Datum:	Jméno: Skupina:

CVIČENÍ 5: Vybraná vyšetření u onemocnění jater II – žlučová barviva a albumin

Úvod

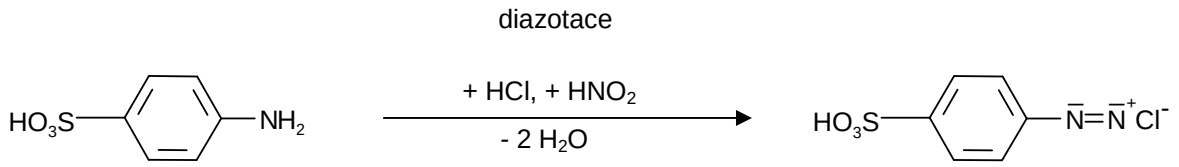
- Biochemické testy měřící kapacitu jater vychytávat endogenní a exogenní látky z cirkulace (žlučová barviva, indocyaninová zeleň).
- Biochemické testy měřící syntetickou činnost jater (prealbumin ($t_{½}$* = 2 dny), transferrin ($t_{½}$* = 3 - 5 dnů), albumin ($t_{½}$* = 19 dnů), CHS*, koagulační faktory).

Žlučová barviva:
- bilirubin (odbouráváním Hb*, menší část odbouráváním jiných hemoproteinů (myoglobin, kataláza, některé cytochromy) = zkratový bilirubin)
- urobilinogen→ oxidační produkt urobilin
- sterkobilinogen → oxidační produkt sterkobilin

Rozdělení bilirubinu:
- nekonjugovaný (toxický, nerozpustný ve vodě, vázaný na albumin ⇒ neprojde do moči)
- konjugovaný (chem. bisglukosiduronát bilirubinu, tvorba v hepatocytech, méně toxický, rozpustný ve vodě, vylučován do žluče)
- δ-bilirubin (po dlouhodobém ↑ konjugovaného bilirubinu ⇒ kovalentní peptidová vazba hlavně na albumin (propionyl bilirubinu neenzymově reaguje s $–NH_2$ skupinou lysinu bílkovin), nefiltruje se do moči, biologický poločas 19 dní jako albumin, míra předchozího trvání konjugované hyperbilirubinemie)

Dělení ikterů (ikterus = žloutenka, žluté zbarvení kůže a sliznic ↑ bilirubinem):
- prehepatální (hemolytický, ↑ nekonjugovaný bilirubin)
- hepatální neboli hepatocelulární (smíšený, ↑ konjugovaný i nekonj. bilirubin)
- posthepatální (obstrukční, ↑ konjugovaný bilirubin)

