

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Specializace ve zdravotnictví

Zdravotnická technika



Martin Leitner

Monitorování kompenzace u pacientů s cystinurií
spektrofotometrickou metodou

Monitoring compensation of patients with cystinuria by
spectrophotometric method

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí závěrečné práce: Ing. Petr Chrastina

Datum obhájení práce:

Praha, 2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby tato závěrečná práce byla archivována v Ústavu vědeckých informací 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům. Za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v Digitálním repozitáři Univerzity Karlovy v Praze (<http://repozitar.cuni.cz>). Práce je zpřístupněna pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze

Souhlasím – Nesouhlasím

V Praze dne:

.....
podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucímu své bakalářské práce Ing. Petrovi Chrastinovi za jeho čas a ochotu při konzultacích nad vznikajícím textem této práce. Též bych rád poděkoval primárce MUDr. Sylvii Šťastné, CSc. za věcné připomínky a za možnost podílet se na výzkumné činnosti v rámci Ústavu dědičných metabolických poruch.

Identifikační záznam

LEITNER, Martin. *Monitorování kompenzace u pacientů s cystinurií spektrofotometrickou metodou* . Praha, 2010. 41 s. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta

Summary

The presented bachelor's thesis deals with the issue of cystinuria, hereditary metabolic disorder of transport of dibasic amino acids. The objective of the thesis was to select a spectrophotometric method of determining cystine in urine, to find the most suitable conditions for determining cystine in a clinical laboratory and to apply the method on samples of urine of patients with cystinuria. For determining cystine in urine, the method using coloured red and violet product of cystine reaction was selected after reduction to cystine with ninhydrin agent in acid environment.

Absorption spectra of standard of cystine and urine in a patient with cystinuria were measured with the maximum at 560 nm. Interference of ornithine and other amino acids was excluded.

Kinetics of reduction of cystine to cysteine was measured. The most suitable time of reduction is 5 minutes, in longer time cysteine is oxidized to cystine.

Kinetics of creation of a coloured product was measured. The maximum absorption in heating the reaction mix with ninhydrin to 100°C was reached after 10 minutes, later only degradation processes and absorbance reduction takes place.

Stability of a coloured product of reaction in light was tested. The product is stable for ten minutes, then absorbance drops by 8% after 45 minutes.

Linearity of dependence of absorbance of a coloured reaction product on cystine concentration from 0 - 834 µmol/l was assessed.

The method repeatability and reproducibility was tested. The variation coefficient of repeatability in the series was 0.2% and the variation coefficient of reproducibility between the series was 1.7%.

The results of the spectrophotometric method in patients with cystinuria correlate well with the results of ion-exchange chromatography at an automatic analyzer.

Key words: cystine, cystinuria, urolithiasis, ninhydrin

Shrnutí

Předložená bakalářská práce se zabývá problematikou cystinurie, dědičné metabolické poruchy transportu dibazických aminokyselin. Cílem práce bylo vybrat spektrofotometrickou metodu stanovení cystinu v moči, nalézt nejvhodnější podmínky pro stanovení cystinu v klinické laboratoři a aplikovat metodu na vzorky močí pacientů s cystinurií. Pro stanovení cystinu v moči byla zvolena metoda využívající barevný červenofialový produkt reakce cystinu po redukci na cystein s ninhydrinovým činidlem v kyselém prostředí.

Byla změřena absorpční spektra standardu cystinu a moči pacienta s cystinurií s maximem při 560 nm. Byla vyloučena interference ornitinu a dalších aminokyselin.

Byla proměřena kinetika redukce cystinu na cystein. Nejvhodnější dobou redukce je 5 minut, při delší době již dochází k oxidaci cysteinu na cystin.

Byla proměřena kinetika tvorby barevného produktu. Maxima absorbance při zahřátí reakční směsi s ninhydrinem na 100 °C se dosáhlo po 10 minutách, dále již dochází k degradačním procesům a poklesu absorbance.

Byla testována stabilita barevného produktu reakce na světle. Produkt je stabilní po dobu deseti minut, poté dochází k poklesu absorbance po 45 minutách o 8%.

Byla ověřena linearita závislosti absorbance barevného produktu reakce na koncentraci cystinu v rozmezí 0 – 834 $\mu\text{mol/l}$.

Byla testována opakovatelnost a reprodukovatelnost metody. Variační koeficient opakovatelnosti v sérii byl 0,2 % a variační koeficient reprodukovatelnosti mezi sériemi byl 1,7 %.

Výsledky spektrofotometrické metody u pacientů s cystinurií dobře korelují s výsledky iontoměničové chromatografie na automatickém analyzátoru.

Klíčová slova: cystin, cystinurie, urolithiáza, ninhydrin

Obsah

Summary	4
Shrnutí	7
1. Úvod	9
2. Současný stav problematiky	10
2.1. Aminokyseliny cystein a cystin.....	10
2.1.1. Rozpustnost cystinu.....	12
2.2. Transport aminokyselin.....	13
2.3. Cystinurie.....	14
2.3.1. Střevní porucha transportu při cystinurii.....	16
2.4. Cystinová urolithiáza.....	17
2.5. Metody stanovení cystinu.....	19
2.5.1. Kvalitativní testy – testy na cystinurii.....	20
2.5.2. Kvantitativní testy - detekce aminokyselin v moči.....	21
2.6. Princip absorpční spektrofotometrie.....	22
3. Experimentální část	24
3.1. Použité chemikálie a reagenční roztoky.....	24
3.2. Použité přístroje.....	25
3.3. Kvantitativní stanovení cystinu v moči.....	26
4. Výsledky a diskuze	29
4.1. Nalezení nejvhodnějších podmínek pro stanovení koncentrace cystinu v moči a validace metody.....	29
4.1.1. Absorpční spektrum cystinu, ornitinu a moči zdravého jedince a pacienta s cystinurií.....	29
4.1.2. Kinetika redukce cystinu na cystein.....	30
4.1.3. Kinetika tvorby barevného produktu reakce.....	31
4.1.4. Stabilita barevného produktu reakce na světle.....	32
4.1.5. Linearita reakce.....	33
4.1.6. Opakovatelnost a reprodukovatelnost.....	35
4.2. Výsledky vzorků pacientů.....	36
4.3. Diskuze.....	38
5. Závěr	40
Literatura	41

1. Úvod

Téma práce se zabývá problematikou kvantitativního stanovení dibazické aminokyseliny cystinu v moči, která se vylučuje ve zvýšené míře při onemocnění zvaném cystinurie. Pro stanovení cystinu v moči byla zvolena metoda využívající barevný červenofialový produkt reakce cystinu po redukci na cystein s ninhydrinovým činidlem v kyselém prostředí.

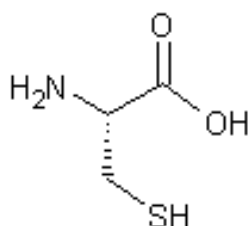
Cystinurie je onemocnění, při kterém se ve zvýšené míře vylučuje v moči dibazická aminokyselina cystin. Při zvýšeném vylučování této aminokyseliny, které je přítomno u pacientů postižených cystinurií dochází ke zvýšenému riziku urolithiázy, vzniku močových kamenů se zdravotními problémy s nimi spojenými.

Předložená bakalářská práce přibližuje problematiku cystinurie, zabývá se nalezením vhodných podmínek pro stanovení dibazické aminokyseliny cystinu a využitím metody pro detekci v klinické praxi s možností jednoznačného monitoringu cystinurie z moče u pacientů, neboť včasné zjištění takto závažného onemocnění je nezbytné jak z hlediska terapeutického, tak z hlediska prevence.

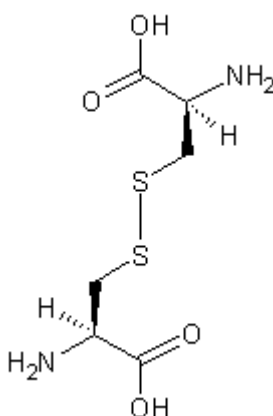
2. Současný stav problematiky

2.1. Aminokyseliny cystein a cystin

Cystein je neesenciální alfa aminokyselina. Cystein je obohacen postranním řetězcem – tzv. thiolovou SH-skupinou. Tato skupina je silně nepolární, tedy ve vodě nerozpustná a tak ovlivňuje celou aminokyselinu, která je řazena mezi aminokyseliny hydrofobní. Thiolová skupina je velmi reaktivní a účastní se řady enzymatických procesů, též velmi ochotně podléhá oxidaci. Typickým příkladem oxidace SH-skupiny je vznik disulfidového můstku obsaženého v cystinu. [2], [12]



