

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. lékařská fakulta

ÚSTAV KLINICKÉ BIOCHEMIE A PATOBIOCHEMIE

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Možnosti stanovení síranových iontů v biologickém materiálu  
u pacientů se závažnými poruchami metabolismu

Vypracoval:

Martina Plasová

Vedoucí bakalářské práce:

Prof. MUDr. Richard Průša, CSc.

Školitel:

Ing. Karel Kotaška, Ph.D.

Studijní obor:

Zdravotní laborant

Studijní program:

Specializace ve zdravotnictví

Prohlašuji, že jsem v předložené bakalářské práci použila jen pramenů, které cituji a uvádím  
v seznamu použité literatury.

V Praze 18.dubna 2008

.....

podpis

## SOUHRN

Sírany patří mezi významné anionty podílející se na řadě procesů v lidském organismu. Cílem bakalářské práce bylo ověřit možnosti využití stanovení síranových aniontů v séru u pacientů se závažnými metabolickými poruchami

Sulfáty byly vyšetřeny v séru 68 pacientů (31 mužů, průměrný věk 67 let, věkové rozmezí 31 – 86 a 37 žen, průměrný věk 71, věkové rozmezí 44 – 86) pomocí dvou turbidimetrických metod (kvantichromsulfátové a želatinázové BGR metody). 12 vzorků nebylo možno statisticky vyhodnotit, protože byly silně hemolytické a hodnoty sulfátů vycházely falešně pozitivní.

Metodu kvantichromsulfátovou jsme použili pro vyšetření u 34 pacientů (21 žen, průměrný věk 70 let, věkové rozmezí 45 – 86 let a 13 mužů, průměrný věk 64, věkové rozmezí 49 – 83 let).

Želatinázovou metodu jsme použili pro vyšetření 22 pacientů (9 žen, průměrný věk 69 let, věkové rozmezí 44 – 86 let a 13 mužů, průměrný věk 67 let, věkové rozmezí 31 – 82 let).

Střední hodnoty sulfátů v séru u vyšetřovaných pacientů před hemodialýzou byly významně vyšší než po hemodialýze ( $p < 0.0001$ , neparametrický t-test,  $\alpha = 0.05$ ). Želatinázová metoda vykazuje významně menší snížení hodnot sulfátů po hemodialýze než metoda kvantichromsulfátová. ( $p = 0.037$  vs.  $p < 0.001$ , neparametrický t-test,  $\alpha = 0,05$ ), což lze vysvětlit významným vlivem interferencí u želatinázové metody.

Potvrdili jsme možnost použití obou metod při stanovení anorganických síranů. Želatinázová metoda vykazuje vyšší náchylnost k interferencím než metoda kvantichromsulfátová.

## SUMMARY

Inorganic Sulphate play important role in various metabolic pathways. The aim of the work was to assess the possibility of inorganic sulphate determination in patients with severe kidney diseases undergoing hemodialysis. Serum sulphate levels were determined in 68 patients (31 men, mean age 67, range 31 – 86 and 37 women mean age 71, range 44 – 86) before and after hemodialysis. Two turbidimetric methods Quantichrom<sup>™</sup> Sulfate Assay Kit and BGR gelatine method were used for determination. Both methods were performed separately in group of 34 patients. Results were as follows: Mean serum sulphate levels in patients before hemodialysis are significantly elevated than the levels after hemodialysis ( $p < 0.0001$ , non parametric t-test,  $\alpha = 0.05$ ). BGR gelatine method show less significant differences in sulphate levels before and after hemodialysis than the Quantichrome Assay method. ( $p = 0.037$  vs.  $p < 0.001$ , non parametric t-test,  $\alpha = 0.05$  ). This fact could be explained by the significant role of interferences in BGR gelatine method.

We confirm the relevance of both method in inorganic sulphate determination. BGR gelatine method is more affected by interference, than the QuantiChrome Assay method.

Na předložené bakalářské práci jsem pracovala na Ústavu klinické biochemie a patobiochemie Motol v Praze pod vedením Ing. Karla Kotašky, Ph.D.

Děkuji vedoucímu své bakalářské práce Ing. Karlu Kotaškovi, Ph.D., za odborné vedení a poskytnutí cenných rad a připomínek při řešení zadaného úkolu.

Dále děkuji všem pracovníkům laboratoře UKBP Motol za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

# OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	2
2.1. BIOCHEMICKÁ ČÁST .....	2
2.1.1. Význam síry v organismu .....	2
2.1.2. Sírné aminokyseliny .....	2
2.1.2.1. Cystein .....	2
2.1.2.2. Methionin .....	3
2.1.2.3. Homocystein .....	3
2.1.2.4. Taurin .....	4
2.1.3. Dědičné poruchy metabolismu AMK .....	5
2.1.4. Další sloučeniny síry v organismu .....	8
2.1.4.1. Dehydroepiandrosteronsulfát .....	8
2.1.4.2. Chondroitinsulfát .....	9
2.1.4.3. Glukosaminsulfát .....	9
2.1.4.4. Keratansulfát .....	10
2.1.4.5. Dermatansulfát .....	10
2.1.4.6. Methylsulfonylmetan .....	10
2.1.5. Význam sloučenin síry v systému acidobazické regulace .....	11
2.1.6. Význam sloučenin síry detoxikace xenobiotik .....	11
2.1.7. Role sulfátů ve vnitřním prostředí organismu .....	12
2.2. ANALYTICKÁ ČÁST .....	13
2.2.1. Přehled metod stanovení síranů a síry v biologickém materiálu .....	13
2.2.1.1. Analytické stanovení síranů v pivu .....	13
2.2.1.2. Stanovení síry v ropných produktech .....	14
2.2.1.3. Analytické stanovení síranů v odpadní vodě .....	14
2.2.1.4. Analytické stanovení síranů v pitné vodě .....	15

2.2.1.5. Heparová zkouška .....	16
2.2.1.6. Stanovení síry v organických sloučeninách .....	16
2.2.2. Přehled metod stanovení síranů v tělních tekutinách .....	16
2.2.2.1. Stanovení síranů v lidské moči .....	16
2.2.2.2. Radioizotopové metody .....	17
2.2.2.3. Plamenová spektrofotometrie .....	18
2.2.2.4. Iontově selektivní metody .....	18
2.2.2.5. Současné stanovení thiolových sloučenin prostřednictvím HPLC s elektrochemickou detekcí (Coul-Array) .....	18
2.2.2.6. Stanovení síranů v lidských tekutinách, jejich výhody a nevýhody ...	18
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	20
3.1. Cíle práce .....	20
3.2. Soubor pacientů a jejich charakteristika .....	20
3.3. Metodika .....	20
3.3.1. Kvantichromsulfátová metoda .....	20
3.3.2. Želatinázová BGR metoda .....	21
3.4. Pracovní postup .....	21
3.4.1. Kvantichrosulfátová metoda .....	21
3.4.2. Želatinázová metoda .....	22
3.5. Analýza dat .....	24
4. VÝSLEDKY A DISKUZE .....	25
4.1. Porovnání turbidimetrických metod .....	25
4.2. Výsledky získané kvantichromsulfátovou metodou .....	26
4.3. Výsledky získané želatinázovou metodou .....	27
5. ZÁVĚR .....	32
6. LITERATURA .....	31
7. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....	34

## 1. ÚVOD

Cílem této práce je podat základní informace o významu síry a jejích sloučenin v organismu. Popsat základní analytické postupy využívané ke stanovení síry a jejích sloučenin v biologickém materiálu i tělních tekutinách (moč, sérum) u pacientů se závažnými metabolickými poruchami ledvin, kteří byli zařazeni do dialyzačního programu.

Anorganický sulfát je jeden z nejčastějších aniontů vyskytujících se v plazmě. Sulfát hraje důležitou roli ve fyziologických procesech při aktivaci a detoxikaci xenobiotik, je součástí steroidů, neurotransmiterů a žlučových kyselin. Sulfát se významně podílí na biosyntéze glykosaminoglykanů, cerebrosidsulfátů, heparansulfátů. Desulfatace chrupavky proteoglykany je spojována s dědičnou dysplazií chrupavky a kostí. Sulfát se podílí na regulaci homeostázy. Celková část sulfátu v lidském těle odpovídá asi 27 % přeměněnému anorganickému sulfátu, extracelulární anorganický sulfát je důležitou zásobárnou pro intracelulární sulfaci. Podstatná část nově syntetizovaného esteru sulfátu rychle vstupuje do extracelulárního prostoru při vyměšování moči.<sup>33</sup> Sulfáty jsou vylučovány ledvinami. Většina filtrovaného sulfátu je absorbována v proximálním kanálku a jen malé množství filtrovaného sulfátu z celkového množství se vylučuje močí.<sup>2</sup>

Referenční hodnoty sulfátu v séru se pohybují v rozmezí 0,4 – 0,6 mmol/l.<sup>2</sup>

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. BIOCHEMICKÁ ČÁST

#### 2.1.1. Význam síry v organismu

Síra se v přírodě vyskytuje především v anorganické formě jako volná síra, ve formě síranů, siřičitanů, případně jako sulfan. V každém živém organismu je zastoupena ve formě aminokyselin cysteinu a methioninu. Organismus vyšších živočichů a člověka není schopen přímo využít elementární síru a zabudovat ji do aminokyselin. Tuto práci odvádějí především některé mikroorganismy a rostliny.<sup>1</sup> Doporučený denní příjem síry ve formě aminokyselin se pohybuje v rozmezí 0,5 – 1 g. Deficit či nadbytek se nevyskytuje. Člověk vyloučí denně 20 – 30 mmolů síry, především ve formě anorganického sulfátu.<sup>1</sup>

