

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd

Dna - diagnostika a klinickobiochemické vyšetření  
Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Miloslava Netopilová, PhD.

Hradec Králové, 2010

Kateřina Jägerová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

V Hradci Králové 6. 5. 2010

.....

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí bakalářské práce PharmDr. Miloslavě Netopilové za cenné rady a pomoc při vypracování bakalářské práce. Zároveň děkuji RNDr. Zdeňkovi Veškrnovi z OKB Nemocnice Znojmo za odbornou pomoc, praktické rady, cenné informace a připomínky a za ochotné poskytnutí materiálů.

## OBSAH

<b>ÚVOD.....</b>	<b>6</b>
<b>1 PATOGENEZE DNAVÉ ARTRITIDY .....</b>	<b>7</b>
1.1 KLINICKÝ OBRAZ DNY .....	10
1.1.1 Asymptomatická hyperurikémie.....	10
1.1.2 Akutní dnavá artritida .....	10
1.1.3 Období interkritické dny.....	10
1.1.4 Chronická tofózní dna.....	11
<b>2 METABOLISMUS KYSELINY MOČOVÉ.....</b>	<b>12</b>
2.1 BIOSYNTÉZA PURINOVÝCH NUKLEOTIDŮ .....	12
2.1.1 Vznik IMP.....	12
2.1.2 Přeměna IMP na jiné purinové nukleotidy .....	13
2.2 REGULACE BIOSYNTÉZY PURINOVÝCH NUKLEOTIDŮ.....	13
2.2.1 Vliv velikosti hotovosti PRPP na řízení biosyntézy purinových nukleotidů. 13	
2.2.2 Regulace PRPP-glutamylamidotransferasy zpětnou vazbou .....	13
2.2.3 Řízení syntézy AMP a GMP z IMP zpětnou vazbou.....	14
2.3 TVORBA KYSELINY MOČOVÉ Z PURINNUKLEOSIDŮ .....	15
2.4 REUTILIZACE PURINOVÝCH BAZÍ.....	18
2.5 VYLUČOVÁNÍ.....	19
2.5.1 Mechanismus renální urátové reabsorbce.....	19
2.5.2 Identifikace a charakteristika URAT-1 .....	19
2.5.3 Transport urátů v proximálním tubulu ledvin.....	20
<b>3 HYPERURIKÉMIE .....</b>	<b>21</b>
3.1 PATOFYZIOLOGIE HYPERURIKÉMIE.....	21
3.1.1 Primární hyperurikémie .....	21
3.1.2 Sekundární hyperurikémie.....	24
<b>4 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA DNY .....</b>	<b>27</b>
4.1 KRITÉRIA .....	27
4.2 VYŠETŘENÍ KLOUBNÍ TEKUTINY.....	29
4.2.1 Odběr vzorku .....	29
4.2.2 Makroskopické vyšetření.....	30
4.2.3 Mikroskopické vyšetření.....	30
4.2.4 Cytologická analýza kloubního výpotku .....	31

4.3	PRŮKAZ KRYSTALŮ NATRIUMURÁTU V TOFECH .....	32
4.4	RENTGENOVÝ OBRAZ .....	33
4.5	STANOVENÍ KYSELINY MOČOVÉ V KRVI A MOČI .....	33
4.5.1	Preanalytické fáze .....	33
4.5.2	Používané metody .....	34
4.5.2.1	Referenční metoda .....	34
4.5.2.2	Chemické metody .....	34
4.5.2.3	Enzymové metody .....	35
4.5.2.4	Elektrochemické metody .....	36
4.5.3	Referenční rozmezí hodnot .....	36
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>38</b>
	<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>39</b>
	<b>LITERATURA .....</b>	<b>40</b>

## ÚVOD

Cílem mojí bakalářské práce je popsat dnu, příčiny, důsledky onemocnění a především kritéria a laboratorní stanovení dny.

Dna (arthritis urica) též zvaná podagra je zánětlivé kloubní onemocnění způsobené poruchou metabolismu purinů, především kyseliny močové, která se hromadí v těle. Zvýšení kyseliny močové v krvi (hyperurikémie) se objevuje buď kvůli její nadměrné tvorbě nebo poruchou jejího vylučování ledvinami nebo kombinací obou těchto faktorů. V důsledku vysoké koncentrace kyseliny močové v krvi dochází ke krystalizaci této látky. Krystaly kyseliny močové se ukládají na kloubních chrupavkách, na šlachách a na ušních boltcích. Důsledkem jsou prudké a bolestivé záchvaty způsobené zánětem kloubu. Bolesti trvají hodiny až 6 týdnů s následným bezpříznakovým obdobím. Akutní zánět často přechází v celoživotní chronické onemocnění. Opakované záchvaty jsou méně intenzivní, avšak vedou k trvalejšímu poškození kloubů.

# 1 PATOGENEZE DNAVÉ ARTRITIDY

Zvýšení hladiny kyseliny močové v séru (hyperurikémie) je podmínkou vzniku dny, přesto však většina lidí s hyperurikémií nikdy dnu nedostane (Růžička, 2003).

V poslední době se výskyt dny neustále zvyšuje především v zemích s vysokou životní úrovní a nadměrnou výživou. Výskyt dny kolísá v populaci kolem 1 %.

Asi u 90 % nemocných jde o dnu primární. Primární dna vzniká jako vrozená metabolická porucha purinového metabolismu, vrozená porucha ledvin nebo zvýšený příjem purinů potravou. Asi v 10 % onemocnění se jedná o dnu sekundární, která vzniká jako následek jiného onemocnění. Sekundární dna je způsobená nadprodukcí kyseliny močové způsobené (lymfoproliferativním, myeloproliferativním onemocněním, karcinomy, hemolytickou anémií) nebo sníženým vylučováním kyseliny močové způsobené renální poruchou či léky. (Růžička, 2003).

O dnové artritidě se mluví jako o nejčastějším zánětlivém kloubním onemocnění u mužů nad 40 let (Žurek, 2006). Dna postihuje asi v 90 % muže a v 10 % ženy (Růžička, 2003). Začátek onemocnění je tedy u mužů průměrně 40 let u žen se tento věkový průměr zvyšuje na 55 let. Tento pohlavní rozdíl se vysvětluje sníženými hladinami 17-beta-estradiolu a zvýšeným poměrem testosteronu a 17-beta-estradiolu. Tato hormonální nerovnováha pravděpodobně ovlivňuje syntézu purinů de novo (Růžička, 2003).

Příčinou zánětlivé ataky je soubor více faktorů jako je například interakce urátu a chrupavky, mechanických faktorů, nižší teploty, změny pH, drobná mikrotraumata atd.