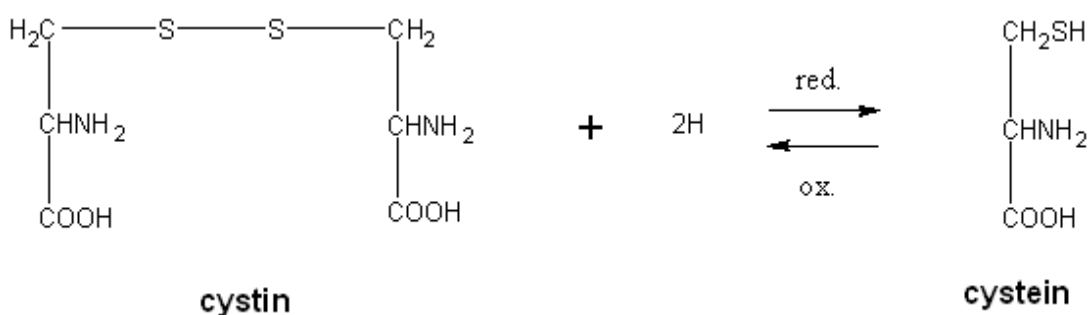
Obr.1 Schéma molekuly cysteinu



Obr.2 Schéma molekuly cystinu se znázorněním disulfidové vazby

Disulfidové můstky hrají důležitou roli ve skladbě a stabilitě mnoha bílkovin, zejména u těch, které jsou secernovány do extracelulárního prostoru. Disulfidové můstky zvyšují stabilitu a odolnost vůči proteolýze. Většina buněčných struktur je především redukujícího charakteru, disulfidové můstky jsou zde velmi nestabilní. Velmi snadno může dojít k redukčním účinkům, které obohacují násobnou vazbu S-S o H₂, dochází k destrukci tohoto můstku a vzniku vazby SH. Naopak v moči je cystein nestabilní a disulfidovým můstkem stabilitu získává, dochází tak k reakci dvou molekul cysteinu, oxidaci postranních thiolových skupin a vzniku cystinu. Viz. obr.3. ^[12]

Enzymem, který katalyzuje reakci vzniku disulfidového můstku je disulfidová isomeráza, enzym zasahující to intramolekulární přeměny. Buněčný transportér, kyselina dehydroaskorbová, transportuje cystein do endoplasmatického retikula, které poskytuje dobré oxidační prostředí. Právě zde probíhá oxidace cysteinu na cystin.



Obr. 3 Schéma redukční reakce cystinu na cystein

2.1.1. Rozpustnost cystinu

Za fyziologických podmínek je cystin a další dibazické aminokyseliny filtrován glomerulem a reabsorbován proximálním stočeným tubulem prostřednictvím vysoce afinitního lumenálního transmembránového kanálu. Cystin je se svou pI 8,3 relativně nerozpustný ve fyziologických hladinách pH moče, které se pohybují v rozmezí 5-7. V moči, jejíž hodnoty pH se pohybují na hranici 7-8 se cystin rozpouští dvakrát až třikrát lépe.^{[1], [2], [9], [12]}

Některé studie se zabývaly čistě právě rozpustností cystinu v závislosti na pH. Rozpustnost cystinu v moči je přibližně 1000 $\mu\text{mol/l}$ při pH 7. Ale rozpustnost značně stoupá s vyšším pH až na 2000 $\mu\text{mol/l}$ i více při pH 7,5 (Dent a Senior).^{[1], [9]}

Další studie odhalují závislost rozpustnosti cystinu na přítomnosti některých iontových sloučenin. Konkrétně vyšší rozpustnost cystinu v moči v přítomnosti chloridu vápenatého, hořečnatého a sodného. Dalším činitelem schopným ovlivnit rozpustnost cystinu jsou močové koloidní makromolekuly. Pokud jsou v moči ve vyšší koncentraci, cystinová rozpustnost se opět zvyšuje, ačkoli je mechanismus tohoto efektu stále nejasný.^[9]

Nejdůležitějšími faktory hrozby krystalizace cystinu jsou: nízké pH, nízká hladina iontových chloridů, samotná počáteční přítomnost krystalů (různého druhu) a nízká hladina močových koloidních makromolekul.

2.2. Transport aminokyselin

Buňky systémů renálních tubulů a střevní mukózy využívají pro svůj transport řadu různých transportních systémů. Každý systém preferuje jinou skupinu aminokyselin s určitými specifickými vlastnostmi fyzikálně-chemickými.^[1]

Dibazická aminokyselina cystin spolu s lysinem, argininem a ornitinem je transportována z lumen střeva nebo ledvinových tubulů do epiteliálních buněk apikálním vysoce afinitním luminálním transportérem (systémem b^{0+}), který směňuje uvedené aminokyseliny za aminokyseliny neutrální.^{[1], [11]}

Dibazické aminokyseliny jsou poté transportovány z epiteliálních buněk do tkání bazolaterálním přenašečem dibazických aminokyselin (systém y^+L) výměnou za neutrální aminokyseliny a sodík.^{[1], [11]}

Oba tyto přenašeče jsou heteroméry složené z těžké podjednotky (N-glykosilovaný membránový protein typu 2) a lehké podjednotky (neglykosilovaný polytropický membránový protein), vázané disulfidickou vazbou.^[1]

Třetí transportní systém pro neutrální aminokyseliny je exprimován pouze na luminálním pólu epiteliálních buněk. Transportuje alanin, asparagin, citrulin, glutamin, histidin, isoleucin, leucin, fenylalanin, serin, threonin, tryptofan a valin dovnitř epiteliálních buněk.^[1]

2.3. Cystinurie

Počátky znalostí ohledně cystinurie spadají do roku 1810, kdy Wollaston poprvé popsal zvláštní, odlišný typ močových kamenů přítomných v močovém měchýři a nazval jej termínem „cystic oxide“. J. Berzelius, jeden ze zakladatelů moderní chemie však poznal, že struktura cystinových kamenů není tvořena oxidem a nazval jej cystinem, neboť tento materiál pocházel z cystického močového měchýře. Dalším významným počinem byl moment, kdy Prout prokázal ledvinový původ cystinu a záhy se přišlo i na jeho šestiboké krystaly nacházené pravidelně v moči cystinuriků. Toel se 1855 pokusil vysrážením krystalů určit množství cystinu vylučovaného v moči cystinuriků a odhadl je na přibližně 1,3 až 1,5 gramu za den. Na první náznaky rodinného výskytu poukázal Niemann (1876). V roce 1908 Sir Archibald Garrod zařadil cystinurii mezi tehdy známé vrozené metabolické vady k alkaptonurii, pentososurii a albinismem. Cystinurie byla první vrozenou aminoaciduríí. V roce 1954 byl studován vliv penicilinu a jeho derivátů.

Tabbarnick spolu s kolektivem spolupracovníků našli jeden z degradačních produktů penicilinu, penicilamin, který při reakci s cystinem tvoří komplex penicilamin - cystein. V roce 1963 Crawhall poprvé využil penicilamin k terapii pacientů s cystinuríí.

Cystinurie je dědičné metabolické onemocnění, které je spojeno s celoživotním rizikem vzniku močových kamenů. Cystinurie je způsobena defektem vysoce afinitního lumenálního transportéru (systémem b^{0+}). Tento defekt má za následek špatné vstřebávání ve střevě i v ledvinách. Za normálních fyziologických podmínek je resorpce cystinu 99 %, nicméně u pacientů s cystinuríí dochází k vylučování 600 – 1400 mg cystinu denně. Koncentrace cystinu může dosáhnout i takové hodnoty, kdy už je narušena jeho rozpustnost a tvoří se cystinové krystaly nebo kameny.

Dle posledních statistických výzkumů je zodpovědná za 1-2 % ledvinových kamenů u dospělých a 6-8 % u dětské populace. Někteří pacienti nemusejí mít

de facto žádné zdravotní problémy. Pokud pacienti problémy mají, jsou obvykle spojené s bolestmi v kaudální části zad, krví v moči (hematurie), leukocyty v moči (pyurie) nebo spontánním odchodem kamenů. Častými zdravotními komplikacemi spojenými s urolithiázou je vznik infekcí či obstrukce močových cest a ve svém konečném důsledku renální insuficience.^{[1], [6], [15]}

Incidence tohoto onemocnění se značně různí, co se týče výskytu v různých populacích, a to v rozmezí 1/7000 do 1/15000. Cystinurie se dle genetických podkladů dá členit do dvou podtypů. A sice typ 1, zaujímající více než 60 % případů, čistě autosomálně recesivní porucha a typ non-1 - cystinurie, dominantně dědičná forma s variabilní možností manifestace. Přenašeči – heterozygoti typu 1 mívají obvykle normální profil přítomných aminokyselin v moči, na rozdíl od typu non-1, kde nacházíme množství cystinu a dalších aminokyselin v rozmezí od normálního k značně zvýšenému.

Typ 1 je způsoben mutací na genu SLC3A1, který je lokalizován na chromosomu 2. Gen kóduje těžkou podjednotku transportéru, rBAT. Dosud bylo popsáno 80 mutací právě tohoto genu.

Typ non-1 je důsledkem mutací v genu SLC7A9, který je lokalizován na chromosomu 19. Gen kóduje lehkou podjednotku cystinového transportéru a doposud bylo popsáno asi 50 mutací.