Referenční hodnoty síry v séru a plazmě se pohybují v rozmezí 156 – 468 mmol/l (5 – 15 mg/l). (Hodnoty se mohou lišit v závislosti na metodě stanovení).<sup>1</sup>

#### 2.1.2. Sírné aminokyseliny

Hlavními aminokyselinami obsahující síru v organismu jsou cystein a methionin. Zdrojem sírných aminokyselin jsou vejce, maso, mléčné produkty a některé obiloviny.<sup>4</sup>

##### 2.1.2.1. Cystein

Cystein (L-2-Amino-3-merkaptopropionová kyselina; L-beta-Merkaptoalanin; molekulová hmotnost 121,15). Cystein je aminokyselina neesenciální, obsahuje silně reaktivní thiolovou skupinu a spolu s cystinem tvoří účinný redoxní systém. Cystein je důležitým prekurzorem tripeptidu glutathionu, který se uplatňuje při neutralizaci peroxidů. Peroxidy jsou považovány za jeden z rizikových faktorů vyvolávajících vznik revmatických potíží. Glutathion chrání organismus proti škodlivinám (včetně škodlivin obsažených v cigaretách a alkoholu). Síra obsažená v cysteinu napomáhá inaktivovat volné radikály a tím ochraňuje tělesné tkáně. Nadměrné množství cysteinu může vést ke vzniku ledvinových a žlučových kamenů, proto se doporučuje přijímat cystein společně s vitamínem C.<sup>10</sup>



Cystein snadno vytváří disulfidové můstky, například v imunoglobulinech. Spolu se serinem je součástí aktivních center enzymů.<sup>6,10</sup>

Hlavním katabolickým úkolem cystinu u savců je jeho přeměna na cystein, prostřednictvím cystinoreduktázy. Mechanizmy katabolizmu cystinu a cysteinu pak probíhají souběžně.<sup>1</sup>

#### 2.1.2.2. Methionin

Methionin (L-2-Amino-4-(methylthio) máselná kyselina; molekulová hmotnost 149,21). Methionin slouží jako donor methylové skupiny, mění se přitom na homocystein, který je považován za rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění. Síra vázaná v methioninu vytváří chemické vazby na další sloučeniny, tyto komplexy umožňují průběh důležitých reakcí vedoucích ke vzniku životně důležitých látek. Methionin je esenciální aminokyselina nepostradatelná při syntéze tělesných bílkovin. Zvyšuje lipotropní aktivitu organismu, patří mezi „spalovače tuků“. Dostatečné množství methioninu zajišťuje správný průběh metabolismu taurinu a cysteinu a podporuje tvorbu lecitinu. Lecitin emulguje tuky a rozpouští jejich zásoby, čímž přispívá k omezení rizika onemocnění kardiovaskulárního systému. Methionin se v kombinaci s vitamínem C a lyzinem podílí na tvorbě karnitinu a je výchozí látkou pro keratin. Methionin chrání játra před toxickými látkami, zejména v případě intoxikace organismu olovem, kadmíem a rtuť. Působí preventivně proti vysokému krevnímu tlaku, depresím a poškození ledvin. Methionin je účinný antioxidant, který neutralizuje volné radikály. Volné radikály mohou napadat zdravé buňky a ve vyšším věku způsobovat degenerativní choroby (nemoci srdce, tumory, cukrovka). Methionin posiluje napětí ve svalech a zabraňuje vypadávání vlasů, zvyšuje hladiny celkového cholesterolu a LDL cholesterolu. Podle řady výzkumů je funkce methioninu v organismu inhibována nadměrnou spotřebou alkoholu. Nedostatek, ale i nadbytek methioninu vede k poruše funkce jater.<sup>4,6,10</sup>

#### 2.1.2.3. Homocystein

Homocystein je jednoduchá aminokyselina, (molekulová hmotnost 135). Vyskytuje se v buňkách a tělesných tekutinách živých organismů. U zdravého člověka je koncentrace homocysteinu v krevní plazmě ve srovnání s jinými aminokyselinami nízká (viz. tab.1), ale i mírné zvýšení koncentrace (nezávisle na koncentraci cholesterolu) představuje riziko srdečního a cévního onemocnění. Funkcí homocysteinu v lidské buňce je udržovat rovnováhu

vnitřního prostředí. Molekula homocysteinu je o jeden uhlík delší než molekula cysteinu a volná thiolová skupina je u homocysteinu reaktivnější. Sloučeniny obsahující -SH skupinu (thioly) jsou nezbytné pro buněčné dýchání a tvorbu energie. Homocystein vzniká z methioninu. Homocystein může být využit jako stavební jednotka bílkovin, jako iniciátor proteosyntézy, nebo může vytvářet methylační koenzym poskytující methylovou skupinu, S-adenosyl-methionin. Methylová skupina S-adenosyl-methionin může po přenesení výrazně měnit fyziologický účinek jednotlivých molekul, například z noradrenalinu vzniká adrenalin, ze serinu vznikne cholin.

Homocystein metabolizuje velmi rychle na methionin a cystein. Je-li narušena přeměna na methionin nebo cystein, dochází k hromadění homocysteinu a významnému ovlivnění metabolismu v organismu (zpomalení citrátového cyklu, snížení spotřeby kyslíku, snížení tvorby energie). Může dojít k významnému ohrožení organismu cévními a srdečními chorobami, únavovým syndromem, popřípadě Parkinsonovou a Alzheimerovou chorobou.<sup>7</sup>

#### 2.1.2.4. Taurin

Mezi netypické sирné aminokyseliny patří taurin. Taurin (2-Aminoethanosulfonová kyselina; molekulová hmotnost 125,14) je neesenciální aminokyselina. Taurin působí jako účinný antioxidant a pomáhá zlepšovat vstřebávání vápenatých a sodných kationtů. Taurin je součástí žluči, jejíž funkcí je vstřebávání tuků a vitaminů rozpustných v tucích. V těle vzniká taurin z cysteinu a methioninu účinkem vitaminu B6 a shromažďuje se nejvíce ve tkáních, které jsou nervově stimulovány (v srdci, svalech a mozku). Bylo zjištěno, že taurin, podávaný současně s glycinem a histidinem, tlumí projevy epilepsie, zmírňuje nervové záchvaty, pocity úzkosti a stres. Taurin se významně podílí na ochraně jater. Bývá také součástí některých povzbuzujících nápojů, může sloužit jako psychostimulující prostředek.<sup>4,6,10</sup>

Koncentrace aminokyselin v plazmě jsou shrnuty v tab.1.

**Tab.1 KONCENTRACE AMINOKYSELIN V PLAZMĚ <sup>5</sup>**

<b>Název aminokyseliny</b>	<b>Koncentrace v <math>\mu\text{mol/l}</math></b>
Homocystein	7,6 $\pm$ 1,9
Cystein	201 $\pm$ 45
Methionin	18 $\pm$ 3
Taurin	49 $\pm$ 12

### 2.1.3. Dědičné poruchy metabolismu AMK

Nedostatek sirných aminokyselin nebo poruchy jejich metabolismu vedou k řadě geneticky podmíněným poruchám. Jejich včasná diagnostika má význam pro zahájení správné terapie. Zabrání tak často ireverzibilnímu poškození některých orgánů.<sup>4</sup>

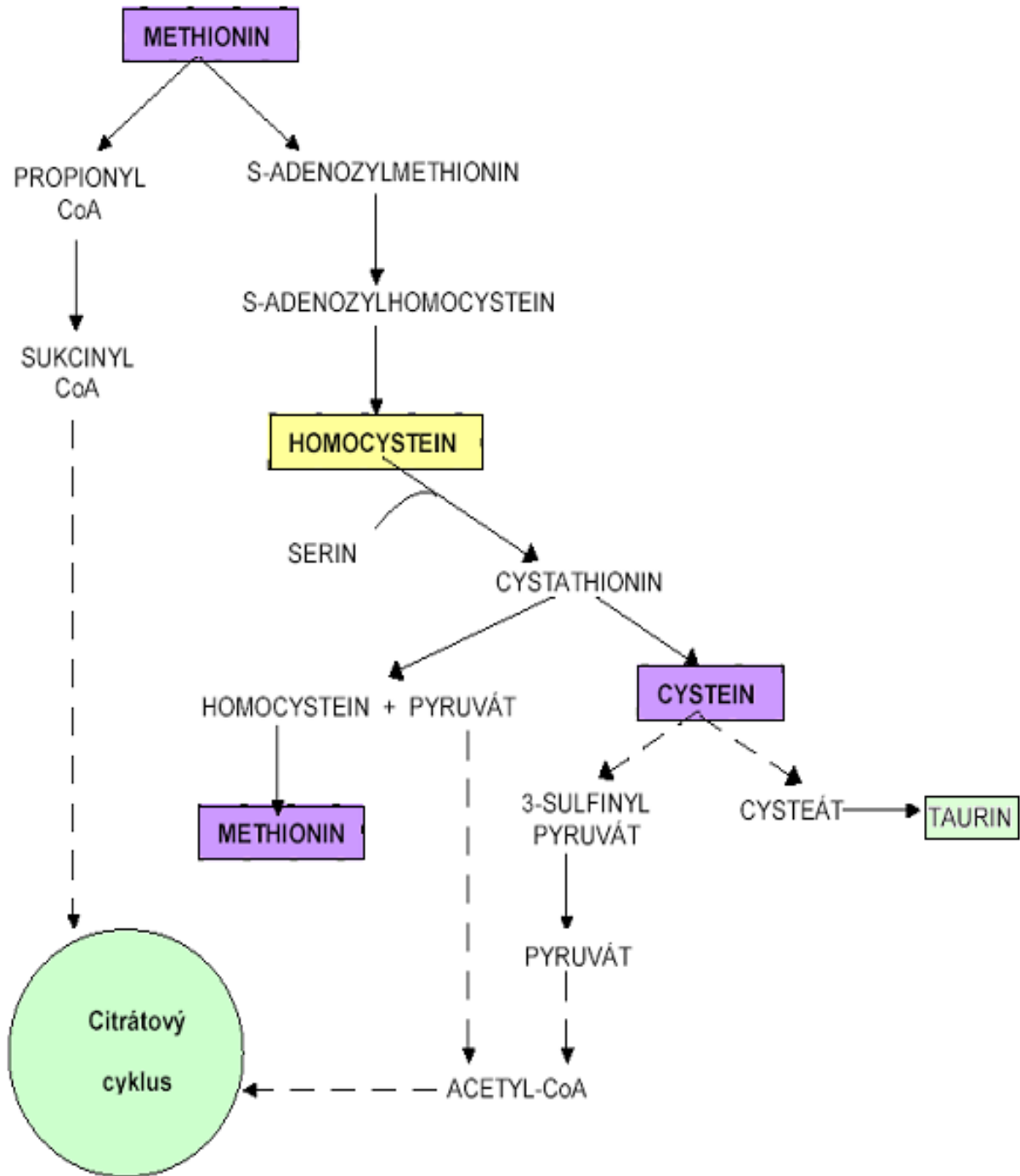
Přehled vrozených poruch metabolismu obsahuje tab.2.