Vodný roztok plazmy je při koncentraci sodného iontu 130 mmol/l a teplotě 37 °C nasycen urátem při koncentraci 384 až 408 μmol/l. Rozpustnost urátu může být poněkud vyšší než hodnota saturace, protože část urátů je navázána na proteiny, které účinně snižují koncentraci volného urátu v plazmě. Velikost této frakce je asi 6-12 μmol/l. Při teplotě 37 °C je saturační hodnota urátu v plazmě kolem 420 μmol/l a hodnoty vyšší než tato mez jsou považovány za abnormální (Zima, 2002). Hladina kyseliny močové v synoviální tekutině je stejná jako v séru. Supersaturace séra a synoviální tekutiny kyselinou močovou je nutnou, ale ne jedinou podmínkou

formování krystalů (Pavelka, 2003). Krystaly natriumurátu mohou vznikat akutní krystalizací nebo mohou být uvolňovány z depozit v chrupavce, kosti a šlachách (Růžička, 2003). Většina autorů se domnívá, že mnohem důležitější je mechanismus druhý, a to postupná pomalá depozice urátů v hyalinní kloubní chrupavce, synoviální membráně a v přilehlé části kosti (Pavelka, 2003).

V kloubním prostředí proti sobě dlouho působí dva protichůdné mechanismy. Na jedné straně tendence hypersaturovaných urátů k metastazování a ukládání, na druhé straně inhibiční mechanismy bránící depozici především do kloubní chrupavky. K nejdůležitějším inhibičním mechanismům patří avaskularita kloubní chrupavky, intaktní makromolekuly proteoglykanů a přítomnost anorganického pyrofosfátu. Jestliže dojde k oslabení těchto inhibičních mechanismů, mohou převládnout tendence k usazování krystalického materiálu. V průběhu stárnutí dochází ke změnám v metabolismu proteoglykanů, které vedou k porušení integrity těchto makromolekul. Tyto změny ve struktuře kolagenu a vznikající metaplasie chrupavky mohou přispívat k snadnějšímu usazování krystalického materiálu. Je zde ještě řada faktorů, které mohou ovlivňovat formování krystalů v kloubech. Velmi důležitý je faktor teploty. Plazma je saturována kyselinou močovou při teplotě 37 °C při 6,8 mg/100 ml. Při poklesu teploty na 30 °C klesá saturační práh na 4,5 mg/100 ml. Je přitom známo, že existuje rozdíl mezi centrální tělesnou teplotou a teplotou v kloubech. Častý výskyt dnave artritidy v noci, kdy je teplota v kloubech nízká, by tento možný faktor snížené teploty podporoval (Pavelka, 2003).

Důležitým momentem pro možnost formování krystalického materiálu může být i chronická traumatizace. Vždyť první metatarzální kloub na palci nohy, kde se dna nejčastěji manifestuje, je kloubem, kde vzniká největší tlak na 1 cm<sup>2</sup> ze všech kloubů v těle. Mechanické poškození pojivové tkáně pak může být příčinou mechanismu depozice krystalů (Pavelka, 2003).

Vlastní dnava artritida je vyvolána uvolněním krystalů natriumurátu z preformovaných uloženin do kloubní tekutiny. Krystaly jsou uvolněny buď následkem mechanického stresu (např. následkem mikrotraumatu) nebo při částečném rozpuštění. Přítomnost krystalů natriumurátu v kloubní dutině ještě neznamena automaticky vznik zánětu, o čemž svědčí identifikace krystalů v asymptomatických kloubech. Krystalů musí být určitý počet, musí mít určitý vhodný tvar a velikost. Bylo např. prokázáno, že největší



schopnost vyvolávat záchvat mají krystaly středně velké (kolem 7 mikronů), zatímco krystaly malé a naopak velmi velké mají podstatně menší schopnost vyvolávat záchvat (Pavelka, 2003).

V první fázi zánětlivé reakce dochází k obalení krystalů bílkovinou, převážně IgG. Takto obalený krystal může vyvolat zánětlivou reakci tak, že přímo aktivuje některé proteiny a enzymové systémy. Další možnost vyvolání zánětlivé reakce je taková, že po kontaktu s membránou buněk se mění jejich metabolismus a vede k uvolňování zánětlivých mediátorů. Polymorfonukleární leukocyty fagocytují krystaly obalené bílkovinou (Růžička, 2003).

Uvnitř buňky je krystal obalen membránou a vzniká fagosom. Jestliže se spojí s lyzosemem, vzniká tzv. fagolyzosom. Urátové krystaly absorbují na svém povrchu četné proteiny včetně lyzomálních enzymů, což pak zvyšuje schopnost krystalu porušit lyzosom. Organely perforují, porušuje se celá struktura buňky, což nakonec vyústí v tzv. degranulaci buňky, nebo-li v únik součástí buněčné cytoplazmy do okolí. Konečným důsledkem je pak zánik celé buňky a uvolnění krystalu do prostředí, kdy je ihned fagocytován dalším polymorfonukleárem. Rozpadem leukocytů mají uvolněné látky důležitou úlohu při tvorbě a udržování zánětlivé odpovědi organismu a vzniku poškození tkáně (Pavelka, 2003).

Pro dnovou artritidu je typický epizodický charakter. Akutní artritida zpravidla během několika dní spontánně odezní. Byla vyslovena řada hypotéz, které se snažily tento časově omezený charakter dnové artritidy vysvětlit. Z nich nejrozšířenější byla představa, že dochází k postupné destrukci krystalického materiálu myeloperoxidázou fagocytujících polymorfonukleárů (Pavelka, 2003).

Někteří nemocní prodělají řadu akutních zánětlivých epizod, aniž dojde k přechodu do chronické artritidy. U jiných, někdy i po relativně malém počtu akutních příhod, vzniká chronická artritida. Akutní a chronická artritida představují dvě zcela odlišné situace. Zatímco akutní artritida je charakterizována především vazodilatací a invazí polymorfonukleárů, chronickou artritidu odlišuje přítomnost makrofágů v zánětlivých lezích, vznik fibrózy a novotvorba cév. Mechanismus, který udržuje chronickou zánětlivou reakci, není znám. Malawista (1985) se domnívá, že chronická digesce urátů z deposit mononukleárními buňkami vede k uvolňování interleukinu I. Tento biologicky silně aktivní lymfokin pak stimuluje synoviální buňky k sekreci kolagenázy

a prostaglandinů. Dále může stimulovat chondrocyty k tvorbě vlastních proteáz a prostaglandinů. Uvolňování krystalického materiálu tedy vede ke stejným pochodům jako tvorba imunitních komplexů u revmatoidní artritidy. Odtud snad pramení i podobnost artritického obrazu revmatoidní artritidy a chronické dny (Pavelka, 2003).

## **1.1 Klinický obraz dny**

V přirozeném průběhu onemocnění prochází dna čtyřmi základními stádii:

- 1) asymptomatická hyperurikémie
- 2) akutní dnavá artritida
- 3) období interkritické dny
- 4) chronická tofózní dna

### **1.1.1 Asymptomatická hyperurikémie**

Období asymptomatické hyperurikémie je období zvýšené hladiny kyseliny močové v krvi bez vzniku artritidy, tofů a ledvinové koliky (Růžička, 2003). Renální koliku ještě před první atakou dny prodělává 10-40 % pacientů. Stadium asymptomatické hyperurikémie trvá v průměru 20 let a končí atakou dnavé artritidy nebo nálezem urolitiázy (Žurek, 2006).