Transport L–cystinu váčky na membráně kartáčového lemu je na sodíku nezávislý. U pacientů s cystinurií není pohyb cystinu nebo cysteinu z tubulárních buněk do krve postižen.^{[9], [15]}

Podstatou terapie cystinurie je příjem tekutin za účelem zředění moči a tvorba alkalického prostředí k lepší rozpustnosti pro cystin. Cystin se ochotně krystalizuje v kyselém prostředí, naopak v prostředí alkalickém je mnohem rozpustnější (500 mg/l při pH 7,5 naproti 250 mg/l při pH 7,0). Dále omezení příjmu sodíku, jehož vyšší koncentrace způsobuje retenci cystinu. U dospělých se doporučuje příjem 3000 ml rozloženějšího charakteru v průběhu 24 hodin. K tvorbě alkalického prostředí se využívá též substituce Na bikarbonátu, pokud jsou renální funkce nedotčené tak spíše kaliumcitrát (nezasahuje do

metabolismu sodíku), omezení příjmu živočišných bílkovin a aminokyseliny methioninu. Při neúspěchu standardní preventivní metody při existující urolitiáze je přidáván derivát thiolu, účinný ve snížení koncentrace volného cystinu. Možností je též denní dávka D-penicilaminu s minimálním alergickým, ale vyšším rizikem vzniku autoimunitních problémů či obecně problémů renálních. Medikamentózní variantou je Merkaptopropionylglycin s mírným rizikem hyperlipidemie a glomerulopatie či Captopril, i když s nižším účinkem než sloučeniny thiolu.

Možností je též využití invazivních metod. Perkutánní nefrolitomie a extrakorporální litotrypse mají malou účinnost při snaze odstranit cystinové kameny, jelikož jsou poměrně tvrdé. Zůstává zde zachován přístup využití co nejméně otevřených chirurgických metod nejen z hlediska účinnosti ale také rizik s nimi spojených. Jsou spíše doplňující možností v kombinaci s konzervativní prevencí.

2.3.1. Střevní porucha transportu při cystinurii

Vysoko afinitní systém je přítomný na apikálním konci kartáčového lemu jejunu a je odpovědný především za absorpci cystinu a jeho příbuzných dibazických aminokyselin. Mnoho pacientů diagnostikovaných cystinurií má postiženou funkci absorpce cystinu ale klinicky zřetelný nedostatek přítomný není, jelikož absorpce krátkého řetězce aminokyselin není také narušena.

Cystin je absorbován v tenkém střevě podobným mechanismem jako ledvinách. U pacientů s cystinurií je střevní absorpce také postižena a to v různých stupních. Dalším zdrojem ovlivňujícím hladinu cystinu je metabolismus methioninu. ^[11]

2.4. Cystinová urolithiáza

Jedná se o typ lithiázy, u níž je charakteristický model hypersekreční metabolické lithiázy s patogenním vylučováním nespolečného cystinu ve velkých množstvích. Špatná rozpustnost cystinu v moči, díky kyselému prostředí vede k tvorbě velmi úporně se tvořících a opakovaně recidivujících se cystinových konkrementů. Hlavní riziko vzniku urolithiázy závisí na stupni koncentrace, ne na množství v moči obsaženém. V případě lepší rozpustnosti jako je u jiných aminokyselin (např. lysin) by byla cystinurie téměř nevinnou aminoacidurií s nevýznamnými manifestacemi. Trvale zvýšené vylučování cystinu močí pacientů s cystinurií je natolik průkazné, že dovoluje i z jediného náhodného vzorku moče odhalit ohroženou osobu. Významná je i časná manifestace u dětské populace.^{[3], [4]}

Mechanismus vzniku vlastních cystinových konkrementů není plně vyřešen. Zatím jen víme, že transformace běžně vylučovaných malých konkrementů močí v typickou urolithiázu nastává vlivem litogenních faktorů jako je existence kamenotvorných látek (uráty, fosfáty, oxaláty) ve vyšší koncentraci, přítomnost složek schopných tvorby počátečního jádra a nedostatečné množství litogenních inhibitorů. Možná je však teorie narůstání základů konkrementů na nekrotickém plátu sliznice papily, příp. kalcifikace či infekce. Pokud již máme v močovém aparátu splněny podmínky kyselého prostředí, cystin se ochotně sdružuje a vytváří čistě cystinové kameny, ale nejen ty. Také můžeme nalézt kameny smíšené, např. v kombinaci s fosfáty, kyselinou močovou, nebo oxalátem. Zajímavá je i popsána existence cystinových kamenů bez výraznější zvýšené hladiny cystinu v moči.^[4]

Cystinová lithiáza patří mezi relativně vzácné typy lithiáz. Pokud si odmyslíme některé exotičtější typy konkrementů, je po xantinové lithiáze druhá nejméně se vyskytující. Představuje přibližně jen něco okolo jednoho procenta veškeré urolithiázy. Riziko urolithiázy úměrně stoupá s věkem, takže s vyšším věkem riziko při cystinurii se téměř rovná i následně problémům s tvorbou močových konkrementů.^[3]

Většina cystinových konkrementů bývá z čistého L-cystinu. Cystinové konkrementy jsou tmavě žlutavé nebo žlutohnědé, v méně obvyklých případech šedivé barvy. Pokud jsou menších velikostí, bývají průsvitnější podobné vosku, s povrchem spíše hrubým, krystalickým než s hladkým povrchem. Konzistence kamenů je měkká, menší kameny bývají drobivého charakteru, takže zlepšují možnost využití litotrypse. Větší kameny jsou celistvější a drobí se obtížně, vyplňují dutý prostor ledviny. Méně často se skládají z menších částí, spíše jsou jednoduté. Stavba kamenů bývá zrnitě homogenní, někdy jsou na výbrusu patrné lamely a radiálně probíhající pruhy. Jádro je jen výjimečně tvořeno jinou sloučeninou jako např. oxalátem. Častější je obal z fosfátového struvitu, který se tvoří bakteriálním enzymatickým působením na močovinu.

2.5. Metody stanovení cystinu

Všechny chemické metody k zjištění přítomnosti cystinu využívají redukci dibazické aminokyseliny cystinu na monoaminokyselinu cystein a detekci závěrečného produktu. Často je termín „cystin“ mylně chápán jako součet cysteinu a nebo pre - produkt cysteinu. Z praktického hlediska (klinického) je nutné na toho hledisko poukázat. Většina metod je založena na reakci volné thiolové SH- skupiny, obdobně na reakcích thiolové skupiny jiných komponent než je aminokyselina cystein a opětovně průkaz redukovatelných bisulfidů jiných než cystin.^[5]

Rozpustnost cystinu je přibližně desetkrát vyšší v moči než ve vodě. Navíc rozpustnost cystinu je v koncentrované moči značně vyšší než zředěné moči. Tyto faktory mohou do značné míry ovlivnit výsledky vzorků moči, které nám dávají silně pozitivní výsledky na přítomnost cystinu, avšak neprokazují přítomnost močových konkrementů v močovém sedimentu, který se většinou hodnotí mikroskopicky.^[5]

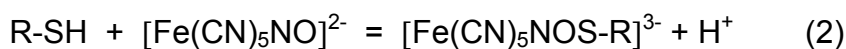
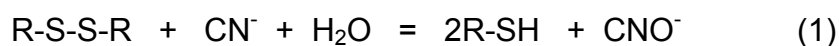
Posun ve výzkumu metod stanovení cystinu zaznamenal fakt, že cystein reaguje s nonadrenochromem za změny barvy růžové na žlutou. I když tato metoda bude měřit cystein, cystin a ostatní bisulfidy obsahující cystein jako např. homocystein, není tato metoda dostatečně citlivá ke kvantitativnímu stanovení cystinu v moči zdravého jedince ale je vyhovující při cystinurii.

2.5.1. Kvalitativní testy – testy na cystinurii

V případě podezření na cystinurii je včasná diagnostika nezbytná aby bylo možno určit terapeutická opatření jak preventivní - nelékové, tak cílené medikamentózní. V této kapitole seznamuji se základními kvalitativními testy na cystinurii a kvantitativními testy detekce samotné kyseliny cystinu, příp. ostatních dibazických aminokyselin v moči.

Zkumavkový kyanid-nitroprusidový test (Brand a spol. 1930)

Kyanid redukuje disulfidové sloučeniny na thioly (1), které podle Brandovy reakce reagují s nitroprusidem za vzniku purpurově zbarveného komplexu (2); při reakci je nutno udržovat pH 7-8:



Test je určen k diagnostice cystinurie resp. homocystinurie s výrazněji zvýšeným vylučováním cystinu resp. homocystinu.

Existují i modifikované verze Brandova testu. Práškové formy: Cystinurie – test Actessa (Lucemburk), Fischlův práškový test 1961, které jsou výhodné svou rychlostí a umožňují okamžitou vizuální analýzu dle přiložené barevné škály. Další modifikací je Cystinognost Fa Heyl - Berlin, kdy se do močového vzorku přidá tableta s nárazníkem Cystinognostu, poté se přidá práškový KCN. Výsledný roztok se po zhruba 15 minutách testuje nitroprusidovým reagenčním papírkem.^[14]

Urocystin – test (Santen, Osaka)1974

Screeningový práškový test na cystinurii. V porovnání s kyano-nitroprusidovým testem je netoxický. Podstatou tohoto testu je redukce močového cystinu zpětně na monoaminokyselinu cystein. Po kontaktu moče a

uvedeného prášku při určité koncentraci cystinu dojde k hnědému zabarvení. Citlivost je však nižší než u Brandovy metody.