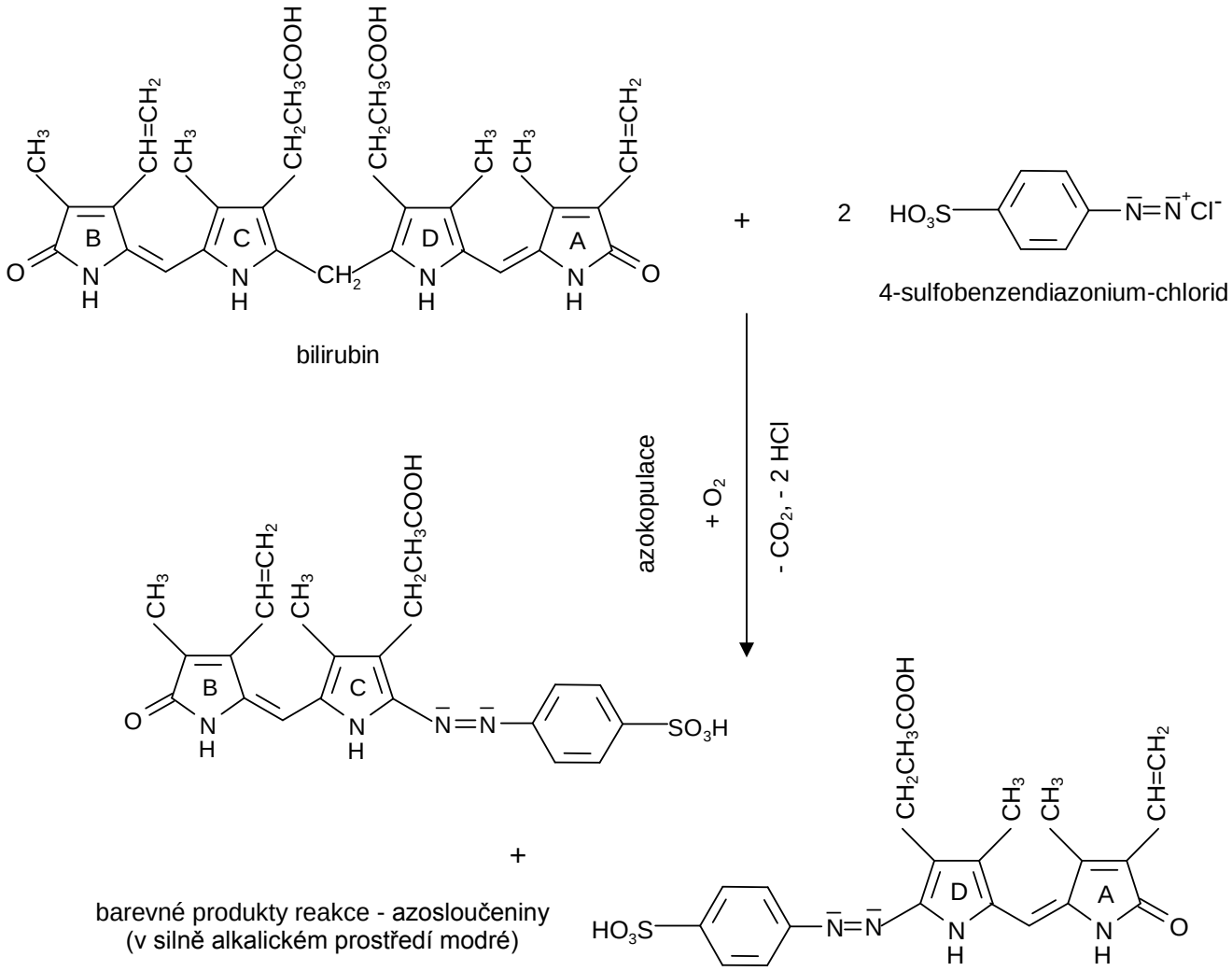
5.1 Stanovení celkového bilirubinu v séru



4-aminobenzensulfonová kyselina (sulfanilová kyselina)

4-sulfobenzendiazonium-chlorid

* $t_{½}$ = biologický poločas, CHS = cholinesteráza, Hb = hemoglobin



pozn. z hlediska reaktivity

- přímý bilirubin - konjugovaný bilirubin rozpustný ve vodě, přímo poskytuje azokopulační reakci
- nepřímý bilirubin - nekonjugovaný bilirubin nerozpustný ve vodě, vázaný na albumin, poskytuje azokopulační reakci jen v přítomnosti akcelerátorů (kofein, benzoát aj.), které ho uvolňují z jeho vazeb na albumin a současně ho solubilizují

reakce v přítomnosti akcelerátorů ⇒ stanoví se celkový bilirubin
reakce v nepřítomnosti akcelerátorů ⇒ stanoví se konjugovaný bilirubin
celkový bilirubin - konjugovaný bilirubin = nekonjugovaný bilirubin

Provedení (viz skripta)

Výpočet koncentrace bilirubinu v krevním séru: $c_x = \frac{A_x}{A_{STD}} * c_{STD}$

A_x.....absorbance vzorku při 605 nm (bezrozměrné číslo)
A_{STD}..... absorbance standardu při 605 nm (bezrozměrné číslo)
c_x..... koncentrace bilirubinu ve vzorku (μmol dm^{-3} nebo-li μmol l^{-1})
c_{STD}.....koncentrace bilirubinu v kalibračním roztoku (μmol dm^{-3} nebo-li μmol l^{-1})

Výsledky:

Hodnocení

Porovnání výsledků s referenčním intervalem sérové koncentrace celkového bilirubinu 5 - 20 μmol l^{-1} (novorozenci starší 1 měsíce a dospělí) a konjugovaného bilirubinu max. 5 μmol l^{-1}. Nekonjugovaný bilirubin 17 - 70 μmol l^{-1} + normální hodnoty ostatních vyšetření ⇒ chronická hemolýza (hemolytická anémie), benigní hyperbilirubinemie Gilbertova typu (↓ aktivity UDP-glukuronyltransferázy). Fyziologická postnatální hyperbilirubinemie - donošení novorozenci ve 2. - 3. dnu života mohou mít: nekonjugovaný bilirubin až 135 μmol l^{-1}, celkový bilirubin do 170 μmol l^{-1}, rychlá normalizace na hodnoty dospělých. (dopiš hodnocení a závěr)

Ke studiu: význam stanovení bilirubinu v diagnostice hepatobiliárního poškození

Bilirubin - diagnostický test u chronických jaterních chorob především provázených cholestázou.

Poškození hepatocytu - porušeno vychytávání, konjugace a následně exkrece bilirubinu do žluči ⇒ bilirubin v moči, urobilinogen v moči (poškoz. hepatocyty ho všechen nevychytají z portální krve).

170-500 μmol l^{-1} bilirubin - obstrukce žlučových cest nekompletní i kompletní (při kompletní nejde žádný bilirubin do střeva ⇒ urobilinogen (Ubg) se netvoří ⇒ negativní Ubg v moči, acholická stolice

Určení typu hyperbilirubinemie: poměr nekonj. a konj. bilirubinu v séru, další jaterní testy, vylučování bilirubinu a jeho derivátů do moči, množství žlučových kyselin v krvi aj. **Žlučové kys.** - senzitivní ukazatel u jaterních cirhóz (citlivější než vyšetření AST), nejvyšší hodnoty u primární biliární cirhózy a primární sklerotizující cholangoitidy.

Diferenciálně diagnostické poznámky ke **zvýšené hladině bilirubinu** (výběr):

Virová hepatitida: nekomplikovaný průběh **5-10×**↑, cholestatický průběh **10-20×**↑

Cholestáza: **5-10×**↑ (současně ↑ ALP, GMT), až **20×**↑ (při současném rozpadu erytrocytů nebo ↓ glomerulární filtrace)

Cirhóza jater: **lehké** ↑ (aktivní forma), **horní hranice bilirubinu** (inaktivní forma)

Primární biliární cirhóza: **10×**↑ (později než ↑ enzymů ALP a GMT), rovněž ↑ IgM, v 90 % případů autoprotilátky proti mitochondriím

5.2 Zjištění bilirubinu v moči

V detekční zóně diagnostického proužku pro bilirubin je stabilní diazoniová sůl, která s konjugovaným bilirubinem (jiný v moči není) poskytuje azokopulační reakcí barvivo azobilirubin.

Pozor: bilirubin se působením světla rozkládá a na vzduchu se snadno oxiduje ⇒ používat čerstvou moč.

Provedení (viz skripta)

Výsledek (semikvantitativní) a hodnocení:

Hodnocení

Negativní výsledek - zdravý člověk (může být nepatrné množství až 0,5 μmol l^{-1} bilirubinu v moči běžnými zkouškami neprokazatelné)

Pozitivní výsledek - při ↑ konj. bilirubinu v plazmě nad 30 μmol l^{-1},

1) neschopnost hepatocytů vyloučit konjugovaný bilirubin do žluče ⇒ <u>hepatocelulární (hepatální) hyperbilirubinemie</u>,
2) uzávěr žlučových cest ⇒ <u>obstrukční hyperbilirubinemie</u>

Ale dlouhodobé trvání konjugované hyperbilirubinemie ⇒ δ-bilirubin (neprochází do moče) ⇒ negativní výsledek.