### **1.1.2 Akutní dnavá artritida**

První ataka bývá většinou monoartikulárního typu. Typickou lokalizací dnavé artritidy je metatarzofalangeální kloub palce nohy. Dnavá artritida se převážně projevuje na kloubech nohy, kotníku, patě, zápěstí, kloubech prstů, rukou a loktech (Žurek, 2006).

Za provokující faktory dnavého záchvatu se považují trauma, chirurgický zákrok, konzumace většího množství jídla a alkoholu (Pavelka, 2003). V laboratorním obraze je patrné zvýšení laboratorních ukazatelů zánětu (sedimentace erytrocytů, leukocytóza, CRP) (Žurek, 2006). Typický dnavý záchvat odezní do 1-2 týdnů, vzácněji do 4-6 týdnů do úplné remise a nastává další období, fáze interkritické dny (Pavelka, 2003).

### **1.1.3 Období interkritické dny.**

Interkritickou fází bývá označováno asymptomatické období mezi záchvaty dnavé artritidy. Frekvence atak dnavé artritidy se zvyšuje u neléčených pacientů, ataky

v dalším průběhu dny mají méně náhlý začátek, jsou častěji polyartikulární, průběh je delší, nicméně dochází ještě ke kompletnímu vymizení potíží (Žurek, 2007).

#### **1.1.4 Chronická tofózní dna**

V chronické fázi dny nacházíme v různých tkáních tofy, což jsou depozita krystalů natriumurátu v měkkých tkáních. Tofy se objevují u poloviny nemocných za 10 let od první ataky dnové artritidy, ve většině případů se však jedná pouze o minimální depozita krystalů. Tvorba tofů souvisí s dobou trvání a stupněm hyperurikémie. Tofy se mohou objevit v různých lokalizacích, především však v periartikulární oblasti drobných kloubů nohou, rukou, kotníků, kolen a předloktí a v oblasti zevního ucha. Pro chronickou fázi dny jsou typické akutní rekurentní ataky mono-, oligo- až polyartritidy a chronická artritida s nevýraznými známkami zánětu a s deformitami způsobenými periartikulárními tofózními depozity (Žurek, 2007).

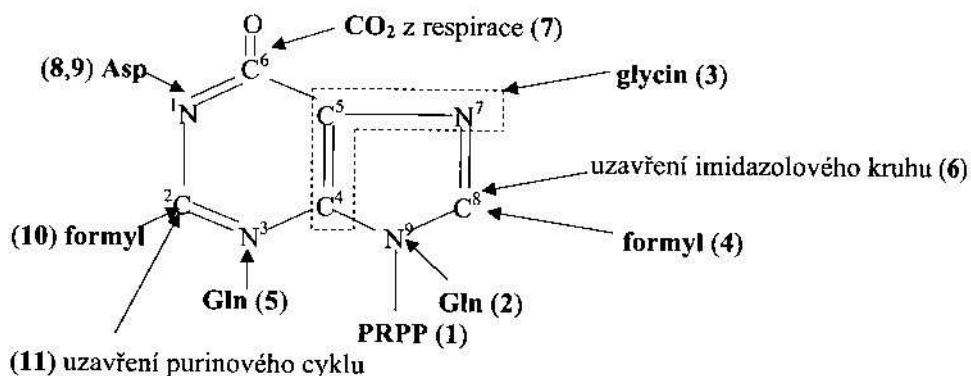
## 2 METABOLISMUS KYSELINY MOČOVÉ

### 2.1 Biosyntéza purinových nukleotidů

Organismus není odkázán jen na příjem pro organismus nezbytných nukleotidů potravou, dokáže si je i sám syntetizovat. Hlavním místem syntézy jsou játra. Pro syntézu platí zásada, že purinové nukleotidy se nevytvářejí tak, že by se nejprve zformovala purinová база a na ni se postupně připojovali další substituenty. Ve skutečnosti se syntetizují přímo nukleotidy. Sledem reakcí se postupně vytvářejí oba kondenzované kruhy purinové báze, a to z malých výchozích prekurzorů (Ledvina, 2006).

#### 2.1.1 Vznik IMP

Zdroje pro výstavbu prvního nukleotidu IMP (inosinmonofosfátu) a časový sled reakcí ukazuje (Obr. 1). Přenosem difosfátu z ATP na ribosa-5-fosfát za přispění enzymu PRPP-synthetasy vznikne 5-fosforibosyl-1-difosfát (PRPP). Enzym PRPP-glutamylamidotransferasa katalyzuje uvolnění difosfátu z PRPP amidovým dusíkem glutaminu a vytvoří se 5-fosforibosylamin (Murray, 2002). Následují další kroky reakce s glycinem (3) a s tetrahydrofolátem nesoucím jednouhlíkatý formyl (4). Další reakcí se ke glutaminu předá dusík a vytvoří se N<sup>3</sup>. Teprve potom se uzavře pětičlenný imidazolový kruh (6). Připojením CO<sub>2</sub> karboxylací s využitím karboxybiotinu (7) vzniká budoucí C<sup>3</sup>. Dusík N<sup>1</sup> pochází z aspartátu (8, 9). Zapojení C<sup>2</sup> umožní další formyl nesený tetrahydrofolátem (10). Posledním aktem je úplné uzavření heterocyklu. Vzniká nukleotid IMP, inosinmonofosfát. Na několika místech tohoto sledu reakcí je zapotřebí ATP (reakce 1, 3, 5, 6) (Ledvina, 2006).



Obr. 1. Tvorba IMP (Ledvina, 2006)

### **2.1.2 Přeměna IMP na jiné purinové nukleotidy**

Aby se vytvořily ribonukleotidy schopné začlenění do nukleových kyselin, vzniká nezbytnost přeměny na guaninové a adeninové nukleotidy. Z IMP vzniká pomocí enzymu adenylsukcinátsynthetasy AMP. Pro tuto přeměnu je nutná přítomnost GTP. Za pomoci enzymu IMP-dehydrogenasy vzniká z IMP GMP. Obdobně je pro tuto přeměnu zapotřebí ATP. Tyto reakce se neobejdou bez inkorporace dusíku. Jeho zdrojem je aspartát při tvorbě AMP a glutamin při tvorbě GMP (Obr. 2) (Ledvina, 2006).

## **2.2 Regulace biosyntézy purinových nukleotidů**

Biosyntéza purinových nukleotidů je v játrech přísně regulována. Savčí játra jsou hlavním místem biosyntézy purinových nukleotidů. Poskytují puriny a jejich nukleotidy pro šetřící procesy ve tkáních, které nejsou schopny syntetizovat puriny de novo. Např. lidský mozek má nízkou hladinu PRPP-glutamylamidotransferasy a je tudíž částečně závislý na exogenních purinech. Erytrocyty a polymorfonukleární leukocyty nemohou syntetizovat 5-fosforibosylamin, a tak tvoří nukleotidy z exogenních purinů. Periferní lymfocyty však mohou puriny syntetizovat de novo (Murray, 2002).