Jodido-azidový papírkový test

Pozitivita v tomto testu je čistě orientační. Cystin je detekován při koncentraci nad 0,83 mmol/l, což je koncentrace, které je možné dosáhnout i u jiných aminoacidurií, homocystinurie nebo β -merkaptolaktátdisulfidurie.

Borhydrido - nitroprusidový test (Kelly a spol. 1972)

Výhodně netoxický avšak k rozsáhlejšímu screeningu nehodící se test. Výhodou je též jeho úctyhodná téměř dvojnásobná citlivost oproti Brandovu testu. Reaguje od koncentrace cystinu přibližně na hodnotách 0,3 mmol/l.

2.5.2. Kvantitativní testy - detekce aminokyselin v moči

Polarografická metoda

Detekuje přítomnost disulfidové vazby a SH- skupiny a tudíž určuje množství těchto prvků v moči přítomných. Stanovení tedy není úzce specifické pro určitou aminokyselinu ale pokud máme na mysli cystinurii, jde z 95% o cystin.

AAA - LC s detekcí ninhydrinem

Aminokyseliny vzorku moči se dělí na koloně katexu v systému kapalinové chromatografie, po výstupu z kolony reagují při 120°C s ninhydrinem a barevné produkty jsou detekovány fotometricky při 570 nm, resp. 440 nm. Identifikace a kvantifikace se provádí metodou vnějšího standardu.

2.6. Princip absorpční spektrofotometrie

Absorpční fotometrie je optická metoda, která se zabývá kvantitativním hodnocením změny intenzity záření po průchodu analytickým prostředím. Základním vztahem pro absorpční fotometrii je zákon Lambert – Beerův - Bougerův:

$$\log \frac{\Phi_0}{\Phi} = A = a * c * l$$

Φ_0 - světlo vstupující do měřeného prostředí

Φ - světlo z měřeného prostředí vystupující

A - absorbance

a - absorpční koeficient pro danou vlnovou délku

c - koncentrace roztoku

l - délka optické dráhy

Přístroje, které používají k měření intenzity záření v ultrafialové nebo viditelné oblasti spektra se nazývají spektrofotometry. Spektrofotometry používají mřížkový monochromátor, který dovoluje kontinuálně měnit vlnovou délku měření v širokém intervalu. Všechny spektrofotometry sestávají ze tří základních částí: zdroje zářivé energie, filtru nebo mřížky pro izolaci úzkého pásma vlnové délky a detektor měřícího energii propuštěnou vzorkem. Mezi filtr, resp. mřížku a detektor se vkládá kvjeta s roztokem měřeného vzorku.^[8]

Spekol 11 je jednopaprskový spektrofotometr, který je využíván právě v experimentální části této bakalářské práce. Je vybaven mikroprocesorovou jednotkou. Podle druhu připojené měřící násady se mění druh i jeho použití, k měření nejrůznějších veličin. Zdrojem záření je halogenová projekční žárovka, přijímačem prošlého záření je vakuová fotonka citlivá na modrou (λ : 340 – 620

nm) nebo červenou (λ :620 – 850 nm). Indikace naměřené hodnoty je digitální čtyřmístná.

Záření prochází nejprve kondenzorem a filtrem, který vymezi požadovanou vlnovou délku v rozmezí 340 – 850 nm. Po průchodu kyvetou dopadá zeslabené záření na fotonku, kde dochází k zesílení signálu a jejímu konečnému vyhodnocení na digitální výstup.

3. Experimentální část

3.1. Použité chemikálie a reagenční roztoky

Pro experimentální část této práce byly využity tyto chemikálie:

Bezvodý CH_3COONa , p.a. (Penta, ČR)

CH_3COOH 99%, p.a. (Penta, ČR)

Na_2SO_3 , 98%, (Sigma-Aldrich, USA)

NaOH , p.a. (Penta, ČR)

HCl , p.a. (Penta, ČR)

Ninhydrin (ZMBD Chemik, ČR)

Ornitin, 99%, (Sigma, ČR)

Cystin, 99%, (Fluka, USA)

Reagenční roztoky:

1) Acetátový pufr pH 3,6

a) Octan sodný 2 mol/l

136,0 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ nebo 82,0 g CH_3COONa

bezvodého rozpustit a doplnit destilovanou vodou na objem 500 ml

b) Kyselina octová 2 mol/l

11,4 ml koncentrované naředit a doplnit destilovanou vodou na objem 100ml

Výsledný acetátový pufr: 2 díly a) + 10 dílů b)

Roztok je v ledničce stálý několik dnů

2) Siřičitan sodný

12,6 g Na_2SO_3 bezvodého nebo 25,5 g $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0,2 g NaOH

(resp. 5 ml 1 mol/l NaOH) rozpustit a objem doplnit destilovanou vodou na 100 ml

Roztok je stálý při 4 °C 3 měsíce

3) Ninhydrinové činidlo

250 mg ninhydrinu + 6 ml koncentrované CH_3COOH + 4 ml koncentrované HCl

Činidlo se připravuje vždy bezprostředně před použitím

4) Standard cystinu

20 mg cystinu rozpustíme ve 100 ml 0,1 mol/l HCl. Tento roztok odpovídá koncentraci 834 $\mu\text{mol/l}$. Základní roztok je v lednici stálý 4 týdny.

3.2. Použité přístroje

Pro experimentální část byly využity tyto přístroje:

Automatická pipeta: Acura 825, 0,1-1000 μl , výrobce Socorex Swiss (Švýcarsko)

Termoblok: Techne Dri-block DB-3, výrobce Techne Inc., Bibby Scientific (UK)

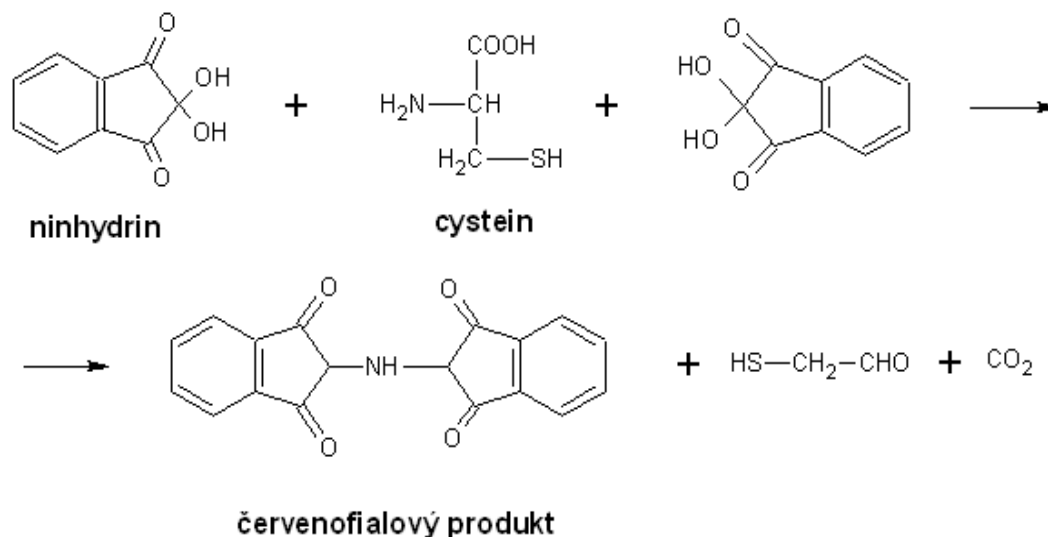
Spektrofotometr: Spekol 11, Carl Zeiss, výrobce Jena (SRN)

3.3. Kvantitativní stanovení cystinu v moči

Princip metody

V první fázi je cystin redukován na cystein siřičitanem. Jedna molekula cystinu poskytuje při své redukci jednu molekulu cysteinu a jednu molekulu soli S- cysteinsulfonové kyseliny. Další disulfidové komponenty, které bývají běžně v moči přítomny, mohou být také redukovány. Ve druhé fázi je k reakci s cysteinem použito ninhydrinové činidlo. Toto činidlo má silné oxidační účinky a oxidativně deaminuje a dekarboxyluje cystein. Výsledkem je barevný produkt, hydrantin, modré až fialové barvy zvaný též Ruhemannův purpur, viz obr. 4. Měříme absorbanci barevného produktu při vlnové délce 560 nm.

Ninhydrin je ve vodě rozpustná sloučenina využívaná ke stanovení aminokyselin.



Obr. 4 Schéma reakce cysteinu s ninhydrinovým činidlem

Materiál

Jednorázová porce moče (např. ranní, večerní). Pro zajištění stability vzorku musí být moč zmrazena na teplotu min. - 20°C a zpracována do tří týdnů.