5.3 Zjištění urobilinogenů v moči

V detekční zóně diagnostického proužku pro urobilinogen je stabilní diazoniová sůl, která s urobilinogenem v kyselém prostředí poskytuje azokopulační reakcí červené azobarvivo.

bilirubin (ve žluči) → do tl. střeva - bakteriální redukce na **urobilinogen (Ubg)** (bezbarvý)

urobilinogen - většina vstřebání do krve → do jater - odbourání
- nepatrná část vyloučena močí (4 μmol den^{-1})
- neresorbovaný zbytek vyloučení stolicí (přeměna na zlatožlutá barviva stolice urobilin a sterkobilin)

Pozor: podobně jako bilirubin se i urobilinogen působením světla rozkládá a účinkem vzdušného kyslíku se oxiduje na urobilin ⇒ používat čerstvou (do 2 h) zchladlou moč (vhodná je polední nebo odpolední moč).

Provedení (viz skripta)

Výsledek (semikvantitativní) a hodnocení:

Hodnocení

Horní mez fyziologické koncentrace urobilinogenu v moči je přibližně 17 μmol l^{-1}
↑ urobilinogen - citlivá známka **funkčního zatížení** nebo **nedostatečnosti hepatocytů**
- neschopnost vychytat z krve a přeměnit většinu urobilinogenu resorbovaného v tlustém střevě

funkční zatížení - značná fyzická zátěž, jednorázové požití větší dávky ethanolu, nadměrná hemolýza
poškození jaterních buněk - virový zánět, toxické poškození (též u horečnatých stavů), nádory jater

- urobilinogen - úplná obstrukce žlučových cest ⇒ acholická stolice
(urobilinoidy) - chybění střevní mikroflóry ⇒ stolice do oranžova, na vzduchu zelená (novorozenci, terapie někt. antibiotiky)
- zrychlená pasáž (průjmy)

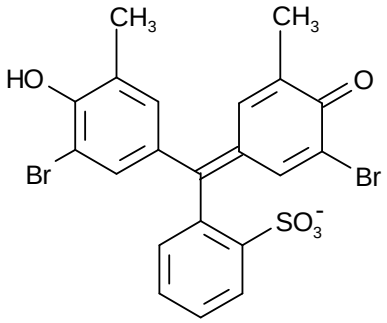
Nález vždy zpřesnit jaterními testy, zkouškou na bilirubin v moči.

Ke studiu: typy ikteru podle vztahu příčiny k funkci jater a laboratorní nálezy v séru a v moči

Typ ikteru	**Bilirubin**				**Ubg**	**ALT**	**ALP**	**Pozn.**
	sérum, nekonj.	sérum, konj.	moč, konj.	stolice deriváty	moč	sérum	sérum	↑↑
Prehepatální (hemolytický)	↑↑	-	-	polycholická stolice (tmavá)	↑	N	N	LD H_4 (LD_1)↑ retikulocyty ↑
Hepatální ve vrcholu poruchy	↑↑	↑	↑	N ↓	↑↑ ↓ -	↑	↑	LD M_4 (LD_5)↑
Posthepatální (obstrukční)	N	↑↑	↑	acholická stolice	↓ -	N (↑)	↑	GMT↑, ALP↑
Typ nálezu: ↑ zvýšení, ↑↑ výrazné zvýšení, ↓ snížení, - negativní, N normální (fyziologický)								

5.4 Stanovení albuminu v séru

Albumin - syntéza v hepatocytech 14g/den, poločas 19 dní, funkce: onkotický tlak, pufr, transport látek



bromkresolový purpur (BCP)

albumin + BCP → {albumin-BCP}
žlutý zelený komplex

při pH = 5,2 za přítomnosti povrchově aktivních látek (Brij 35)

BCP je acidobazický indikátor, přechází ze žluté do modré při pH = 5,2 - 6,8. BCP tvoří s albuminem komplex ochotněji než s dalšími bílkovinami ve vzorku. Při navázání albuminu na BCP jeví BCP proteinovou chybu - nabude zbarvení odpovídající vyšší hodnotě pH než udržuje pufr. Absorpční maximum komplexu je mimo oblast v níž absorbují bilirubin a hemoglobin.