### **2.2.1 Vliv velikosti hotovosti PRPP na řízení biosyntézy purinových nukleotidů**

Jelikož biosyntéza IMP z amfibolických metabolitů (ribosa-5-fosfát s ATP za vzniku PRPP a postupným vytvořením purinového kruhu) spotřebovává glycin, glutamin, deriváty kyseliny tetrahydrolistové, aspartát a ATP, je nezbytné, aby buňka biosyntézu purinů řídila. Hlavním faktorem celkové rychlosti biosyntézy purinů de novo je koncentrace PRPP, což je parametr, který je výsledkem relativní rychlosti syntézy PRPP, jeho spotřeby a jeho degradace. Rychlost syntézy PRPP závisí jak na dostupnosti ribosa-5-fosfátu, tak na aktivitě PRPP-synthetasy. Tento enzym závisí na koncentraci fosfátu a na purinových nukleotidech, které působí jako jeho allosterické regulátory (Obr. 3) (Murray, 2002).

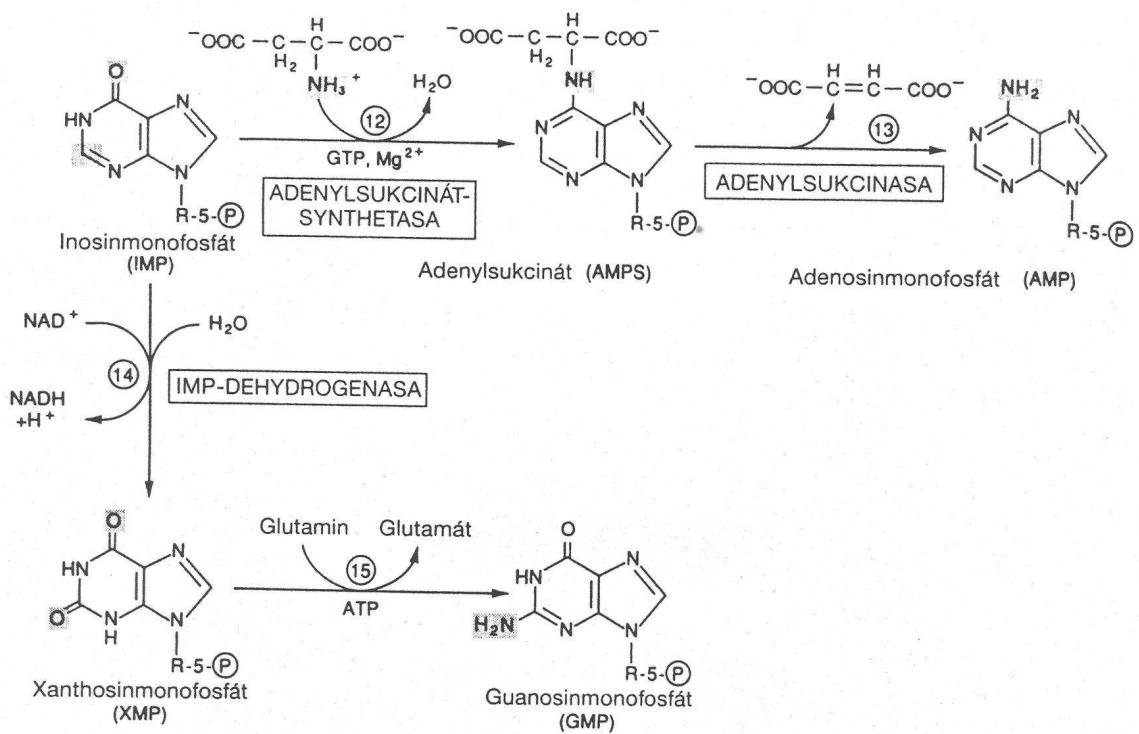
### **2.2.2 Regulace PRPP-glutamylamidotransferasy zpětnou vazbou**

PRPP-glutamylamidotransferasa, první enzym specifický pro biosyntézu purinů, je zpětnou vazbou inhibována purinovými nukleotidy, zvláště AMP a GMP, které kompletují s PRPP (Obr. 3). Řízení syntézy purinů prostřednictvím amidotransferasové

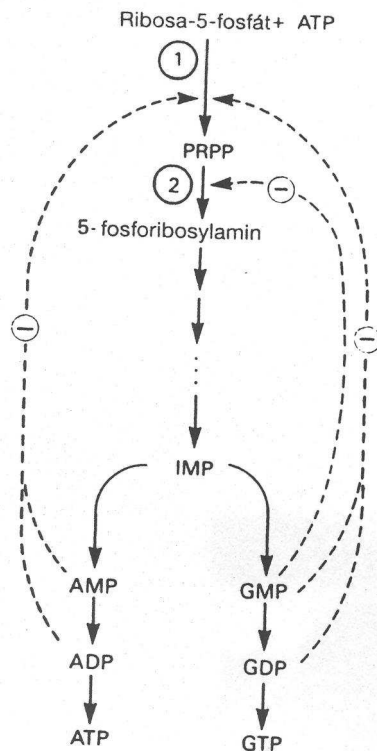
reakce má asi menší fyziologický význam než řízení prostřednictvím PRPP-synthetasy (Murray, 2002).

### 2.2.3 Řízení syntézy AMP a GMP z IMP zpětnou vazbou

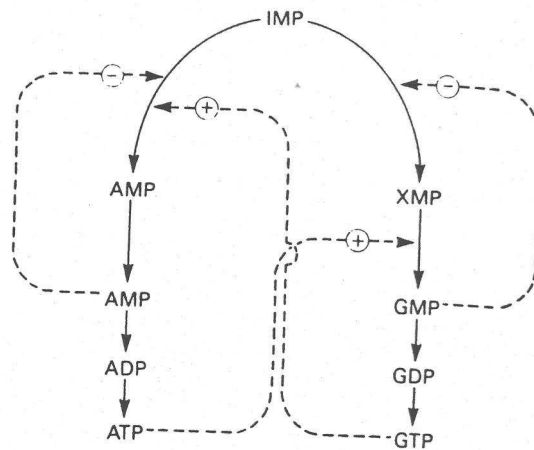
Přeměna IMP na GMP a AMP je řízena dvěma mechanismy. AMP řídí zpětnou vazbou adenylsukcinátsynthetasy a GMP inhibuje zpětnou vazbou IMP-dehydrogenasu. Kromě toho přeměna IMP na adenylsukcinát při syntéze AMP vyžaduje GTP a konverze xanthinylátu (XMP) na GMP vyžaduje ATP (Obr. 2). Zkřížená regulace mezi cestami metabolismu IMP tak slouží ke snížení syntézy jednoho purinového nukleotidu, pokud je nedostatek toho druhého (Obr. 4). AMP a GMP inhibují též hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasu (syntéza IMP z hypoxanthinu, resp. GMP z guaninu) (Murray, 2002).