Postup

Tabulka I Schéma pipetování činidel do zkumavek

	Vzorek	Standard	Slepý vzorek
moč	100µl	-----	-----
standard	-----	100µl	
voda	-----	-----	100µl
acetátový pufr	500µl	500µl	500µl
siřičitan sodný	150µl	150µl	150µl
zkumavky řádně promícháme a necháme 5 minut inkubovat při laboratorní teplotě			
směs po redukci	400µl	400µl	400µl
konc. CH₃COOH	400µl	400µl	400µl
ninhydrin. činidlo	400µl	400µl	400µl
zkumavky uzavřeme a vložíme do termobloku, kde je necháme 10 minut při 100 °C			

Postup pipetování jednotlivých reagensů je zobrazen v tabulce I. První fází je pipetování moče, standardu či destilované vody do zkumavek v uvedených objemech. Dále se do každé zkumavky přidávají: pufr a roztok siřičitanu sodného. Takto získaná směs se řádně promíchá a nechá se pět minut redukovat při laboratorní teplotě. V druhé fázi se do dalších zkumavek napipetuje 400 µl směsi po redukci a postupně přidají reagenty: koncentrovaná kyselina octová a ninhydrinové činidlo. Poté se zkumavky vloží do termobloku. Zde se nechají inkubovat 10 minut při 100 °C. Standard a vzorky již během několika minut získávají vizuálně znatelné červenofialové zbarvení. Po deseti minutách se vyjmou z termobloku a podrobí se spektrofotometrickému měření při vlnové délce 560 nm.

Výpočet koncentrace cystinu ($\mu\text{mol/l}$):

$$C_{\text{cystin}} = \frac{A_{\text{vzorek}} - A_{\text{slepý vzorek}}}{A_{\text{standard}} - A_{\text{slepý vzorek}}} \times C_{\text{standard}}$$

C cystin koncentrace cystinu

C standard koncentrace standardu cystinu

A vzorekabsorbance měřeného vzorku

A slepý vzorek ...absorbance slepého vzorku

A standard absorbance standardu

4. Výsledky a diskuze

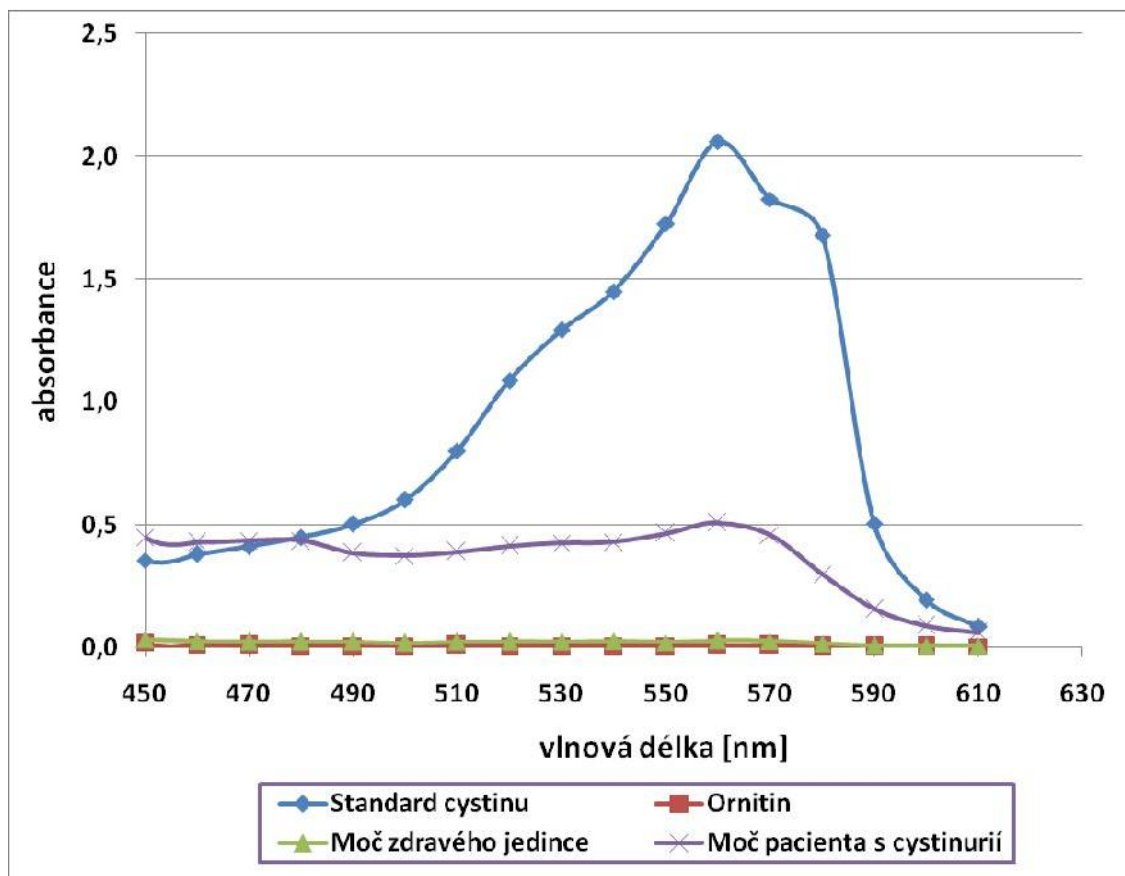
4.1. Nalezení nejvhodnějších podmínek pro stanovení koncentrace cystinu v moči a validace metody

Pro zjištění nejvhodnějších podmínek pro stanovení koncentrace cystinu jsem nejprve sledoval absorpční spektrum barevné sloučeniny vznikající při reakci cysteinu, kinetiku jednotlivých reakcí, stabilitu barevného produktu reakce a metodu jsem následně validoval. Dále jsem zkoumal možnost interference jiné vylučované aminokyseliny v moči pacientů s cystinurií na celkový výsledek absorbance. Využil jsem aminokyselinu ornitin, která je vylučována ve zvýšené míře. Při validaci metody jsem stanovil rozsah linearity, opakovatelnost a reprodukovatelnost měření.

4.1.1. Absorpční spektrum cystinu, ornitinu a moči zdravého jedince a pacienta s cystinurií

Hlavním úkolem tohoto experimentu bylo určit vlnovou délku, při které dochází k maximální absorbanci barevného produktu reakce cysteinu s ninhydrinem, ověřit tuto vlnovou délku v moči pacienta s cystinurií a zjistit zda nedochází k interferenci s ostatními aminokyselinami, jejichž transport je při cystinurii postižen také. K tomuto účelu jsem využil aminokyselinu ornitin.

Absorpční maximum standardu cystinu a vzorku moče jedince postiženého cystinurií je při vlnové délce 560 nm. Aminokyselina ornitin neinterferuje při tomto vyšetření. Výsledné absorbanční křivky jsou graficky zobrazeny na obr. 5.

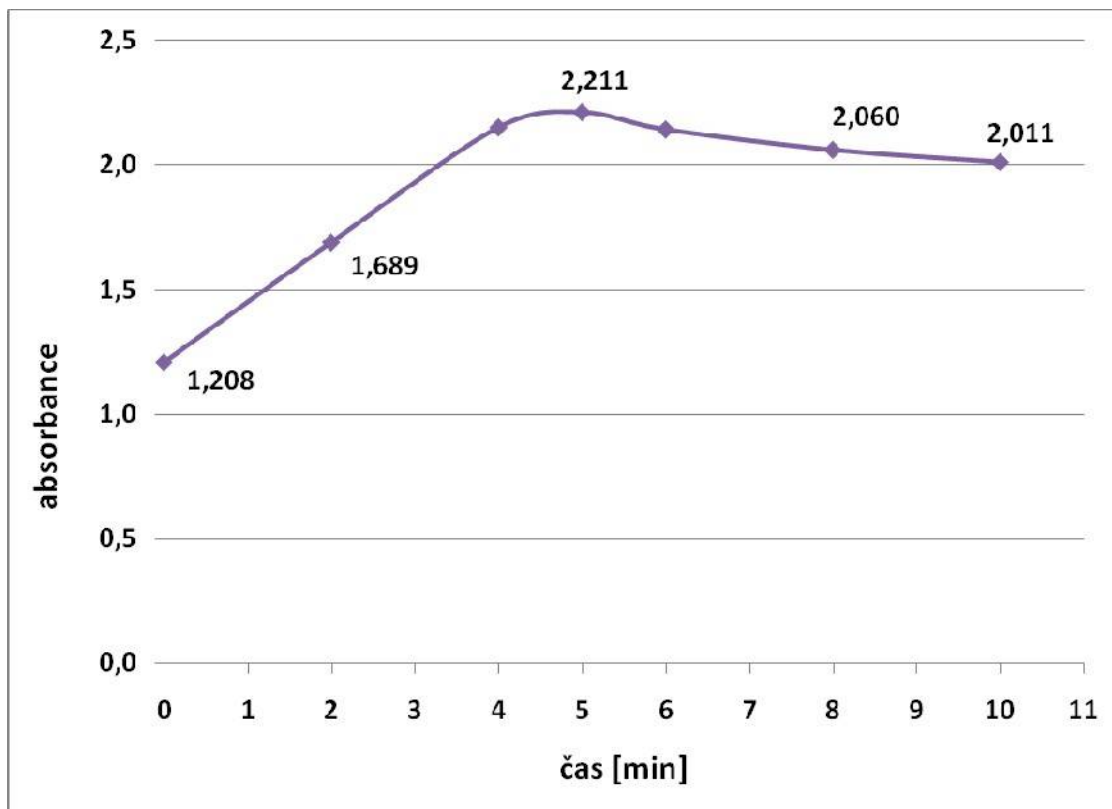


Obr. 5 Absorpční spektrum standardu cystinu, ornitinu, moče zdravého jedince a moče pacienta s cystinurií

4.1.2. Kinetika redukce cystinu na cystein

V první fázi měření dochází k redukci cystinu na cystein. Sledoval jsem kinetiku této reakce po 10 minut. Výsledky jsou graficky znázorněny na obr. 8.