**Tab. 2. PŘEHLED VROZENÝCH PORUCH METABOLIZMU SÍRNÝCH AMK<sup>1</sup>**

Název	Defekt (porucha)
Homocystinurie I	Cystathion-β-syntházy
Homocystinurie II	N <sup>5</sup> , N <sup>10</sup> –methylen tetrahydrofolát reduktázy
Homocystinurie III	Snížená aktivita N <sup>5</sup> –methyl tetrahydrofolát: homocysteintransmethylázy s následkem neshopnosti syntézy methylkobalaminu
Homocystinurie IV	Snížená aktivita N <sup>5</sup> –methyl tetrahydrofolát: homocysteintransmethylázy s následným defektem střevní rezorbce kobalaminu
Hypermethionemie	Jaterní methioninadenosyltransferázy
Cystationurie	Cystationázy
Sulfiturie (sulfo cystinurie)	Sulfitoxidázy
Cystinóza	Porucha lyzozomální funkce, dědičné onemocnění, cystinové krystaly ukládány v tkáních a orgánech (retikulocytech), nebezpečí renálního selhání <sup>8</sup>
Methioninový malabsorbční syndrom	Neschopnost vstřebat methionin ze střeva
Cystinurie (cystin-lyzinurie)	V moči cystin (20-30 krát↑), ↑ lyzin, arginin, ornithin, porucha renální a zpětné rezorbce, nebezpečí cystinových a močových kamenů

Základní přehled metabolických dějů sírných aminokyselin shrnuje v obr.1.

Obr. 1 METABOLIZMUS SIRNÝCH AMINOKYSELIN



## 2.1.4. Další sloučeniny síry v organismu

### 2.1.4.1. Dehydroepiandrosteron-sulfát

Dehydroepiandrosteron-sulfát (DHEA-sulfát, DHEAS) patří mezi androgeny (do skupiny 17-ketosteroidů) a je syntetizován a secernován v nadledvinkách. DHEAS je syntetizován hlavně jako sulfoester z sulfoesteru cholesterolu. Většina DHEAS je katabolizována a 10% je vyloučeno močí. DHEAS se naváže na specifické proteiny plazmy a jeho koncentrace není ovlivněna koncentrací těchto proteinů. Sekreci DHEAS koriguje kortikotropin (ACTH). Stimulace ACTH s věkem klesá. Kromě DHEAS cirkuluje ještě DHEA (dehydroepiandrosteron). DHEA vzniká částečně v kůře nadledvin a částečně v pohlavních orgánech. DHEA je poměrně rychle metabolizován, a proto je jeho koncentrace v krvi asi tisíckrát nižší než DHEAS. Díky vysoké koncentraci v krvi, dlouhému biologickému poločasu a stabilitě je DHEAS spolehlivým indikátorem sekrece androgenů kůrou nadledvin.<sup>11,12</sup>

**TAB.3 REFERENČNÍ MEZE DHEAS V SÉRU<sup>13</sup>**

Pohlaví věk (roky)	Minimum ( $\mu\text{mol/l}$ )	Maximum ( $\mu\text{mol/l}$ )
$\leq 1$	0,06	1,10
1-6	0,06	0,66
M 6-9	0,20	2,90
M 9-15	2,50	7,50
M 15-19	6,40	16,10
M 19-59	0,95	11,9
M $\geq 59$	0,25	5,20
Ž 6-9	0,23	1,50
Ž 9-15	1,00	9,20
Ž 15-30	2,40	14,50
Ž 30-40	1,80	9,70
Ž 40-50	0,66	7,20
Ž 50-60	0,94	3,30
Ž $\geq 60$	0,09	3,70

Stanovení DHEAS významně napomáhá při diagnostice metabolických poruch. U žen je stanovení DHEAS důležité při diagnostice hyperandrogenizmu z kůry nadledvin, zejména u tumorů ledvin, kdy jsou hodnoty DHEAS 6–10 krát vyšší než normální hodnoty (viz. Tab.3). Dále se stanovuje při diferenciální diagnóze ovariálních poruch, syndromu polycystických ovarií. U žen v postmenopauze je DHEAS důležitým ukazatelem rizika osteoporózy. Snížené hodnoty se nacházejí při renální insuficienci a deficitu 17-alfa-hydroxylázy. Pokud se u žen objeví zvýšená hladina testosteronu, je možné podle výsledku DHEAS rozhodnout, zda se jedná o primárně adrenální nebo ovariální poruchu. Hladiny DHEAS jsou zvýšené pouze u adrenálních příčin, například u nádorů kůry nadledvin, oboustranné hyperplazie kůry nadledvin u hypotalamo-hypofyzárního Cushingova syndromu.<sup>14,17</sup>

DHEAS se vyšetřuje ze séra a z heparinizované plazmy, stanovuje se například RIA metodou. DHEAS hraje významnou roli při Alzheimerově chorobě a při kardiovaskulárních onemocněních, a proto je považován za sloučeninu potencionálně působící proti stárnutí.<sup>15,17</sup>

#### 2.1.4.2. Chondroitinsulfát

Chondroitinsulfát je mukopolysacharid, přítomný v kloubních chrupavkách. Je syntetizován intracelulárně a posléze secernován do extracelulární matrix, kde je součástí proteoglykanů. Chondroitinsulfát je reabsorbován z gastrointestinálního traktu a má schopnost kumulace ve tkáni chrupavky. Chondroitinsulfát se po perorální aplikaci špatně vstřebává, ale experimentálně byla zjištěna vysoká míra akumulace v chrupavce. Preklinické studie ukázaly mnohočetné účinky chondroitinsulfátu. Vedle zvýšené syntézy kolagenu lze nalézt antiapoptotický efekt u chondrocytů a také určité protizánětlivé vlastnosti.<sup>9</sup>

#### 2.1.4.3. Glukosaminsulfát

Glukosaminsulfát je derivát přirozeně se vyskytujícího aminomonosacharidu glukosaminu, který je běžnou součástí chrupavkové matrix a synoviální tekutiny. Glukosamin je podobně jako chondroitinsulfát významným stavebním kamenem chrupavek. Přesný mechanismus účinku není detailně znám. Vedle prochondrosyntetického účinku glukosaminu byly zjištěny antioxidační účinky (snížení tvorby superoxidového radikálu). Glukosaminsulfát se podílí na inhibici metaloproteáz, které degradují vazivovou tkáň kloubní struktury. Glukosaminsulfát se po perorálním podání rychle vstřebává, maximální plazmatické koncentrace dosahuje během

8-10 hodin a jeho biologický poločas je 68 hodin. Několik krátkodobých studií ukázalo, že je schopen mírnit příznaky osteoartrózy při velmi dobré snášenlivosti.<sup>9</sup>

#### 2.1.4.4. Keratansulfát

Keratansulfát patří mezi proteoglykany, je tvořen opakujícími se disacharidovými jednotkami. Známe dva typy keratansulfátu (I a II). Typ I převažuje v rohovce, typ II se vyskytuje spolu s chondroitinsulfátem v proteoglykanu vázajícím kyselinu hyaluronovou v chrupavce. Proteoglykany mohou působit jako autoantigeny při různých typech artritid. Množství chondroitinsulfátu s věkem klesá, zatímco množství keratansulfátu a kyseliny hyaluronové se zvyšuje. Tyto změny mohou přispívat ke vzniku osteoartrózy.<sup>14</sup>

#### 2.1.4.5. Dermatansulfát

Dermatansulfát (tzv. chondroitinsulfát B) je hojně obsažen v kůži, ale také se vyskytuje v srdečních chlopních, arteriálních stěnách a šlachách.<sup>14</sup>

#### 2.1.4.6. Metylsulfonylmetan

MSM (metylsulfometan) je látkou tvořící se v lidském organismu, přítomnou při tvorbě vláken kolagenu. Má výrazné antioxidační účinky, kterými eliminuje negativní působení volných radikálů poškozujících buňky. Je výborným zdrojem síry, bez níž nedochází k syntéze dvou základních aminokyselin pojivových tkání (methioninu a cysteinu).<sup>14</sup>

### 2.1.5. Význam sloučenin síry v systému acidobazické regulace

Systém acidobazické regulace (ABR) slouží k udržování stálosti vnitřního prostředí, prostřednictvím kyselých a zásaditých iontů. Cílem je udržet pH krve na 7,40 ( $\pm 0,04$ ). Aktivita  $H^+$  v krvi je velmi nízká (asi 40 nmol/l), proto se zpravidla vyjadřuje v jednotkách pH, což je záporný dekadický logaritmus molární aktivity  $H^+$ . Při poklesu pH se aktivita  $H^+$



zvyšuje, dochází k acidémii, naopak při vzrůstu pH vzniká alkalémie. Stálost vnitřního prostředí je udržována nárazníkovými systémy (pufry). Tyto soustavy látek brání změně pH roztoku po přidání kyseliny nebo zásady.