Obr. 2. Přeměna IMP na AMP a GMP (Murray, 2002)



Obr. 3. Řízení rychlosti syntézy purinových nukleotidů de novo (Murray, 2002)



Obr. 4. Řízení přeměny IMP na adeninové a guaninové nukleotidy (Murray, 2002)

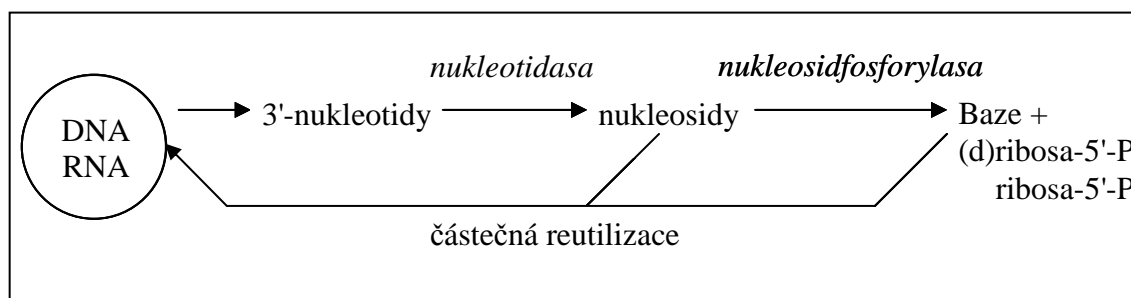
### 2.3 Tvorba kyseliny močové z purinnukleosidů

Konečným produktem degradace purinů u člověka je kyselina močová. Nepřítomnost urikasy kombinovaný se značnou reabsorbí filtrovaných urátů způsobuje, že hladina urátů v lidské plazmě je přibližně desetkrát taková, jako u ostatních savců. Evoluční

výhoda tohoto zjištění je nejasná, zdá se ale, že kyselina močová může sloužit jako primární antioxidant v krvi, protože může přemísťovat singletový kyslík a radikály tak efektivně, jako vitamín C ( hladina kyseliny močové v plazmě je přibližně šestkrát taková jako hladina vitamínu C) (Choi a kol., 2005).

Kyselina močová je u lidí hlavním katabolitem purinových nukleotidů, adenosinu a guanosinu. Téměř všechna kyselina močová v plazmě (96,8 %) je přítomna ve formě monosodné soli (Dastych, 2008). Kyselina močová pochází buď z přímého odbourávání nukleových kyselin přítomných ve stravě nebo katabolismem endogenních nukleových kyselin z tkání (Dastych, 2008). Z požitých nukleoproteinů (maso, vnitřnosti) se nejprve odštěpí bílkovina. V pankreatické šťávě ribonukleasy a deoxyribonukleasy uvolňují mononukleotidy, které se dále tráví na nukleosidy. Ty dále podléhají fosforylaci a nukleosidasou z nich uvolní báze (purinové a pyrimidinové), které se často vyloučí močí, a pentosafosfáty. Ačkoli v lékařské praxi se často některým nemocným potraviny obsahující více purinů zakazují, jisté je, že v metabolismu purinů rozhodující úlohu hrají endogenní puriny. Vstřebažené purinové báze vznikající štěpením nukleových kyselin potravy se většinou vylučují (Ledvina, 2006).

Degradace purinových nukleotidů v buňce však probíhá jiným způsobem (Obr. 5). Buněčná DNA a RNA je atakována nukleasami a odštěpí se 3'-nukleotidy, které se degradují na nukleosidy a ty jsou následně atakovány nukleosidfosforylasami. Jako produkt v buňce vznikají volné purinové báze a ribosa-5-fosfát (Ledvina, 2006).

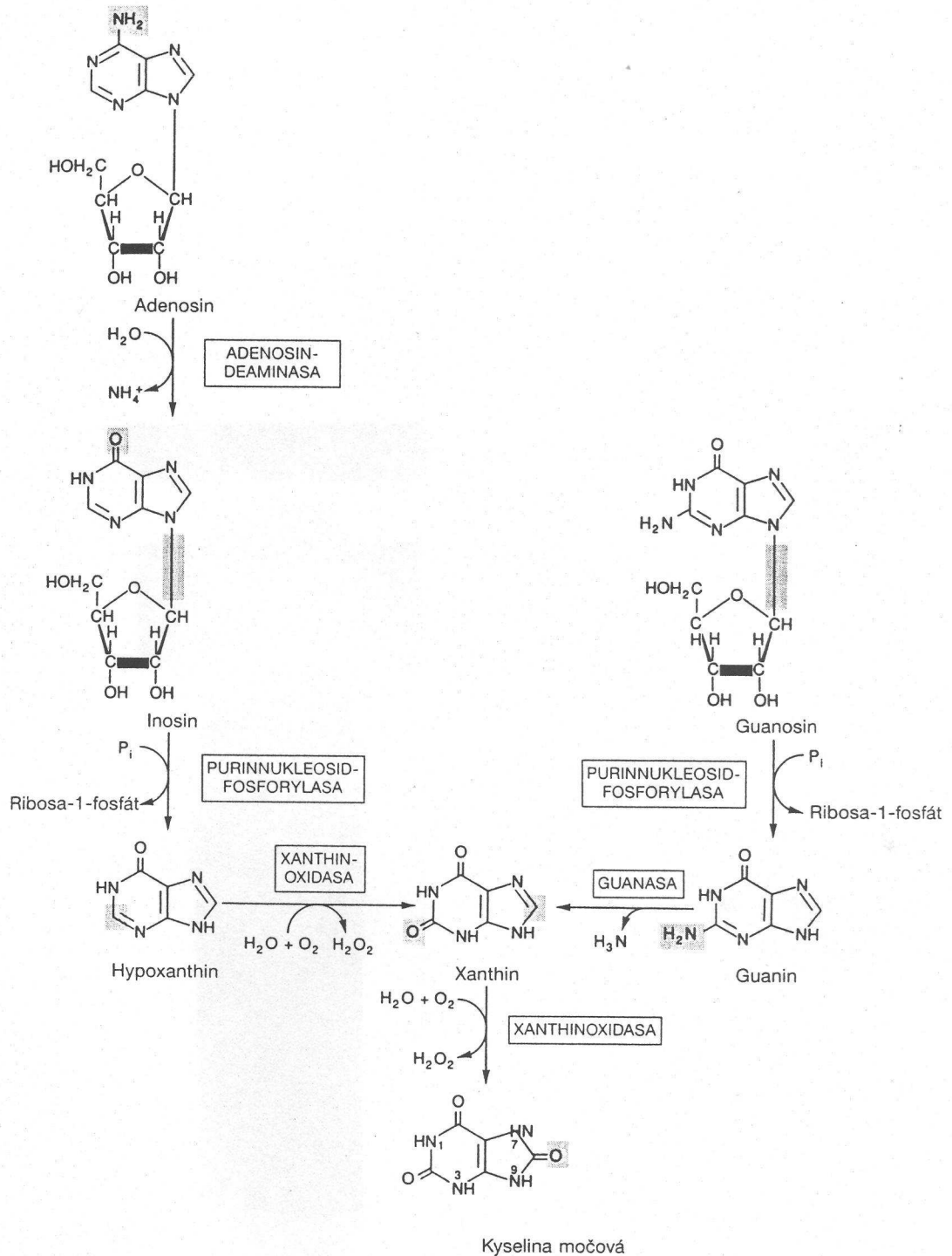


Obr. 5. Degradace purinových nukleotidů v buňkách (Ledvina, 2006)