Provedení (viz skripta)

Výpočet hmotnostní koncentrace albuminu v krevním séru: $\rho_x = \frac{A_x}{A_{STD}} * \rho_{STD}$

A_x.....absorbance vzorku při 600 nm (bezrozměrné číslo)
A_{STD}..... absorbance standardu při 600 nm (bezrozměrné číslo)
ρ_x..... hmotnostní koncentrace albuminu ve vzorku (g l^{-1})
ρ_{STD}..... hmotnostní koncentrace albuminu v kalibračním roztoku (g l^{-1})

Výsledky a hodnocení:

Hodnocení

Porovnání výsledků s referenčním intervalem sérové koncentrace albuminu 35 - 53 g l^{-1}.
↑ albumin - obvykle dehydratace
↓ albumin - ↓ proteosyntéza v játrech, nadměrné ztráty albuminu (rozsáhlé popáleniny, chronické záněty trávícího ústrojí), změna distribuce (únik do ascitu), vzhledem k poločasu 15 - 20 dní neklesá u akutních poruch
↓ albumin - postupný pokles + ↑ γ-globulinů = chronické jaterní choroby
↓ albumin - se současným vzestupem β-globulinů je u pokročilých cholestáz

chronické hepatální choroby - albumin lehce ↓
cirhóza - nízká hodnota pod 30 g l^{-1} (projev ↓ činnosti hepatocytů)

Ke studiu: další testy na proteosyntézu v hepatocytech

Cholinesteráza (CHS). CHS je v řadě orgánů, má několik izoenzymů. Celková CHS (také pseudocholinesteráza) je převážně jaterního původu, fyziologická funkce je nejasná. Ref. interval CHS: 65 - 200 μkat l^{-1}.
mírné ↑ **CHS** - akutní virová či toxická hepatitida
výrazné ↓ **CHS** - chronická hepatitida, cirhóza, novotvary jater, infiltrativní procesy (pokles koreluje s poklesem albuminu a hemokoagulačních faktorů), náhlý pokles u uvedených nemocnění je nepříznivé znamení (prognostický význam); také otrava organofosfáty, thiofosfáty, některými léky, *Amanita phalloides* (muchomůrka zelená)

Hemokoagulační faktory. Většina je jich syntetizována v játrech. Mají krátké poločasy, proto podléhají rychlým změnám. Používá se Quickův test (protrombinový čas) - zachycuje aktivitu zevního srážecího systému, výsledek se vyjadřuje hodnotou INR (international normalized ratio). Ref. interval INR: 0,8 -1,2. Význam stanovení: 1) monitorování antikoagulační terapie kumarinovými antikoagulancii, 2) vyšetření funkcí jater (schopnost proteosyntézy).
↑ **INR** - jaterní cirhóza, déle trvající obstrukční ikterus (malabsorpce vitaminu K), antikoagulační terapie.

Problémy související s tímto tématem

4 1. Paní G. je hospitalizována s podezřením na obstrukční ikterus. Která z biochemických vyšetření, s nimiž jste se seznámili, mohou přispět k potvrzení této diagnózy? Jaké hladiny stanovovaných parametrů (↑ zvýšené, N normální, ↓ snížené) lze očekávat?

-
-

4 2. Naznačte, jaké hladiny (↑ zvýšená, N normální, ↓ snížená) některých jaterních parametrů stanovovaných v séru (ALT, AST, CHS, albumin) je možné sledovat u alkoholika s prokázanou jaterní cirhózou.

- ALT: v klidové formě cirhózy je N nebo jen lehce ↑
- AST:
- AST/ALT:
- CHS:
- albumin:

4 3. Uveďte, podle kterých parametrů stanovovaných v séru a v moči můžete rozlišit mezi sebou dva typy hyperbilirubinemií - hemolytický ikterus a obstrukční ikterus.

- sérum:
- moč:

4 4. U pana S. (28 let) byl při vstupní prohlídce prokázán bilirubin v moči. Jaká další vyšetření by měla být provedena? Budou-li negativní, co mohlo být příčinou nálezu v moči?

- Další vyšetření moči:
- Další vyšetření séra:
-