Maxima absorbance a tedy i koncentrace cysteinu se dosáhne po pěti minutách redukční reakce. V čase po 5 minutách, kdy je již vyčerpáno redukční činidlo siřičitan sodný, dochází ke zpětné oxidaci cysteinu na cystin a absorbance klesá. Proto při vlastním stanovení používám dobu redukce 5 minut.

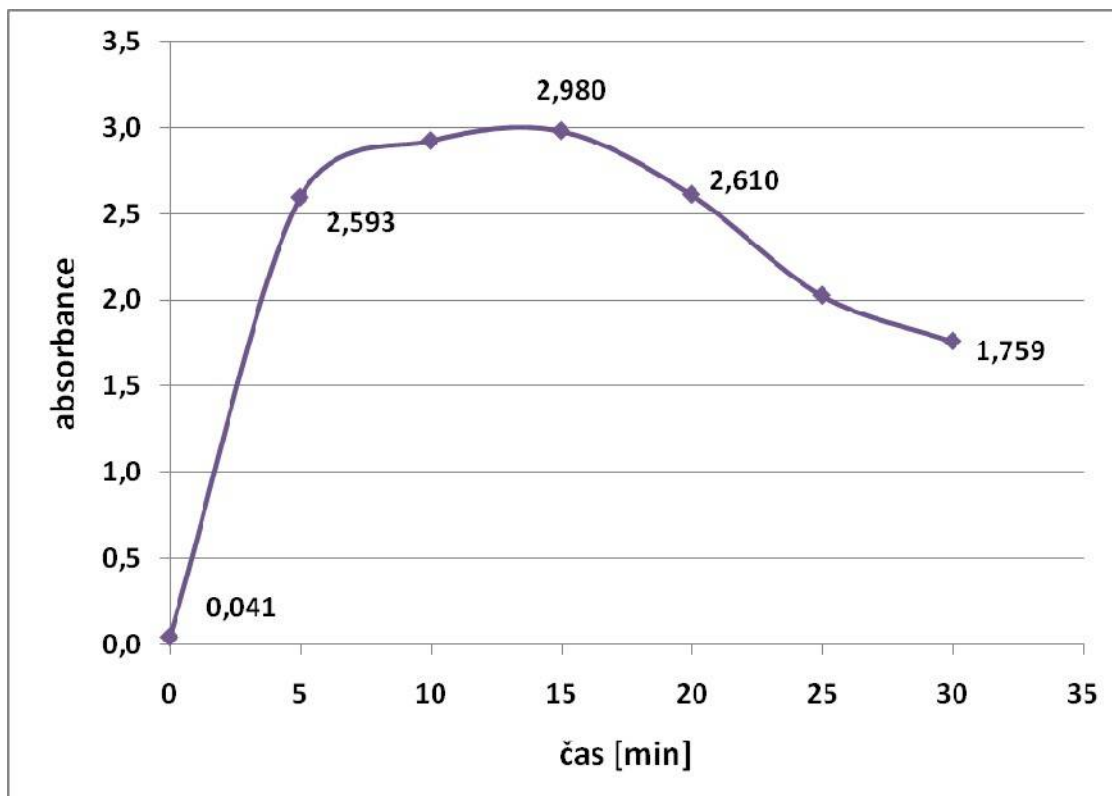


Obr. 8 Kinetika redukce cystinu na cystein

4.1.3. Kinetika tvorby barevného produktu reakce

V druhé fázi měření dochází k reakci cysteinu s ninhydrinovým činidlem při 100 °C. Sledoval jsem kinetiku této reakce na standardu cysteinu v rozmezí 0 až 30 min.

Během prvních deseti minut dochází k tvorbě barevného produktu s maximem absorbance v 15 minutě, ale nárůst mezi 10 a 15 minutou je již minimální. Po 15 minut v termobloku při 100 °C dochází již k tepelné degradaci barevného produktu a tím snížení absorbance. Proto při samotném stanovení jsem použil dobu reakce 10 minut. Záznam průběhu reakce je zobrazen v grafu na obr. 7.

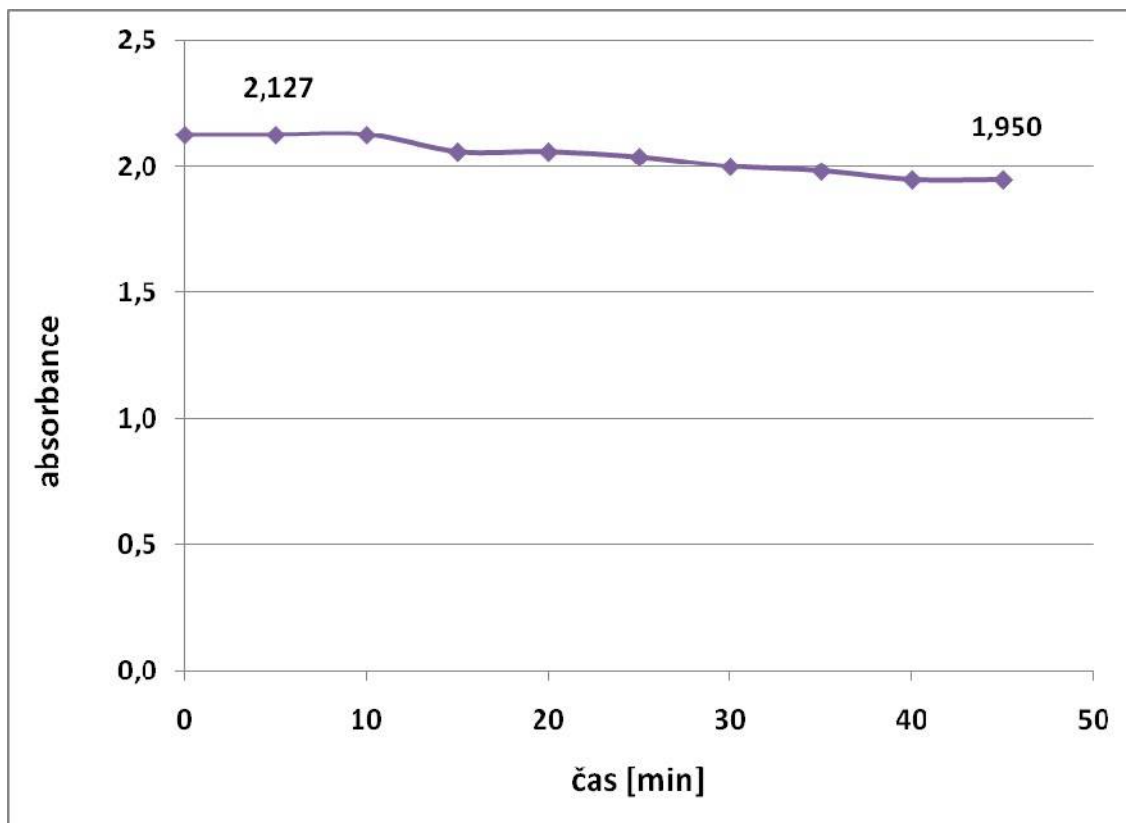


Obr. 7 Kinetika barevného produktu cystinu v termobloku při 100 °C

4.1.4. Stabilita barevného produktu reakce na světle

K zjištění stability výsledného produktu reakce cystinu na světle jsem sledoval závislost absorbance na čase v rozmezí 0 - 45 minut po ukončení reakce.

Výsledky ukazují, že barevný produkt reakce je stabilní po dobu prvních 10 minut po vyjmutí zkumavek z termobloku. Po deseti minutách dochází k degradaci a poklesu absorbance. Po 45 minutách došlo k poklesu absorbance o 8%. Proto při samotném stanovení je nutné změřit absorbance vzorků do 10 minut po ukončení reakce. Graf stability barevného produktu je na obr. 6.



