohlídky i provedení testu na okultní krvácení v zažívacím traktu?

-