Odbourávání nukleotidů začíná odstraněním fosfátové skupiny navázané na ribosu v purin-5'-nukleotidasové reakci (Dastych, 2008). Adenosin je deaminován adenosindeaminasou na inosin (Murray, 2002). Ribosa-1-fosfát je odstraněna z inosinu a guanosinu působením purinnukleosidfosforylasou za vzniku hypoxanthinu a guaninu (Dastych, 2008). Hypoxanthin se pak přemění na xanthin enzymem xanthinoxidasou,



guanin enzymem guanasou. Další reakce katalyzovaná xanthinoxidasou oxiduje xanthin na kyselinu močovou (Obr. 6). Xanthinoxidasa je místem pro farmakologický zásah u pacientů s hyperurikémií a dnou (Murray, 2002).

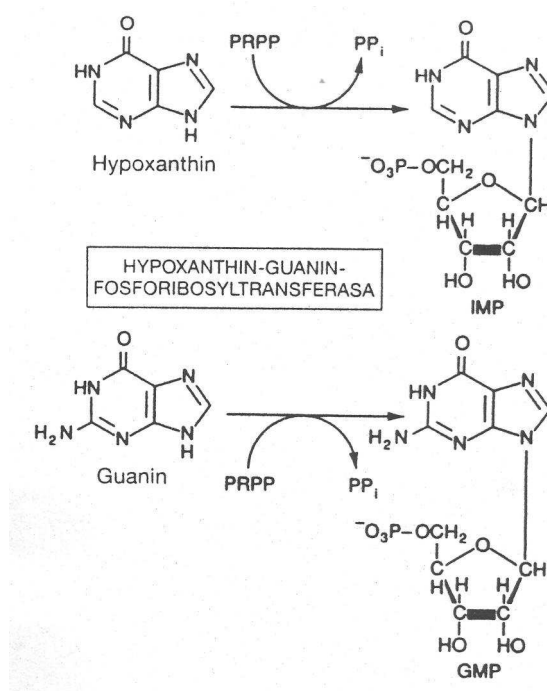


Obr. 6. Tvorba kyseliny močové z purinnukleosidů s meziprodukty hypoxanthinem, xanthinem a guaninem (Murray, 2002)

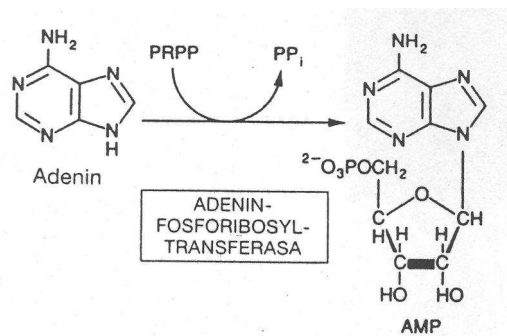
## 2.4 Reutilizace purinových bází

V organismu neustále zanikají buňky a při tom se uvolňují puriny a nukleosidy. Tělo je nemůže definitivně ztratit. Byla prokázána jejich reutilizace, mluví se o záchranné cestě (šetřící reakce, salvatage reaction) (Ledvina, 2006).

Reutilizace hlavních purinových bází, adeninu, hypoxanthinu a guaninu probíhá pomocí metabolických reakcí, ve kterých dochází k resyntéze příslušných nukleotidmonofosfátů fosforibosylací volných bází. Adenin je přeměňován na AMP působením enzymu adeninfosforibosyltransferasy (Obr. 8), hypoxanthin a guanin na IMP a GMP za katalýzy hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasy (Obr. 7). Tato metabolická reakce je z kvantitativního hlediska významnější než reakce adeninfosforibosyltransferasová (Dastych, 2008).



Obr. 7. Fosforibosylace hypoxanthinu na IMP a guaninu na GMP. Obě reakce jsou katalyzovány hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasou (Murray, 2002)



Obr. 8. Fosforibosylace adeninu katalyzovaná adeninfosforibosyltransferasou  
(Murray, 2002)

## 2.5 Vylučování

V lidských ledvinách jsou uráty prakticky 100 % ultrafiltrovány glomerulem. V proximálním úseku nefronu jsou z 99 % zpětně resorbovány pomocí transportéru URAT1. Posléze mohou být sekretovány přímo do tubulu pomocí MRP4, OAT1 a OAT3. Celý tento mechanismus vede k opětovné postsekreční reabsorbci (Teplan, 2000).

### 2.5.1 Mechanismus renální urátové reabsorbce

U lidí reabsorbce urátů převládá, protože je vylučováno méně urátů než je filtrováno v glomerulech. Reabsorbční a sekreční procesy závisí na specifických molekulových transportérech, které spočívají v jejich membráně.

### 2.5.2 Identifikace a charakteristika URAT-1

Transportér, který reabsorbuje uráty, byl nedávno identifikován Enomoto et al. (2002) a byl pojmenován URAT 1 (SLC22A12). URAT1 náleží do organické iontové transportérové rodiny (SLC22). URAT1 je umístěn na apikální membráně buněk proximálního tubulu. V ledvinách jsou uráty transportovány pomocí URAT1 přes apikální membránu buněk proximálního tubulu výměnou za anionty, které jsou transportovány zpět do lumen tubulu k udržení elektrické rovnováhy. Uráty se potom pohybují přes basolaterální membránu do krve pomocí dalších aniontových

transportérů. Urátová sekrece je nejspíše zanedbatelná a URAT1 je hlavním mechanismem regulace hladiny urátů v krvi (Hediger, 2005).

### **2.5.3 Transport urátů v proximálním tubulu ledvin**

V lidských ledvinách byly identifikovány následující urátové transportéry: URAT1, MRP4, OAT1 a OAT3. URAT1 jako apikální anionický urátový výměník je zodpovědný za urátovou renální reabsorpci. OAT1 a OAT3 jsou basolaterální urátové transportéry. Jsou to aniontové výměníky a mohou být zapojené do basolaterální urátové absorpce. Jestli existuje samostatný basolaterální urátový výstupní mechanismus, není dosud známo. MRP4 je apikální, ATP je dependentní urátový exportní transportér. OAT1, OAT3 a MRP4 se asi zapojují v transcelulární urátové sekreci (Hediger, 2005).