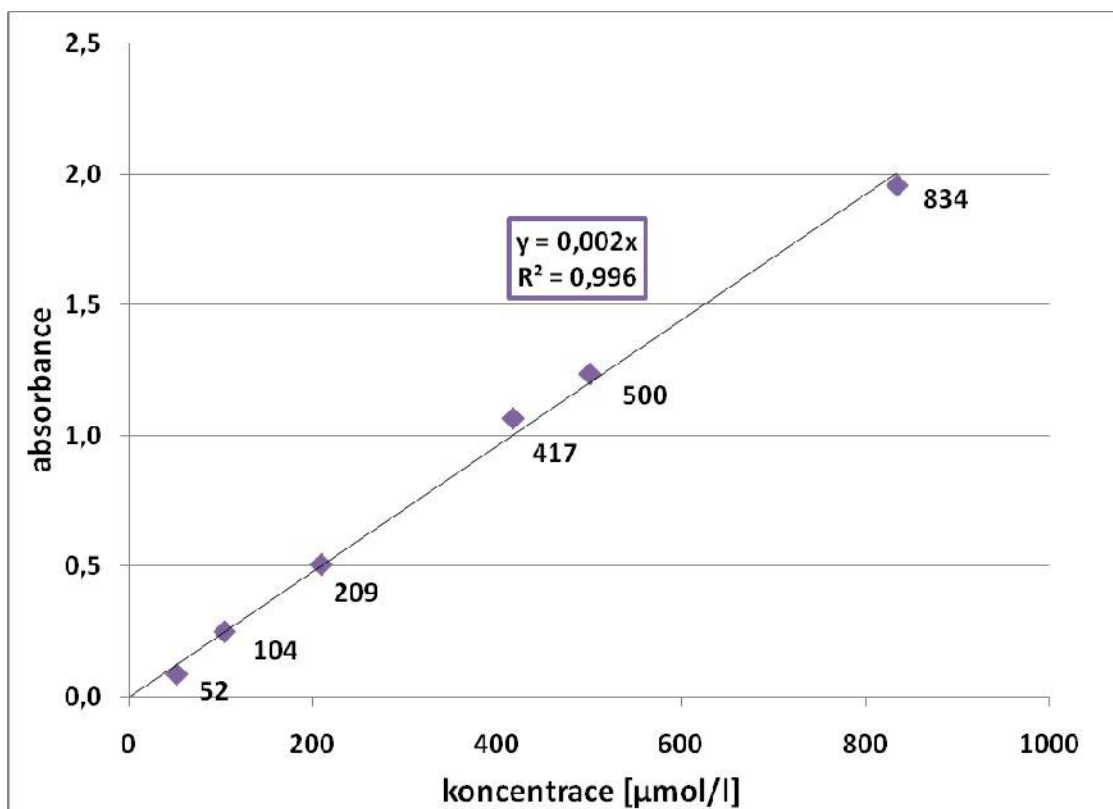
Obr. 6 Stabilita barevného produktu na světle v časovém rozmezí 0 – 45 minut

4.1.5. Linearita reakce

Při tomto experimentu jsem ověřil zda-li se bude absorbance lineárně zvyšovat s rostoucí koncentrací cystinu. Vzorek standardu byl postupně ředěn a to v koncentracích 52, 104, 209, 417, 500 a 834 μl .

Jelikož je hodnota absorbance cystinového standardu z hlediska hodnoty výsledné koncentrace velmi podstatná, ověřil jsem statisticky metodou lineární regrese linearitu závislosti absorbance na koncentraci cystinu.

Záznam výsledků měření a regresní přímka jsou zobrazeny na obr. 9 a tabulce II. Závislost je lineární v rozmezí 0 – 834 $\mu\text{mol/l}$ s korelačním koeficientem 0,998. Proto je pro samotné stanovení možno použít jednobodovou kalibraci.



Obr. 9 Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace cystinu, absorbance byla měřena při 560 nm

Tabulka II: Soubor výsledků měření závislosti absorpance na koncentraci barevného produktu cystinu. Tyto údaje byly použity pro ověření linearity. Tabulka obsahuje hodnoty absorpance měřené při 560nm.

A1, A2naměřené absorpance

y_i..... aritmetický průměr

	Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)					
	52	104	209	417	500	834
A1	0,159	0,318	0,573	1,141	1,299	2,019
A2	0,154	0,320	0,578	1,127	1,310	2,030
y_i	0,157	0,319	0,576	1,134	1,305	2,025

4.1.6. Opakovatelnost a reprodukovatelnost

K vyloučení náhodné chyby v měření jsem využil metodu využívající kvantifikaci výsledku, metodu opakovatelnosti a reprodukovatelnosti.

Pro měření opakovatelnosti, resp. reprodukovatelnosti metody byly použity vzorky Pacient 1, resp. Pacient 4. Každý ze vzorků by změřen desetkrát a byly vypočítány důležité statistické parametry: viz tab. III a IV.

Statistické hodnocení se zaměřuje na stanovení aritmetického průměru y_i , směrodatné odchylky s_A a procentuálního variačního rozpětí CV (%). Opakovatelnost v sérii byla 0,2 % a reprodukovatelnost mezi sériemi byla 1,7 %. Hodnota variačního rozpětí v obou případech nepřevýšila 5% hranici a metoda je tedy dobře použitelná v klinické praxi.

Tabulka III a IV: Vypočtené hodnoty koncentrace barevného produktu Pacient I a IV, statistické parametry souborů.

K1-K10.....koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)
 y_iaritmetický průměr
 S_Avypočtená směrodatná odchylka
CV %.....variační rozpětí (%)

Pacient 1	
K1	369
K2	370
K3	371
K4	370
K5	370
K6	370
K7	371
K8	370
K9	369
K10	370
y_i	370
S_A	0,733
CV %	0,2

Pacient 4	
K1	491
K2	487
K3	492
K4	509
K5	508
K6	512
K7	490
K8	500
K9	502
K10	499
y_i	499
S_A	8,355
CV %	1,7

4.2. Výsledky vzorků pacientů

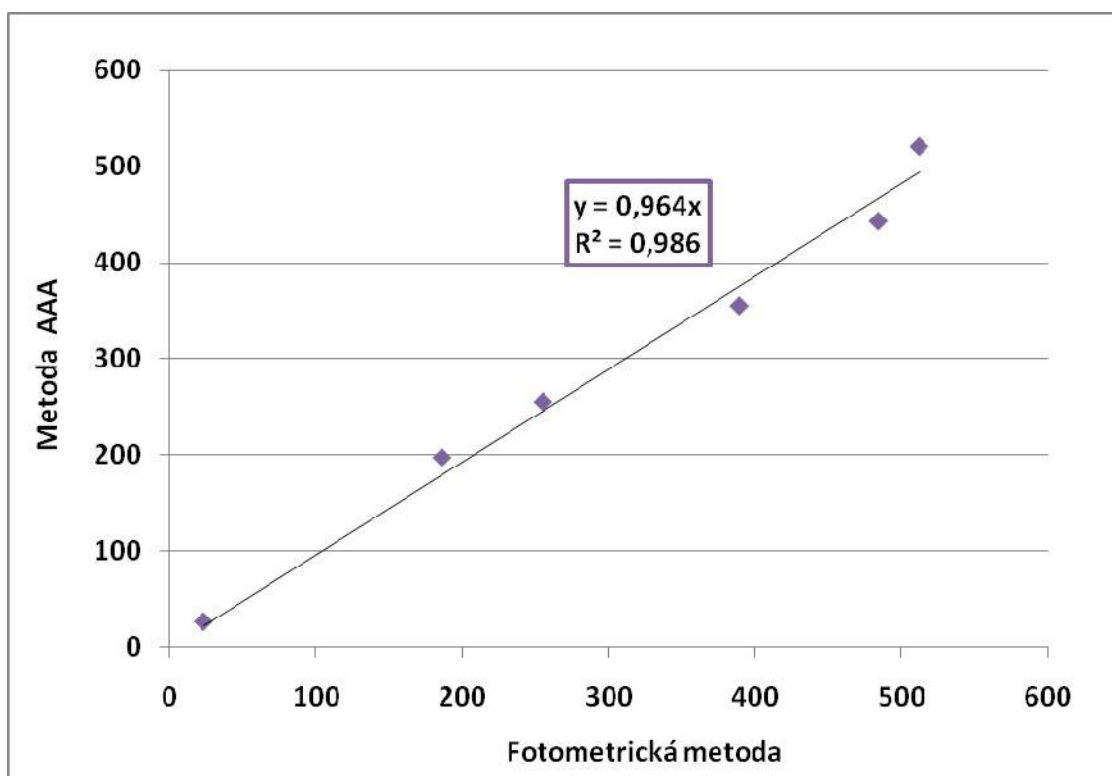
Při posledním experimentálním měření jsem pracoval se vzorky pacientů s cystinurií označenými jako Pacient 1 - 6. V těchto vzorcích jsem stanovil koncentraci cystinu vypracovanou fotometrickou metodou a paralelně byla ve vzorcích stanovena koncentrace cystinu validovanou metodou s využitím automatického analyzátoru AAA 400 (Ingos, ČR).

Výsledky byly přehledně zaznamenány do tab. III. Graf porovnání výsledků obou metod je na obr. 10. Výsledky obou měření spolu dobře korelují s korelačním koeficientem 0,993.

Tabulka III: Vypočtené hodnoty koncentrací a základě naměřené absorbance barevného produktu v porovnání fotometrické metody a metody AAA.

F.....vypočtená koncentrace fotometrickou metodou
 AAA.....koncentrace metodou na analyzátoru AAA 400

Pacient	F	AAA
1	389	355
2	255	255
3	23	26
4	512	521
5	484	443
6	186	197



Obr. 10 Kalibrační graf koncentrací porovnávající fotometrickou metodu a metodu AAA

4.3. Diskuze

Pro monitorování kompenzace pacientů s cystinurií je nutno stanovovat koncentraci cystinu v moči, aby se zabránilo vzniku cystinových kamenů v ledvinách. Za hranici litogenity cystinu v moči pro dobrou kompenzaci pacientů se považuje hodnota 1200 $\mu\text{mol/l}$. Existuje několik metod detekce aminokyseliny cystinu v moči. Jednoduché a rychlé metody většinou používají toxická činidla, zatímco instrumentální metody na automatických analyzátoch aminokyselin nebo HPLC jsou zdouhavé (doba analýzy 100 - 200 minut). Zvolil jsem proto metodu spektrofotometrickou, kdy dochází k redukci cystinu v moči na cystein a následně k reakci s ninhydrinem za vzniku červenofialového produktu, jehož absorbance je lineárně úměrná koncentraci cystinu. Tato metoda je rychlá a nepoužívá žádné toxické reagenty.