V organismu se vyskytuje spíše acidóza, alkalóza je relativně vyjímečná. U metabolické acidózy dochází ke snížení pH krve způsobeným snížením koncentrace  $\text{HCO}_3^-$  a ke zvýšení reziduálních aniontů (sulfátů, fosfátů a dalších metabolických produktů bílkovin), toto zvýšení se může projevit u renálního selhání.<sup>26</sup> Sulfát patří mezi významné reziduální anionty a silné báze, které se uplatňují zejména při metabolických acidózách. Příčinami metabolických poruch jsou primární změny nezávisle proměnných veličin, difference silných bází ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), nebo netěkavých slabých kyselin.<sup>3</sup>

#### 2.1.6. Význam sloučenin síry v detoxikaci xenobiotik

Sloučeniny síry se významným způsobem podílejí na detoxikaci xenobiotik. Jako xenobiotika se označují látky, které se v organismu normálně nevyskytují, nejsou nutné pro jeho zdravý vývoj, ani neslouží jako zdroj energie.

Některé látky, které mohou sekundárně produkovat xenobiotika zobrazuje tab.4.

**TAB.4 CIZORODÉ LÁTKY U NICHŽ PROBÍHÁ DETOXIKACE XENOBIOTIK**

Sekundární zdroj xenobiotik	Příklad skupiny látek
zemědělství	pesticidy, herbicidy
potravinářství	ochucovadla, barviva
energetický průmysl	$\text{CO}_2$ , popílek, $\text{SO}_2$
doprava	olovo
spotřební průmysl	plasty, nátěrové hmoty
lékařství	chemoterapeutika

Během evoluce se u jednotlivých organismů vyvinulo mnoho detoxikačních mechanismů. Tyto procesy probíhají ve všech živých systémech. Při dlouhodobém působení toxické látky dochází k ireverzibilnímu poškození organismu a tím i k jeho zániku. U eukaryotických organismů se rozlišují dvě hlavní fáze eliminace xenobiotik. Sulfáty hrají důležitou roli

v druhé fázi detoxikace, kde se xenobiotikum naváže na funkční skupinu a vytvoří konjugát. Při sulfátové konjugaci dochází k esterifikaci hydroxylované sloučeniny kyselinou sírovou. Významnou úlohu při detoxikaci hraje glutation, urychluje exkreci toxických látek ledvinami.<sup>32</sup>

#### 2.1.7. Role sulfátů ve vnitřním prostředí organismu

Akutní renální selhání je častý medicínský problém u kriticky nemocných. Rozlišují se dvě skupiny nemocných: První skupinu tvoří nemocní s izolovaným selháním ledvin a druhou skupinu pak nemocní, kteří mají renální selhání jako součást multiorgánového selhání (MODS). Metabolické a nutriční abnormality u kriticky nemocných s akutním renálním selháním jsou charakterizovány metabolickou odpovědí na stres, alterovanou funkcí ledvin s následnou poruchou kontroly homeostázy. Při izolovaném akutním renálním selhání u hemodynamicky stabilních nemocných není nutno regulovat bílkovinný příjem (při rozšířeném denním režimu dialýz). U kriticky nemocných s renální dysfunkcí v rámci MODS léčených kontinuálními technikami není nutné redukovat příjem bílkovin, ani jinak upravovat příjem substrátů. V případě, že u nemocného není zavedena některá z eliminačních technik, pak je nutné omezení příjmu bílkovin s ohledem na závažnost renální dysfunkce.<sup>33</sup>

## 2.2. ANALYTICKÁ ČÁST

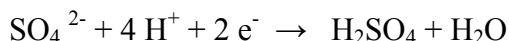
### 2.2.1. Přehled metod stanovení síranů v biologickém materiálu

V následujících kapitolách je popsán základní přehled metod stanovení síranů v různých materiálech.

Sulfát je vysoce rozšířený anion. Je popsána řada analytických postupů pro stanovení sulfátu v různých biologických materiálech (v mořské vodě, dešťové vodě, kyselých deštích, z chemických a farmaceutických surovin, z potravin a z tělesných tekutin).

#### 2.2.1.1. Analytické stanovení síranů v pivu

Analytické stanovení síry v pivu je založeno na produkci oxidu siřičitého vzniklého ze síranů činností pivovarských kvasinek. SO<sub>2</sub> chrání pivo od negativního vlivu rozpuštěného kyslíku, to zajišťuje fyzikálně-chemickou a senzorkou stabilitu piva. V pivu se při vyšších koncentracích SO<sub>2</sub> projeví jeho antimikrobiální vlastnosti. Koncentrace SO<sub>2</sub> v českých pivech a v pivech importovaných na český trh nesmí překročit legislativní limit 20 mg/l.<sup>17</sup>



*Saccharomyces cerevisiae* produkují SO<sub>2</sub> během syntézy aminokyselin obsahujících síru (cystein a methionin) ze síranů. Síranů jsou prostřednictvím enzymů přeměněny na siřičitany. Enzym sulfidreduktáza redukuje siřičitan na sulfid, který je užíván k produkci aminokyselin. Tento proces je kontrolován zpětnou inhibicí ATP-sulfurylázy. Pokud je produkováno větší množství siřičitanů než je potřeba k syntéze aminokyselin, je rozdíl uvolněn do okolí.<sup>17</sup>

Celkový SO<sub>2</sub> se v pivu stanovuje elektrochemickými metodami, například chronopotenciometrická metoda. Volné a vázané siřičitany jsou alkalizací vzorku přeměněny na siřičitanový anion. Po okyselení roztoku je uvolněný SO<sub>2</sub> separován přes semipermeabilní membránu a transportován elektrolytem do měřicí cely, kde je měřen rozpouštěcí chronopotenciometrií. Tato metoda byla validována a porovnána s třemi EBC (European Brewery Convention) metodami. Ke stanovení celkového oxidu siřičitého v pivu se využívá destilační metoda, enzymová metoda a metoda *p*-rosalinová.<sup>18</sup> Relativní směrodatná odchylka

opakovatelnosti je 8,6% pro běžnou hladinu SO<sub>2</sub> v pivu (3,0 mg/l). Tvorba SO<sub>2</sub> během fermentace je výrazně ovlivňována teplotou a tlakem kvašení.<sup>18</sup>

#### 2.2.1.2. Stanovení síry v ropných produktech

Pro stanovení síry v ropných produktech se používají především oxidační metody, v nichž se síra spaluje a v přítomnosti oxidačních činidel se síra stanovuje jako kyselina sírová. Spolu se snižováním obsahu síry v ropných produktech jsou zapotřebí metody, které jsou schopny stanovit obsah síry řádově v µm. Mezi tyto citlivé metody patří například metoda rentgenové fluorescence (XRF).<sup>28</sup>

#### 2.2.1.3. Analytické stanovení síranů v odpadní vodě

##### 2.2.1.3.1. Stanovení síranů v odpadní vodě izotachoforézou

Metoda kapilární izotachoforézy je založena na migraci nabitých částic v roztoku vlivem elektrického pole. Každý ion má jinou pohyblivost, podle které se řadí v kapiláře. Nej pohyblivější ionty migrují nejdříve, nejméně pohyblivé později. Kvalitativní a kvantitativní složení vzorku určíme dle výšky a délky odezvy na izotachoforegramu. Metoda je vhodná pro analýzu zakalených a barevných vzorků, to je pro odpadní vody výhodné.<sup>20</sup>

##### 2.2.1.3.2. Stanovení síranů v odpadní vodě turbidimetricky

Turbidimetrické stanovení je založeno na měření intenzity zákalu. Na částicích dochází k rozptylu záření a částečně i k jeho absorpci. Pro turbidimetrická stanovení se používají absorpční fotometry a spektrofotometry. Při stanovení síranů turbidimetricky v prostředí zředěné HCl a NaCl s barnatými ionty vzniká nerozpustný BaSO<sub>4</sub>, který tvoří bíle zbarvený zákal vhodný k měření. Intenzita zákalu je přímo úměrná koncentraci síranů. Rušivý vliv zbarvení vzorku je kompenzován slepým stanovením.<sup>21</sup>

### 2.2.1.3.3. Stanovení síranů v odpadní vodě spektrofotometricky

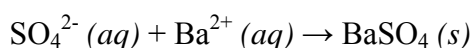
Sírany se v odpadní vodě mohou stanovovat také spektrofotometricky po převedení na sulfidy. Metoda založená na reakci s okyseleným roztokem N,N-dimethyl-p-fenylendiaminu, který poskytuje se sulfanem a sulfidy v přítomnosti  $\text{Fe}^{3+}$  methylenovou modř. Výhodou spektrofotometrického stanovení je vysoká citlivost (detekční limit 0,008 mg/l).<sup>21</sup>

### 2.2.1.4. Analytické stanovení síranů v pitné vodě

Zákal vody je způsoben nerozpuštěnými nebo koloidními látkami organického i anorganického charakteru. Zákal se měří u vod na základě rozptylu světla. Rozptyl se měří buď turbidimetrickou nebo nefelometrickou metodou. Záření určité intenzity a určité vlnové délky dopadá na proměřovaný roztok. Na částicích se záření rozptyluje do různých stran, tím se intenzita záření zeslabuje. Turbidimetricky se měří zeslabení záření, které je úměrné koncentraci koloidních částic. Nefelometricky se měří intenzita rozptýleného záření ve směru kolmém na vstupující paprsek, intenzita rozptýleného záření je úměrná koncentraci částic. Při stanovení zákalu se porovnává zákal vzorku se zákalem standardních roztoků (o známé koncentraci síranů) metodou kalibrační křivky.