### **3 HYPERURIKÉMIE**

Hyperurikémie je definována jako zvýšená hladina kyseliny močové. Hladina kyseliny močové v séru je závislá na pohlaví a věku. U obou pohlaví je v předpubertálním věku hladina kyseliny močové nízká. Za hyperurikémii považujeme u mužů vyšší hladinu kyseliny močové než 420  $\mu\text{mol/l}$  a 360  $\mu\text{mol/l}$  u žen. Výskyt hyperurikémie v populaci kolísá od 4 % do 40 %. Zdá se, že výskyt hyperurikémie celosvětově stoupá. Ve střední Evropě je pravděpodobný výskyt hyperurikémie mezi 10 % až 20 % (Pavelka, 2003).

#### **3.1 Patofyziologie hyperurikémie**

Puriny v organismu pocházejí jednak z diety (exogenní), jednak z rozpadu vlastních nukleotidů (endogenní). Dále jsou puriny tvořeny syntézou de novo. Tato tvorba je regulována pomocí zpětnovazebných mechanismů dle příjmu potravy. Moderní izotopové metody umožnily změřit pool kyseliny močové v organismu. U zdravých mužů činí tato hotovost 860 mg až 1650 mg (průměr 1200 mg) u zdravých žen 540 mg až 640 mg (průměr 590 mg). Hotovost u dnavých nemocných dosahuje 1600 mg až 4000 mg, u pacientů s těžkou tofózní dnou byly popsány hodnoty až 31 000 mg. Kyselina močová je vylučována močí a stolicí. Močí činí podíl asi 2/3 (asi 600 mg denně). Zbytek je vylučován gastrointestinálním traktem, kde je degradován střevními bakteriemi na amoniak a oxid uhličitý (Pavelka, 2003).

Hyperurikémie je definována jako primární, jestliže se objeví jako první v pořadí a není známé jiné onemocnění, které by ji vyvolávalo. Sekundární hyperurikémie je taková, která se vyvine následkem jiného onemocnění nebo léčby. Obecně hyperurikémie, ať již primární nebo sekundární, může být důsledkem zvýšeného příjmu či nadprodukce purinů, nebo snížené ledvinné eliminace purinů, či kombinace obou mechanismů (Zima, 2002).

##### **3.1.1 Primární hyperurikémie**

1) Enzymatický defekt neurčen

a) nedostatečné vylučování ledvinami (90 % primární dny)

Familiární dnavá hyperurikémie, familiární juvenilní hyperurikemická nefropatie (FJHN)

Onemocnění vzniká v mladém věku, je spojeno se vznikem dny a s progredující formou renálního onemocnění. Onemocnění se přenáší autosomálně dominantní formou přenosu. Typickým nálezem je snížená exkreční frakce kyseliny močové ( $EF_{KM}$ ), provázená hyperurikémií a dnavými záchvaty. U některých rodin s FJHN byly nalezeny mutace v tzv. UMOD genu (nový uromodulin). Mutace v UMOD genu jsou pravděpodobně zodpovědné za medulární cystické ledviny typu 2 a část FJHN. UMOD gen kóduje glykoprotein, který je ve značném nadbytku v normální ledvině. Mutace v genu mění pravděpodobně terciální strukturu proteinu. Vyskytují se i rodiny, kde vazba na genový lokus 16p12 (lokus pro FJHN i medulární cystické ledviny typu 2) byla vyloučena. Za FJHN bude pravděpodobně zodpovědný i další gen, který zatím nebyl identifikován. Pro diagnostiku je zvláště typickým nálezem snížená  $EF_{KM}$  (Merta, 2004).

b) nadprodukce (10 % primární dny)

Zvýšený příjem purinů v dietě podstatně přispívá ke zvýšení hladiny kyseliny močové v krvi. Bezpurinová dieta po dobu periody několika dní může snížit hladinu kyseliny močové v moči u zdravého muže od 297  $\mu\text{mol/l}$  do 178  $\mu\text{mol/l}$ . Dostupný purinový obsah konkrétního jídla může záviset na jeho relativní buněčnosti, přepisovatelnosti<sup>1</sup> a metabolické aktivitě buněčného obsahu. Přejít z purinové diety na bezpurinovou poukazuje na změny hladiny kyseliny močové v závislosti na typu a množství poskytnutých purinů. Například RNA má vyšší efekt než ekvivalentní množství DNA a adenin má vyšší efekt než guanin. Nedávná studie ukázala, že muži s vyšším příjmem masa mají o 41 % vyšší riziko dny než muži s příjmem nižším. Dále bylo zjištěno, že muži s vyšším příjmem mořských produktů mají riziko vyšší o 51 % ve srovnání s muži s nízkým příjmem mořských produktů. Nicméně konzumace na puriny bohatých potravin rostlinného původu, jako je například hrášek, fazole, čočka, špenát, houby a květák, nebyla spojována se zvýšeným rizikem pro dnu. Vzhledem k tomuto zjištění je vhodné dietou omezit zdroje purinů živočišného původu. Omezení se naopak netýká purinů rostlinného původu, které jsou výborným zdrojem proteinů, vlákniny, vitamínů a minerálů. (Choi a kol., 2005).

---

<sup>1</sup> Převod informací genetického kódu z jednoho typu nukleové kyseliny do jiného typu nukleové kyseliny. Obecně užívané k přenosu genetické informace z DNA do RNA.

## 2) Diagnostikován enzymatický defekt

- a) Deficit glukózo-6-fosfatasy u nemocných s glykogenózou typu I vede k hyperurikémii a někdy i ke dnové artritidě. Hyperurikémie u těchto nemocných souvisí pravděpodobně se sníženým vylučováním močové kyseliny močí, které je důsledkem zvýšené hladiny mléčné kyseliny a ketonémie. Dalším možným mechanismem je zvýšená syntéza močové kyseliny de novo, která je zapříčiněna zvýšenou syntézou PRPP (Fernandes, 2008).
- b) Deficit hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasy (HPRT) je také známý jako Lesch-Nyhnův syndrom (LNS). Hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasa je hlavním enzymem při reutilizaci purinů. Je to na pohlaví vázaná genetická porucha, která se klinicky projevuje mentální retardací, sebepoškozováním a patologickou agresivitou. Biochemicky se syndrom projevuje hyperurikémií, zvýšeným vylučováním kyseliny močové a značným snížením aktivity hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasy v erythrocytech nebo v jiných buňkách. Intracelulární koncentrace PRPP je zvýšená stejně tak jako i rychlost syntézy purinů. Neurologické symptomy jsou způsobeny sníženou dostupností purinů ve vyvíjejícím mozku, který má omezenou schopnost puriny syntetizovat de novo, a proto je do velké míry závislý na jejich reutilizačních metabolických drahách (Dastyh 2008).

Částečný deficit HPRT (tzv. Kelley-Seegmillerův syndrom) je spojen s klinickou symptomatologií související s nadprodukcí KM (dna, urátové konkrementy). Enzymatická aktivita HPRT je vyšší než 8 % (Merta, 2004).