Nejdříve jsem se zaměřil na optimalizaci a validaci spektrofotometrické metody pro stanovení cystinu v moči.

Absorpční maximum barevné sloučeniny vznikající reakcí cysteinu s ninhydrinem je při vlnové délce 560 nm. Stejně absorpční maximum dává i moč pacientů s cystinurií, což odpovídá literárně uváděným údajům.

Ninhydrin reaguje také s dalšími aminokyselinami, které jsou přítomny v moči. Interferenci se stanovením cystinu brání první redukční krok, abych toto ověřil, proměřil jsem absorpční spektrum produktu reakce zaprvé s močí zdravého jedince a zadruhé s aminokyselinou ornitin, která je ve velkém množství vylučována u pacientů s cystinurií. Ani v jednom z uvedených případů nedochází k tvorbě barevného produktu a tedy ani k interferenci se stanovením cystinu v moči.

Důležitým faktorem, který ovlivňuje stanovení, je doba redukce cystinu na cystein. Nejvhodnější dobou se ukázalo být 5 minut, kdy byl přeměněn veškerý cystin na cystein. V čase po 5 minutách je již vyčerpáno redukční činidlo siřičitan sodný, dochází ke zpětné oxidaci cysteinu na cystin.

Dalším faktorem, ovlivňujícím stanovení, je doba zahřátí reakční směsi s ninhydrinem na 100 °C. Nejvhodnější dobou se ukázalo být 10 minut, kdy se dosáhlo maxima absorbance. V intervalu od 10 minut již dochází k degradačním procesům mající za následek pokles absorbance.

Dalším měřením jsem ověřil stabilitu barevného produktu reakce na světle v případě delšího stání vzorku po vyjmutí z termobloku. Produkt je stabilní po dobu deseti minut, následně dochází k degradaci a poklesu absorbance po 45 minutách o 8%.

Při validaci metody jsem ověřoval rozsah linearity reakce, opakovatelnost a reprodukovatelnost měření.

Závislost je lineární v rozmezí 0 – 834 $\mu\text{mol/l}$, pro vyšší koncentrace které mohou být u špatně kompenzovaných pacientů je zapotřebí moč ředit. Protože v oblasti používaných koncentrací cystinu v moči je závislost absorbance produktu reakce na koncentraci cystinu lineární, může být využita jednobodová kalibrace.

Variační koeficient opakovatelnosti v sérii byl 0,2 % a variační koeficient reprodukovatelnosti mezi sériemi byl 1,7 %. Hodnota variačního koeficientu v obou případech nepřevýšila 5% hranici a metoda je tedy dobře použitelná v klinické praxi.

V poslední části je spektrofotometrická metoda aplikována na skutečné patologické vzorky osob s diagnostikovanou cystinurií. Porovnával jsem spektrofotometrickou metodu s metodou využívající iontoměničové chromatografie na automatickém analyzátoru, která je považována za standard ve stanovení aminokyselin. Výsledky obou metod spolu dobře korelují bez odchylek.

Použitá spektrofotometrická metoda pro stanovení cystinu v moči je jednoduchá, rychlá a reprodukovatelná. Metoda je touto bakalářskou prací potvrzena jako korektní metoda, která je schopna posloužit k monitoringu pacientů s metabolickou poruchou s vylučováním dibazické aminokyseliny cystinu do moči a nahradit zdlouhavou metodu s metodou využívající iontoměničové chromatografie na automatickém analyzátoru.

5. Závěr

1. Byl zmapován stav současné problematiky cystinurie se všemi jejími důsledky pro pacienta jí postiženým. Podrobnějšímu rozboru je věnována část poruchy transportu cystinu. Byly též zmíněny současné možnosti terapie.
2. Pro monitoring pacientů s cystinurií byla zavedena spektrofotometrická metoda, která využívá redukci cystinu na cystein a jeho následnou reakci s ninhydrinovým činidlem za vzniku červenofialového produktu. Tento produkt je podroben spektrofotometrické analýze.
3. Absorpční maximum barevné sloučeniny vznikající reakcí cysteinu s ninhydrinem je při vlnové délce 560 nm. Stejné absorpční maximum dává i moč pacientů s cystinurií. Aminokyseliny v moči zdravého jedince ani aminokyselina ornitin, která je ve velkém množství vylučována u pacientů s cystinurií netvoří barevný produkt a tedy neinterferují se stanovením cystinu v moči.
4. Nejvhodnější dobou redukce cystinu na cystein je 5 minut, při delší době reakce již dochází ke zpětné oxidaci cysteinu na cystin.
5. Maxima absorbance při zahřátí reakční směsi s ninhydrinem na 100 °C se dosáhlo po 10 minutách. V intervalu od 10 minut již dochází k degradačním procesům mající za následek pokles absorbance.
6. Barevný produkt reakce na světle je stabilní po dobu deseti minut, následně dochází k degradaci a poklesu absorbance po 45 minutách o 8%.
7. Závislost absorbance na koncentraci cystinu je lineární v rozmezí 0 – 834 $\mu\text{mol/l}$.
8. Variační koeficient opakovatelnosti v sérii byl 0,2 % a variační koeficient reprodukovatelnosti mezi sériemi byl 1,7 %.
9. Výsledky spektrofotometrické metody u pacientů s cystinurií dobře korelují s výsledky metody využívající iontoměničové chromatografie na automatickém analyzátoru, která je považována za standard ve stanovení aminokyselin.

Literatura:

- [1] Fernandes, John; Saudubray, Jean-Marie; Berghe, van den Georges;Walter H. John.*Diagnostika dědičných metabolických poruch.* přep. 4. vyd. Praha :Triton, 2008. ISBN 978-80-7387-093-6.
- [2] Murray K. Robert, Granner K. Daryl, Mayes A. Peter, Rodwell W. Victor. *Harperova Biochemie*, 4.české vyd. H+H, 2002. ISBN 80-7319-013-3
- [3] KRÍŽEK, Vladimír. *Cystinurie a cystinová urolitiáza.* 1. vyd. Praha : Avicenum, 1981. 112 s.
- [4] Smiths H. Lynwood;Robertson G. William; Finlayson Birdwell. *Urolithiasis, Clinical and basic research.* NY: Plenum Press,1981. ISBN 0-306-40635-7H
- [5] Henry R.J., Cannon D.C. Winkelman J.W. *Clinical Chemistry, Principles and Technics*, Second Edition. USA:Harper & Row, 1974. ISBN:06-141181-7
- [6] Merta M, Reiterová J.: *Dědičná onemocnění ledvin* 1. Vyd.Praha: Triton, 2004. ISBN: 8072545051
- [7] Racek Jaroslav et. al. *Klinická biochemie*, 1. vyd. Praha: Galén,1999. ISBN 80-7262-023-1
- [8] Štern, Petr, et al. *Obecná a klinická biochemie : pro bakalářské obory.* 1. Praha : Karolinum, 2005. 219 s. ISBN 80-246-1025-6.
- [9] SHEKHAR BIYANI, Chandra. *Http://emedicine.medscape.com* [online]. 23.6.2009, 23.6.2009 [cit. 2010-05-11]. Cystinuria. Dostupné z WWW: <http://emedicine.medscape.com/article/435678>
- [10] ŠŤASTNÁ, CSc., MUDr. Sylvie; VACKOVÁ, Bc. Martina. Urolithiáza a dědičné metabolické poruchy. *Urologie pro praxi* [online]. 2004, 4, [cit.]. Dostupný z WWW: www.urologiepropraxi.cz
- [11] BROER, Stefan. Apical Transporters for neutral Amino Acids: Physiology and Pathology. *Physiology* [online]. 2008, 23, [cit. 2010-04-25]. Dostupný z WWW: <http://physiologyonline.physiology.org>

[12] Cysteine In *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, , [cit. 2010-04-25]. Dostupné z WWW:

<http://en.wikipedia.org/wiki/Cysteine>

[13] *Http://www.eqa.cz* [online]. 2003 [cit. 2010-05-11].

terminologie/Text/Terminologie.htm. Dostupné z WWW:

<http://www.eqa.cz/terminologie/Text/Terminologie.htm>

[14] A modified cyanide-nitroprusside method for quantifying urinary cystine concentration that corrects for creatinine interference. *Clinica Chemica Acta* [online]. 12.2.1999, 289, [cit. 2010-05-11]. Dostupný z WWW:

www.elsevier.com/locate/clinchim

[15] Reference Values of urinary Excretion of Cystine and Dibasic Aminoacids:Classification of Patients with Cystinuria in the Valencian Community, Spain. *Clinical Biochemistry* [online]. 1999, vol.32,

[cit. 2010-05-11]. Dostupný z WWW: www.elsevier.com/locate/clinchim