Ke kvantitativnímu stanovení se používají metody odměrné nebo kapalinové chromatografie. Titrační stanovení síranů  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  je založeno na reakci síranových iontů s  $\text{Pb}^{2+}$ , kdy vzniká málo rozpustná sraženina  $\text{PbSO}_4$ . Ukončení titrace je indikováno barevnou změnou dithiazonu ze zelené do fialově červené. Nevýhodou tohoto stanovení je interference všech kationtů s výjimkou alkalických kovů a  $\text{NH}_4^+$ , proto je nutné kationty odstranit.

Titrační stanovení síranů  $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$  je založeno na reakci  $\text{SO}_4^{2-}$  s  $\text{Ba}^{2+}$  za vzniku málo rozpustného  $\text{BaSO}_4$  dle rovnice.<sup>22</sup>



Bod ekvivalence je indikován thorinem.<sup>22</sup>

### 2.2.1.5. Heparová zkouška

K obecnému důkazu sloučenin síry slouží heparová zkouška. Je založena na redukci sirných sloučenin na  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  zahříváním s uhlíčanem sodným v redukčním plameni Bunsenova kahanu. Ochlazená a navlhčená tavenina tvoří ve styku se stříbrným plíškem černý  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ .

Síranové rudy se poznají podle toho, že se při zahřívání v otevřené trubičce zahříváním v proudu vzduchu vyvíjí  $\text{SO}_2$ .<sup>34</sup>

#### 2.2.1.6. Stanovení síry v organických sloučeninách

Kvantitativně se síra obvykle stanovuje srážením za vzniku  $\text{BaSO}_4$ . Tímto způsobem se většinou stanovuje síra v organických sloučeninách. Srážení síranů solemi barnatými za vzniku  $\text{BaSO}_4$  se využívá pro důkaz obou iontů  $\text{Ba}^{2+}$  a  $\text{SO}_4^{2-}$ , i při gravimetrickém stanovení síranů.<sup>43</sup>

Jiný postup představuje například Cariova metoda, která využívá reakci s koncentrovanou  $\text{HNO}_3$  ve spalovací bombě za vzniku  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , nebo Wurzschnittova metoda je založená na zahřívání s  $\text{Na}_2\text{O}_2$  za vzniku  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .<sup>42</sup>

Kombinace gravimetrického stanovení s nefelometrickým měřením umožňuje stanovit sírany o koncentraci 1 až 1000 mg/l v nejrůznějších typech vzorků. Spolehlivá detekce síranů vyžaduje kontrolované podmínky během srážení (pH).<sup>43</sup> Například při použití  $\text{BaCl}_2$  s přídavkem thymolu a želatiny vzniká homogenní forma  $\text{BaSO}_4$ , u níž je do značné míry potlačena nežádoucí sedimentace. Je také důležité, aby reakce neprobíhala v příliš kyselých podmínkách, kde se může vytvářet částečně rozpustný  $\text{Ba}(\text{HSO}_4)_2$ .<sup>27</sup>

### 2.2.2. Přehled metod stanovení síranů v tělních tekutinách

#### 2.2.2.1. Stanovení síranů v lidské moči

Ke stanovení síranů v séru, moči se využívají spektrofotometrické metody založené na měření změny absorbance síranů po jejich převedení na  $\text{BaSO}_4$ .

Jedním z možných postupů stanovení síranů v moči je metoda podle Waintera a Kocha,<sup>44</sup> která využívá nepřímého stanovení koncentrace síranů v precipitaci  $\text{BaSO}_4$  pomocí chloranilových iontů. Výhodou tohoto postupu je vyšetření z malého množství moče (20 – 40  $\mu\text{l}$ ).<sup>35</sup>

#### 2.2.2.1.1. Spektrometrické stanovení pomocí chloristanu barnatého

Tato metoda se aplikuje při srážecích reakcích sulfátu v množství od 0,05 mg S/l do 4 mg S/l. Více koncentrované vzorky se musejí nejdříve naředit.

Ba(ClO<sub>4</sub>) se do reagenční směsi přidává v přebytku pro urychlení vysrážení sulfátu ve formě BaSO<sub>4</sub> v organickém rozpouštědle. Organické rozpouštědlo minimalizuje rozpustnost BaSO<sub>4</sub>. Přebytek koncentrace barnatých iontů v roztoku je měřen spektrofotometricky při 520 nm reakcí s thorinem. Může být užito několik organických rozpouštědel. Nejuspokojivější kalibrační křivky je dosaženo při použití dioxanu.<sup>29</sup>

#### 2.2.2.1.2. Automatizované spektrofotometrické stanovení chloristanem barnatým – Thorinová metoda

Tato metoda umožňuje stanovit sloučeniny síry v množství od 0,05 mg S/l do 2,5 mg S/l. Základní princip stanovení odpovídá principu ruční metody.<sup>30,31</sup> Známé množství Ba(ClO<sub>4</sub>) se přidává v přebytku ke vzorku a sulfát se vysráží ve formě BaSO<sub>4</sub>. Přebytek sulfátových aniontů reaguje s thorinem, po vytvoření směsi indikuje červené zbarvení. Koncentrace se stanovuje kolorimetricky při 520 nm.<sup>29,31</sup>

#### 2.2.2.2. Radioizotopové metody

Radioizotopové metody využívají například stanovení koncentrace <sup>133</sup>BaSO<sub>4</sub> v moči po eliminaci interferujících látek (proteiny, fosfáty) vazbou na uranyl acetát.<sup>30</sup>

Jiný přístup využívá stanovení <sup>35</sup>BaSO<sub>4</sub> po stabilizaci s křemenným práškem.<sup>36</sup>

#### 2.2.2.3. Plamenová spektrofotometrie

Všechny plamenové metody, které byly aplikovány při stanovení sulfátu v moči, jsou založené na měření Ba<sup>2+</sup> plamenovou spektrofotometrií.

Metody plamenové spektrofotometrie užívají přístupy Weidmana a Leskavara.<sup>37</sup> Metody využívají precipitace sulfátu v nadbytku Ba<sup>2+</sup>. Po centrifugaci a inkubaci se měří přebytek Ba<sup>2+</sup> při 510 nm. Interference lze odstranit přidáním směsi NaCl a KCl.<sup>37</sup>

#### 2.2.2.4. Iontově selektivní elektrody

Stanovení sulfátů prostřednictvím iontově selektivních elektrod užívá ke stanovení směs n-hexyl 4-trifluoroacetylbenzoátu a amonné soli.<sup>38</sup>

#### 2.2.2.5. Současné stanovení thiolových sloučenin prostřednictvím vysoko-účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (Coul-Array)

Thiolové sloučeniny hrají roli v řadě fyziologických pochodů a velmi významná je jejich schopnost vázat do své struktury těžké kovy. HPLC s elektrochemickou detekcí (CoulArray) pracuje na principu různých elektropotenciálů. Využívá se pro stanovení thiolových sloučenin (cysteinu, cystinu, N-acetylcysteinu, homocysteinu, redukovaného a oxidovaného glutathionu a fytochelatinů). Při tomto stanovení bylo nejdříve využito systému průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí (FIA-ED) pro optimalizaci maximální odpovědi elektrochemického detektoru. Popsaná metoda lze využít ke studiu obsahu thiolových sloučenin v krevním séru.<sup>24</sup>

#### 2.2.2.6. Stanovení síranů v tělních tekutinách, jejich výhody a nevýhody

Významnou roli při stanovení síranů hraje odstranění interferujících látek, které mohou významně ovlivňovat výslednou koncentraci. Interference se mohou výrazně projevit zejména při fotometrickém stanovení síranů. Nejčastěji jsou interference odstraněny reakcí se specifickými činidly (uranylacetát, benzidinsulfát, kyselina trichloroctová, směs NaCl, KCl).

U řady fotometrických stanovení se zohledňuje vliv hemolýzy, lipémie a vysoké koncentrace bilirubinu. Nevýhoda turbidimetrie a nefelometrie je přítomnost stálých koloidních suspenzí, proto se užívají různé stabilizátory obsahující želatinu, dextran a glycerol. Bílkoviny se nejprve precipitují s kyselinou trichloroctovou.<sup>22</sup>

Nevýhodou stanovení síranů z lidského séra pomocí chloranilových iontů je vyžadovaná vysoká senzibilita (i malá změna koncentrace iontů reakčních směsí se u stanovení síranů projeví chybou - nejčastěji interferencí sodíku).<sup>39</sup>

U chromatografických metod jsou interference odstraněny například vazbou na latex.<sup>41</sup> Popisované metody pro stanovení síranů mají řadu nevýhod, například dlouhou dobu stanovení. Gravimetrické metody nelze použít pro stanovení síranů v nízkých koncentracích,



Optické metody nefelometrické a turbidimetrické metody mají často nedostačující selektivitu a reprodukovatelnost. Chromatografické a elektroforetické metody jsou často složité a drahé<sup>41</sup>

Řada výzkumných studií se proto zaměřila na rozvoj vhodných metod (stanovení síranů), které by mohly být využity při běžné laboratorní praxi.<sup>38</sup>

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. CÍLE PRÁCE

1. Shrnout význam síry a jejích sloučenin v metabolismu
2. Podat základní přehled metod stanovení síry a jejích sloučenin v běžných biologických materiálech
3. Stanovit hladiny síranových iontů v séru u pacientů s postižením ledvin zařazených do dialyzačního programu
4. Ověřit možnosti využití turbidimetrického stanovení síranových iontů pro vyšetření v biologickém materiálu (sérum, moč)

#### 3.2. SOUBOR PACIENTŮ A JEJICH CHARAKTRISTIKA

Sírany byly stanovovány ze séra 68 pacientů (37 žen, průměrný věk 71 let, věkové rozmezí 44 – 86 a 31 mužů, průměrný věk 67 let, věkové rozmezí 31 – 86), kteří byli zařazeni do dialyzačního programu. Ke stanovení hodnoty sulfátů v séru byly použity 2 metody, kvantichromsulfátová metoda (BioAssay Systems, Hayward, USA)<sup>2</sup> a želatinová BGR metoda (využívající BaCl<sub>2</sub> a želatinu).<sup>40</sup>

#### 3.3. METODIKA

##### 3.3.1. Kvantichromsulfátová metoda

Kvantichromsulfátová metoda je jednoduchá, přímá metoda pro kvantitativní stanovení anorganického sulfátu v séru (v moči). Principem metody je tvorba nerozpustného síranu barnatého v polyethylenglykolu a měření intenzity zákalu při vlnové délce mezi 540-610 nm (doporučená 600nm). Intenzita zákalu je přímo úměrná koncentraci síranů v séru (moči).

Analytické znaky metody:

Pracovní rozsah 0,01 mmol/l ( $0,96 \cdot 10^{-3}$  mg/l) – 1,2 mmol/l (0,115 mg/l) sulfátu.

Referenční rozmezí v lidském séru (0,4 – 0,6 mmol/l)<sup>2</sup>

Reagencie:

Reagent A: 25 ml (Chlorid barnatý, Polyethylen glykol)

Reagent B: 25 ml (Kyselina trichloroctová)

Sulfát standard: 2 ml (60 mmol/l sulfát sodný)

### 3.3.2. Želatinázová metoda

Želatinázová BGR metoda<sup>40</sup> je metoda založená na měření intenzity zákalu síranu barnatého v želatinovém roztoku a měření absorbance při 500 nm. Po přidání kyseliny trichloroctové reagují vysrážené sírany ze séra (moče) s chloridem barnatým za vzniku síranu barnatého.

Reagencie:

4% Kyselina trichloroctová

5 mol/l BGR (Chlorid barnatý, želatina)

1 mmol/ Standardní roztok  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

## 3.4. PRACOVNÍ POSTUP

### 3.4.1. Kvantichromsulfátová metoda

Příprava vzorků:

U odebraného séra byla provedena deproteinace. Vzorky, které nebyly aktuálně stanovovány byly zamrazeny na (-80 °C). Deproteinace se provádí smísením 600  $\mu\text{l}$  vzorku s 300  $\mu\text{l}$  Reagentu B (kyselina trichloroctová). Vzorky se byly centrifugovány 8 minut při 10 900 ot/min a 600  $\mu\text{l}$  odstředěného supernatantu se použilo pro další analýzu.

Příprava reagensí:

Byl připraven pracovní roztok smísením 9 600  $\mu\text{l}$  Reagentu A (Chlorid barnatý, Polyethylenglykolu) a 9,6  $\mu\text{l}$  60 mmol/l standardu sulfátu. Roztoky byly promíchány na vortexu, aby došlo k včasnému smísení roztoků. 300  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku bylo použito pro další analýzu jednotlivých vzorků.

1 mmol/l pracovní standardu sulfátu byl připraven smísením 320  $\mu\text{l}$  60 mmol/l standardu sulfátu s 18 880  $\mu\text{l}$  deionizované vody.

Postup:

1. Do zkumavek bylo napipetováno 600  $\mu\text{l}$  deionizované vody, 600  $\mu\text{l}$  1 mmol/l pracovního standardu sulfátu, 600  $\mu\text{l}$  séra pacientů.
2. Bylo Přidáno 300  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku, vzniklá směs byla promíchána na vortexu.
3. Po 5 minutové inkubaci bylo provedeno měření při 600 nm.
4. Příklad výpočtu výsledku:

$$c(\text{SO}_4^{2-}) = (A \text{ vzorku} - A \text{ slepého vzorku}) / (A \text{ standardu} - A \text{ slepého vzorku})$$

$$c(\text{SO}_4^{2-}) = (0,4028 - 0,2175) / (0,4613 - 0,2175)$$

$$c(\text{SO}_4^{2-}) = 0,76 \text{ mmol/l}$$

A – absorbance

Pomůcky:

Pipety, stojan na zkumavky, mikrozkušavky Eppendorf, kyvety, kádinky, vortex, centrifuga , spektrofotometr Varian Spectr AA 200.

### 3.4.2. Želatinázová metoda

Příprava standardního roztoku:

Standardní roztok –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – rozpuštěním 0,132 g v 1 l vody (koncentrace síranů je 1mmol/l).

Příprava pracovních roztoků:

1. BaCl<sub>2</sub>-Želatina (BGR)

2 g želatiny rozpuštěné ve 400 ml vody se nechaly na varném hnízdě vařit (na teplotu 60-70°C), po té byly ochlazovány (na 4°C). Ve vychlazeném roztoku želatiny byly rozpuštěny 2 g chloridu barnatého a vzniklý opalescentní roztok se nechal 2-3 hodiny stát. Roztok lze skladovat 1 týden v chladničce při 4°C.

2. 4% Kyselina trichloroctová

40 g CCl<sub>3</sub>COOH bylo rozpuštěno v 1 l redestilované vody.

Takto připravená kyselina trichloroctová nesmí dávat zákal při smísení s BGR činidlem.

3. Koncentrace standardních roztoků

Ze zásobního roztoku (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> byly připraveny koncentrace standardů (0 – 1000 mmol/l), které byly využity k sestavení kalibrační křivky.

Standardy:

Koncentrace standardu (mmol/l)	Voda (μl)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (μl)
Slepý vzorek 0	200	0
Standard 1 0,1	180	20
Standard 2 0,2	160	40
Standard 3 0,4	120	80
Standard 4 0,6	80	120
Standard 5 0,8	40	160
Standard 6 1,0	0	200

Postup:

1. Do zkumavek byly napipetovány jednotlivé standardy a vzorky.
2. Ke 200  $\mu$ l vzorku (standardu, séra) bylo přidáno 3,8 ml 4% kyseliny trichloroctové a 1ml BGR.
3. Po 10 – 20 minut se promíchané vzorky měří při 500 nm proti slepému vzorku.

Skleněné zkumavky na vzorky a standardy nechat umýt přes noc v roztoku  $\text{HNO}_3$

Pomůcky:

Pipety, zkumavky, mikrozkušavky Eppendorf, kádinky, kyvety, váženka, baňky, stojan na zkumavky, skleněná tyčinka, teploměr, varné hnízdo, spektrofotometr Varian Spectr AA 200, analytické váhy.

### 3.5. Analýza dat

K vyhodnocení dat byly využity statistické moduly programů Microsoft Excel a Graph Pad Prism. Hladina  $\alpha = 0,05$  byla zvolena jako hladina významnosti.

Normální rozložení dat bylo testováno pomocí Kolmogorovova-Smirnovova testu. Podle výsledků byly využity parametrické nebo neparametrické varianty t-testu.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Porovnání hodnot síranových aniontů u pacientů před hemodialýzou (před HD) a po hemodialýze (po HD) při použití obou turbidimetrických metod v celém sledovaném souboru.

Stanovení sulfátu turbidimetrickými metodami bylo provedeno u 68 pacientů. 12 pacientů, u kterých byly v důsledku hemolýzy a chylozity séra nalezeny významně falešně zvýšené hodnoty koncentrace síranů v séru, bylo z hodnocení vyřazeno.

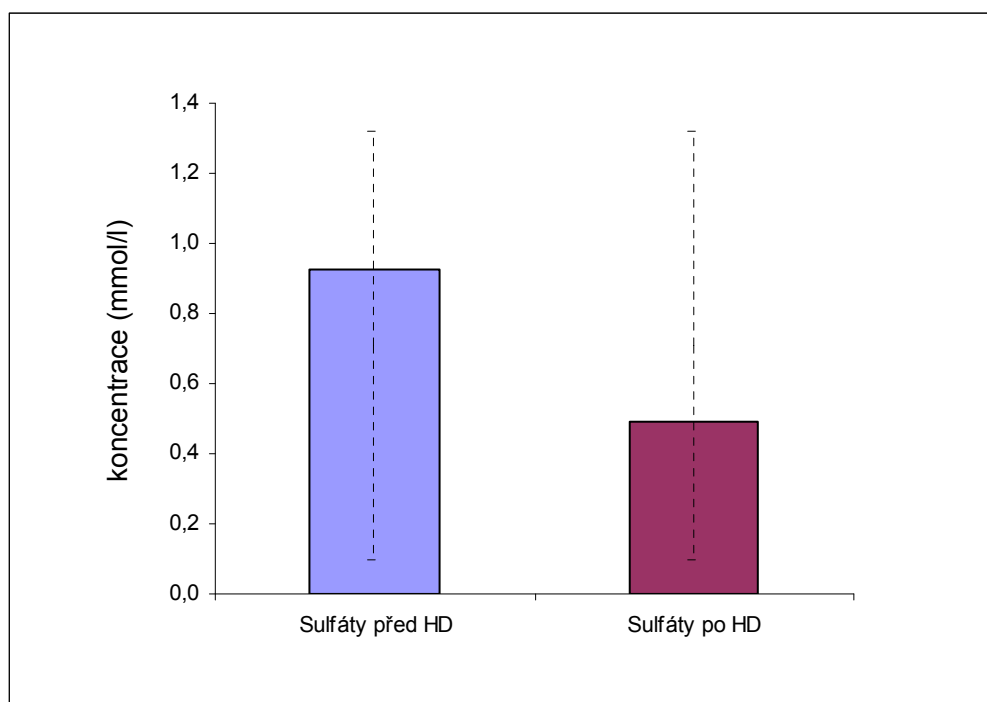
Střední hodnoty síranových aniontů (před hemodialýzou a po hemodialýze) a jejich směrodatnou odchylku zobrazuje tab.5. Grafické znázornění rozdílů hodnot síranových aniontů (před hemodialýzou a po hemodialýze) popisuje graf 1.

**Tab. 5 Vyhodnocení koncentrací síranů ve sledovaném souboru**

n = (56)	Hodnoty síranů před HD (mmol/l)	Hodnoty síranů po HD (mmol/l)
Průměr	0,925	0,492
SD	0,555	0,557
P < 0,0001		

Prokázali jsme, že sérové hladiny síranových aniontů po hemodialýze jsou výrazně nižší než hladiny síranových aniontů před hemodialýzou. Hypotézu jsme ověřili neparametrickým t – testem.

**Graf 1** Hodnoty síranů před HD a po HD ve sledovaném souboru 56 pacientů



#### 4.2. Výsledky získané metodou kvantichromsulfátovou

Kvantichromsulfátovou metodou se stanovovaly koncentrace síranových aniontů u 34 pacientů (21 žen, průměrný věk 70 let, věkové rozmezí 45 – 86 let a 13 mužů, průměrný věk 64 let, věkové rozmezí 49 – 83 let). Střední hodnoty síranových aniontů (před hemodialýzou a po hemodialýze) a jejich směrodatnou odchylku popisuje tab.8. Grafické znázornění rozdílů hodnot síranových aniontů (před HD a po HD) zobrazuje graf 2.

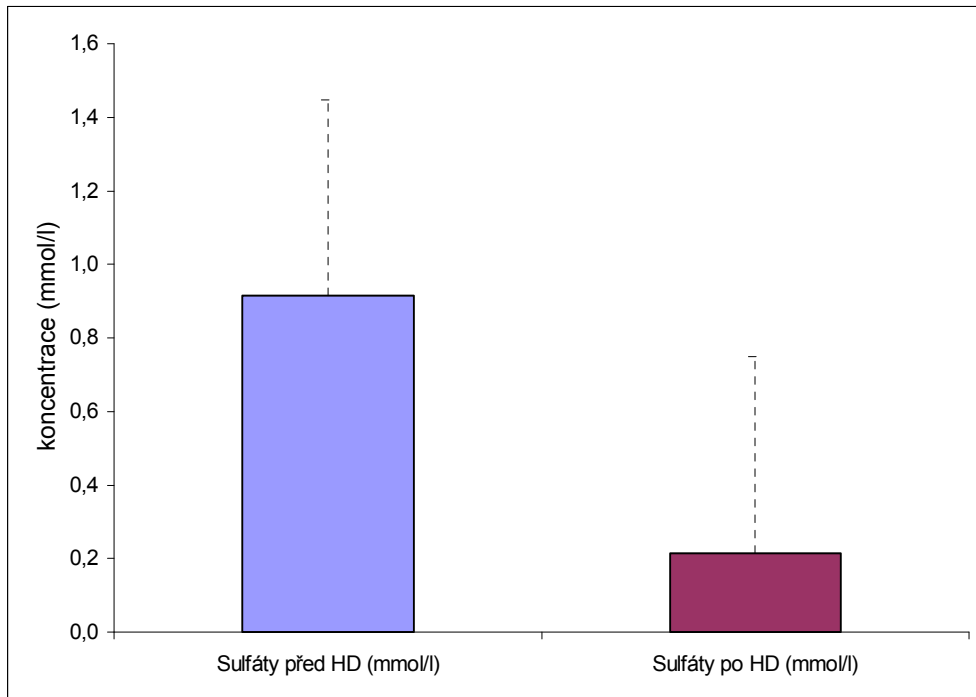
**Tab.8** Přehled hodnot síranů při použití kvantichrosulfátové metody

n = 34	Hodnoty síranů před HD (mmol/l)	Hodnoty síranů po HD (mmol/l)
Průměr	0,915	0,215
SD	0,534	0,454
P < 0,0001		



Prokázali jsme, že sérové hladiny síranových aniontů po hemodialýze jsou výrazně nižší než hladiny síranových aniontů před hemodialýzou. Svoji hypotézu jsme ověřili neparametrickým T-testem.

**GRAF 2 Hodnoty síranů před HD a po HD**



#### 4.3. Želatinázová BGR metoda

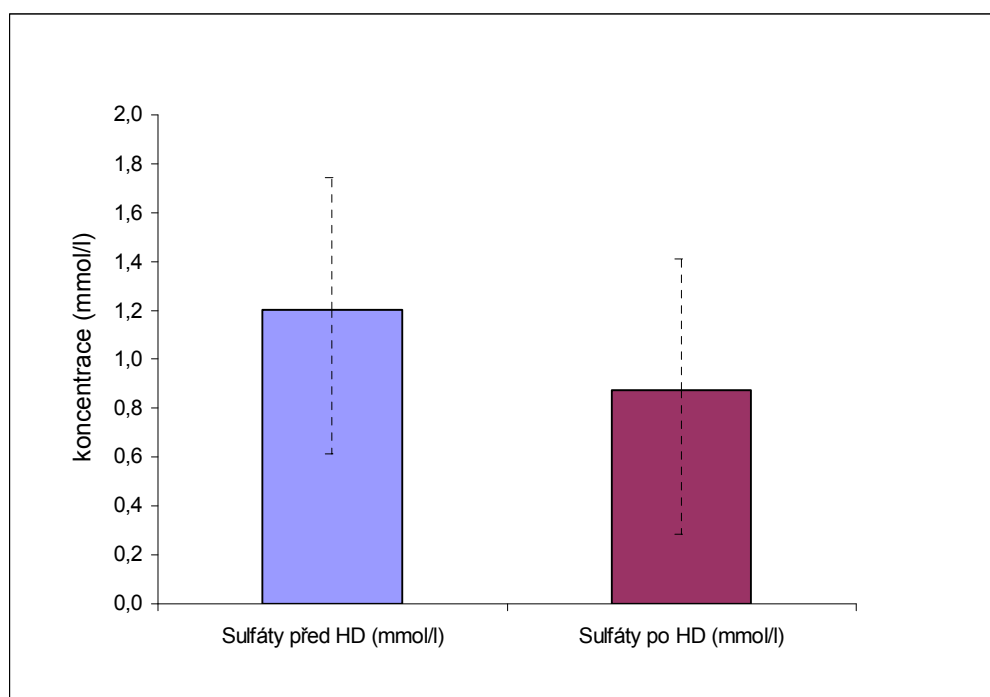
Celkem bylo stanoveno 34 pacientů. 12 pacientů, jejichž vzorky byly výrazně hemolytické a chylózní nebyly do vyhodnocení zahrnuty. Výsledky byly vyhodnoceny u 22 pacientů (9 žen, průměrný věk 69 let, věkové rozpětí 44 – 86 let a 13 mužů, průměrný věk 67 let, věkové rozpětí 31 – 82 let). Střední hodnoty síranových aniontů (před hemodialýzou a po hemodialýze) a jejich směrodatné odchylky jsou popsány v tab.11. Grafické znázornění rozdílů hodnot síranových aniontů (před hemodialýzou a po hemodialýze) zobrazuje graf 3.

**Tab.11 Přehled hodnot síranů při použití želatinázové BGR metody**

n = 22	Hodnoty síranů před HD (mmol/l)	Hodnoty síranů po HD (mmol/l)
průměr	1,204	0,872
SD	0,540	0,589
P < 0,0374		

Prokázali jsme, že sérové hladiny síranových aniontů po hemodialýze jsou výrazně nižší než hladiny síranových aniontů před hemodialýzou. Svoji hypotézu jsme ověřili neparametrickým T-testem.

**GRAF 3 Hodnoty síranů před HD a po HD**



Při stanovení hodnot síranů u pacientů s vážnými poruchami ledvin před HD a po HD se koncentrace síranů po HD snížily. Tento výsledek jsme očekávali, protože při HD dochází k difuzi krve přes polopropustnou membránu, a tím se z krve odstraňuje voda a v ní rozpuštěné nízkomolekulární látky (urea, kreatinin, kyselina močová, sulfáty, fosfáty).

Stanovené koncentrace sérových síranů korelovaly s klinickým stavem pacienta a ostatními parametry (parametry acidobazické rovnováhy). Koncentrace dosahovaly hodnot v rozsahu referenčního rozmezí až po hodnoty významně zvýšené (nad 1,2 mmol/l).

Prokázali jsme, že obě turbidimetrické metody lze použít pro stanovení síranů v séru pacientů s vážnými poruchami metabolismu. Potvrdili jsme, že významnou roli u metod pracujících na principu turbidimetrie hrají interference (zejména vliv hemolýzy a chylozity). Komerční kvantichromsulfátová metoda je méně náchylná k interferencím, než želatinázová BGR metoda (nebyly prokázány interference 400 mmol/l chloridu sodného, 500 mmol/l urey, 5 mmol/l fosfátu sodného, 4 mmol/l citrátu sodného a 1,5 mmol/l EDTA). Možný vliv interferencí byl potvrzen i statistickým vyhodnocením výsledků na hladině pravděpodobnosti  $\alpha = 0,05$ , kdy lze na základě porovnání hodnot před hemodialýzou a po hemodialýze pomocí neparametrického t- testu zaznamenat statisticky významně vyšší rozdíly při stanovení kvantichromsulfátovou metodou ( $p < 0,001$ ), zatímco rozdíly hodnot při použití želatinázové metody byly významně méně signifikantní ( $p < 0,037$ ). Rozdíl ve významnosti obou metod byl způsoben i tím, že u několika pacientů byly při použití želatinázové metody hodnoty síranů před hemodialýzou stejné, nebo nižší než hodnoty pacientů po hemodialýze, zatímco u komerční kvantichromsulfátové metody tento jev související pravděpodobně s nedostatečnou eliminací interferencí (fosfátů, proteinů, bilirubinu, sodných kationtů) nebyl zaznamenán.

## 5. ZÁVĚR

Síra se v organismu vyskytuje ve formě aminokyselin, jejichž odbouráváním vzniká sulfát, který jsme u vybraného vzorku pacientů stanovovali.

Prokázali jsme statisticky významné změny koncentrací síranových aniontů u pacientů s vážnými poruchami metabolismu zařazených do dialyzačního programu. Prokázali jsme možnost využití turbidimetrických metod stanovení síranových aniontů při běžném laboratorním provozu. U pacientů jsme zaznamenali zvýšené koncentrace sulfátu, což je způsobeno sníženou schopností organismu odbourávat sulfáty.

Kvantichromsulfátová a želatinázová metoda jsou použitelné pro stanovení sulfátu v séru pacientů se závažnými metabolickými poruchami. Kvantichromsulfátová metoda je významně méně zatížena interferencemi, než metoda želatinázová.

## 6. LITERATURA

1. Murray R. K., Granner D. K, Mayes P. A., Rodwell V. W.: Harperova biochemie, H & H (1998)
2. QuantiChrom Sulfate Assay Kit. BioAssay Systems, Hayward 2006
3. Schneiderka P a kol.: Poruchy acidobazické regulace. Kapitoly z klinické biochemie, Karolinum, Praha 2005
4. Masopust J.: Metabolismus proteinů a aminokyselin, Zdravotnické noviny 37, 1 – 3 (2000)
5. Hernanz A., Plaza A., Martin-Mola E., De Miguel E.: Increased Plasma Levels of Homocysteine and Other Thiol Compounds in Rheumatoid Arthritis Women. Clinical Biochemistry 32, Elsevier (1999)
6. Diviš L.: Aminokyseliny – popis funkce se zaměřením na využití v kulturistice (2000) [http://powerfit.cz/aminokyseliny\\_popis\\_funkce\\_s\\_zamerenim\\_na\\_vyuziti\\_v\\_kulturistice.html](http://powerfit.cz/aminokyseliny_popis_funkce_s_zamerenim_na_vyuziti_v_kulturistice.html)
7. Přistoupil T., Přistoupilová K.: Homocystein a civilizační choroby. Jeho význam v metabolismu a v lékařské diagnostice. Vesmír 81, 624 (2002)
8. <http://www.mzti.kvalitne.cz/labtech/2005/aminoacidopatie.ppt>
9. Olejárová M.: Symptomatická terapie osteoartrózy Farmakoloterapie 6. (2006)
10. <http://www.psmorfeus.com/docs/vyziva/Proteiny.ppt>
11. Šonka J.: Dehydroepiandrosteron. Nové kouzlo proti stárnutí. Vesmír 75, 305 – 305 1996.
12. <http://www.jergym.hiedu.cz/~canovm/alkaloid/prirlatk/h3.html>
13. Zima T.a kol: Laboratorní diagnostika. Galén. Praha 2002
14. Richter R.: Osteoartróza a její ovlivnění přírodními látkami používanými v doplňcích stravy, Praktické lékařství 2007
15. Spectria.: DHEAS RIA. Radioimunoanalytické stanovení, zkumavky s navázanou protilátkou. Kat.č.67793. Návod k použití soupravy. 2004
16. Šácha P. <http://www.symbinatur.com/clanek.php?id=165>
17. Dostálek P.: Alergeny v pivu. VŠCHT, Praha.2005
18. Dvořák J., Štěrba K., Dostálek P.: Elektrochemické stanovení oxidu siřičitého v pivu. VŠCHT Praha, 2006
19. Štern P. a kolektiv: Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory, Praha 2005

20. Hermanová I.: Stanovení síranů v odpadních vodách – porovnání dvou užívaných metod (kapilární izotachoforéza a turbidimetrie), Ústav technologie vody a prostředí, VŠCHT 2003
21. Šíma J., Holcová V., Dušek J., Diáková K.: Analytické přístupy ke studiu redoxních vlastností umělého mokřadu, Chem. Listy 100, 911-918 (2006)
22. Synek: Chemický a fyzikální rozbor vody. Metody stanovení anorganických iontů ve vodách, 2007
23. Hoffer LJ, Hamadeh MJ, Robitaille L: Human sulfate kinetics. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 289, 373 - 380 (2005)
24. Petrlova J., Mikelova R, Stejskal K, Kleckerova A, Zitka O, Petrek J, Havel L, Zehnalek J, Vojtech A, Trnkova L, Kizek R.: Simultaneous determination of eight biologically active thiol compounds using gradient elution-liquid chromatography with Coul-Array detection, J Sep Sci. 29, 1166-73 (2006)
25. Morhead K., Kenneth E. S.: Osteoartróza. Léčba onemocnění s multifaktoriální etiopatogenezí (2004)
26. Pšenák O.: Poruchy acidobazické rovnováhy. (2003)  
[http://patf.lf1.cuni.cz/stumat/poruchy\\_abr.pdf](http://patf.lf1.cuni.cz/stumat/poruchy_abr.pdf)
27. Okáč A.: Základy analytické gravimetrie 62-66, Academia, Praha 1974.
28. Rábl V., Kozák P., Stejskal M.: Technologie ropy 105 – 129, VŠCHT, Praha (1991)
29. Persson G.A.: Automatic colorimetric determination of low concentrations of sulphate for measuring sulphur dioxide in ambient air. Air Water Pollut., 10, 845-852 (1966)
30. Miller E., Hlad C. J., Levine S., Holmes J. H., Elrick H.: The use of radioisotopes to measure body fluid constituents. I. Plasma sulfate J. Lab. Clin. Med. 58, 656–661 (1961)
31. Henriksen A., Bergmann-Paulsen I.M.: An automatic method for determining sulphate in natural soft water and precipitation. Vatten 2, 187-192. (1974)
32. Knejzlík Z., Káš J., Ruml T.: Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. Chemické Listy 94, 913-918 (2000)
33. Novák I, Rokyta R. Jun., Matějovič M., Kroužecký A.: Nutriční strategie u kriticky nemocných s akutní renální dysfunkcí v rámci multiorgánového selhání léčených kontinuálními eliminačními technikami. Nefrologie 4, Tigis, Praha (2004)
34. Regner F., Kalous J.: Analytická chemie I. Fakulta chemicko-technologická. Univerzita Pardubice (2004)

35. Klipp W. R., Barney J.E.: Determination of Sulfur Traces in Naphthas by Lamp Combustion and Spectrophotometry, *Analyt. Chemistry* 31, 596-597 (1959)
36. Newton W.T., Murphy J., Mullins L.E.: Determinations. of radiosulphate. in biologic fluids and tis. Sues, J. *Lab. Clin. Med* 69, 518 – 518 (1967)
37. Wiedmann G., Leskovar R.: Z.: A review of methods for the determination of sulphate in urine, *Chem. Klin. Biochem.* 12, 103 – 103 (1974)
38. Lomako S. V., Astapovich R. I., and col.: Sulfate-selective electrode and its application for sulfate determination in aqueous solutions, *Analytica Chimica Acta* 562, 216 – 222 (2006)
39. Suterland I.T.: A disadvantage of barium chloranilate as a reagent for the determination of microgram amounts of sulphate in biological fluids, *Clin.Chim. Acta* 14, 554 – 549 (1966)
40. Dodgson K.S.: Determination of Inorganic Sulphate in Studies on Enzymic and Non-Enzymic Hydrolysis of Carbohydrate and Other Sulphate Esters. *Biochem. J.* 78, 312 – 318 (1961)
41. Klouda P.: *Moderní analytické metody*, Ostrava 2003
42. Remy H.: *Anorganická chemie I* 740, SNTL, Praha 197
43. van Staden J.F.: Automated Turbidimetric Determination of Sulphate in Surface, Ground and Domestic Water by Flow-Injection Analysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 310, 239 – 242 (1982)
44. Wainter A., Koch A.L.: A review of methods for the determination of sulphate in urine, *Analyt. Biochem.* 1962.

## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

– SH	Thiolová skupina
ABR	Acidobazická rovnováha
ACTH	Adrenokortikotropní hormon
AMK	Aminokyselina
APT	Adenosintrifosfát
BGR	Roztok želatiny a chloristanu barnatého
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteron-sulfát
EBC	European Brewery
FIA – ED	Průtoková injekční analýza s elektrochemickou detekcí
HD	Hemodialýza
HPLC	Vysoko – účinná kapalinová chromatografie
LDL	Lipoproteiny o nízké denzitě
MODS	Multiorgánové selhání
MSM	Methylsulfometan
RIA	Radioizotopová metoda
XRF	Rentgenová fluorescence