### c) Zvýšená aktivita PRPP-synthetasy

PRPP-synthetasa katalyzuje vznik PRPP z ribosa-5-fosfátu a z ATP. PRPP je první intermediát de novo syntézy purinových nukleotidů, která vede ke vzniku inosinmonofosfátu (IMP), od něhož jsou odvozeny další purinové sloučeniny. Zvýšená aktivita PRPP-synthetasy vede k zvýšené tvorbě PRPP. Protože PRPP-glutamylamidotransferasa, limitní enzym de novo syntézy, není fyziologicky saturovaná PRPP, zvyšuje se syntéza purinových nukleotidů a tím i tvorba kyseliny močové. Různé formy zvýšené aktivity PRPP-synthetasy mají X-vázanou dědičnost (Fernandes, 2008).

### 3) Snížené vylučování kyseliny močové gastrointestinálním traktem

V mukóze tenkého střeva katalyzuje xanthinoxidasa tvorbu kyseliny močové. Naproti tomu bakteriální flóra tenkého střeva urikolyticky degraduje kyselinu močovou ve střevě. Při ovlivnění bakteriální flóry např. antibiotiky může dojít ke snížení urikolýzy a byl pozorován vznik dnaveho záchvatu (Pavelka, 2003).

### 3.1.2 Sekundární hyperurikémie

#### 1) Nadprodukce kyseliny močové

##### a) Lymfoproliferativní a myeloproliferativní onemocnění

Nejčastěji se vyskytuje sekundární dna u plicythaemia vera rubra, myeloidní metaplazie, dále u akutní a chronické leukémie a mnohočetného myelomu. Všechna tato onemocnění jsou charakterizována zvýšenou aktivitou kostní dřeně a zvýšeným obratem nukleových kyselin (Pavelka, 2003).

##### b) Karcinomy

Hyperurikémie se může vyvinout jako komplikace neoplazie.

##### c) Hemolytická anémie

Dna může doprovázet nejružnější hemolytické anémie a hemoglobinopatie. Hyperurikémie se vyskytuje velmi často u srpkovité anémie (Pavelka, 2003).

#### 2) Snížené vylučování kyseliny močové

##### a) Nutriční

Alkohol zvyšuje produkci kyseliny močové díky degradaci ATP na AMP. Mimo to snížení močové exkrece jako výsledek dehydratace a metabolické acidózy může přispět k hyperurikémii, která je asociována s etanolovým trávením (Choi a kol., 2005).

##### b) Renální/vaskulární

Ke sníženému vylučování kyseliny močové renálního původu patří onemocnění ledvin (různé etiologie), nízký objem moči (<1 ml/min), hypertenze.

Chronická renální nedostatečnost se při současně přítomné hyperurikémii posuzuje obtížně. Na jedné straně vedou hyperurikémie a dna k poškození



ledvin, na druhé straně nefropatie jiné etiologie (např. chronická pyelonefritida) má za následek sekundární hyperurikémii a dnu. Jestliže předcházela ataka kloubního zánětu, jde pravděpodobně o dnovou nefropatii. V opačném případě je posouzení složitější a rozhodnutí nemusí přinést ani biopsie ledvin. V důsledku hyperurikémie a dny vznikají dva typy renálního poškození:

- akutní selhání ledvin v rámci akutní tubulární nekrózy vzniklé precipitací krystalů v tubulech.

Akutní selhání ledvin je potenciálně letální, ale naštěstí velmi vzácné. Nejčastěji vzniká např. při zahájení chemoterapie nebo radioterapie malignit, kdy je množství vyplavovaných urátů masivní. Při rozlišení tohoto stavu od akutního selhání ledvin jiné etiologie pomůže stanovení poměru koncentrace kyseliny močové a kreatininu v moči (pokud není nemocný zcela anurický), který je za tohoto stavu vyšší než 1, zatímco u selhání ledvin jiné etiologie je vždy nižší než 1.

- chronická intersticiální nefritida

Chronická intersticiální nefritida vzniká ukládáním urátů do intersticia ledvin. Při histologickém vyšetření je jedinou typickou morfou průkaz krystalů natriumurátu. Dále vznikají změny tubulární a intersticiální, glomerulární, ale i vaskulární. Klinicky se onemocnění manifestuje malou neselektivní proteinurií, poškozením koncentrační schopnosti ledvin a hypertenzí. Patologický močový nález je častý, erytrocyturie je zjišťována v 15-50 % a leukocyturie až v 50%. Patologický močový nález se nachází někdy pouze intermitentně. Thiele a spol. se pokusili rozdělit dnové nefropatie podle stupně závažnosti do čtyř skupin, a třebaže toto rozdělení není všeobecně přijímáno, lze je považovat přinejmenším za zajímavé:

- I. patologický močový nález, normální renální funkce
- II. počínající poškození ledvinných funkcí, močový nález patologický nebo normální

III. kompenzovatelná retence dusíkatých látek (kreatinin v séru 133-707  $\mu\text{mol/l}$ ), clearance kreatininu 1,0-0,17 ml/s

IV. dekompenzovaná retence dusíkatých látek (kreatinin v séru 716-1326  $\mu\text{mol/l}$ , clearance kreatininu pod 0,17 ml/s) (Zima, 2002).

c) Dna vyvolaná léky

Nejdůležitější medikamenty vyvolávající hyperurikémii jsou diuretika, salicyláty v malých dávkách, pyrazinamid, kyselina nikotinová a etambutol (Pavelka, 2003).

d) Metabolity a hormony (vazopresin, laktátová acidóza, ketóza, angiotenzin)

e) Různé (myxedém, respirační acidóza, akutní infarkt myokardu, hyperparathyreóza) (Zima, 2002)

## 4 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA DNY

### 4.1 Kritéria

Jasná diagnóza dny je při průkazu krystalů natriumurátu, nejčastěji v kloubním výpotku. Dále je možno diagnostikovat dnu při přítomnosti 6 klinických kritérií ze 12. Jde o kritéria vytvořené subkomisí Americké revmatologické společnosti v roce 1977. Specifita a senzitivita při užití 6 kritérií se pohybuje kolem 90 % (Pavelka, 2003).

Tabulka 1. ACR kritéria pro klasifikaci dny (Pavelka, 2008)

ACR kritéria pro klasifikaci dny	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Přítomnost krystalů natriumurátu v synoviálním výpotku</li><li>• Průkaz tofu obsahujícího natriumurát (průkaz chemicky nebo v polarizačním mikroskopu)</li><li>• Přítomnost 6 z 12 klinických kritérií</li></ul>	
Klinická kritéria pro akutní dnu	
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Maximum zánětu 1 den</li><li>2. Více než 1 ataka</li><li>3. Monoartritida</li><li>4. Zarudnutí</li><li>5. Bolest a otok 1. MTP</li><li>6. Unilaterální postižení 1. MTP</li><li>7. Unilaterální postižení tarzu</li><li>8. Suspektní tofus</li><li>9. Hyperurikémie</li><li>10. Asymetrický otok</li><li>11. Subkortikální cysty, žádné eroze</li><li>12. Negativní kultivace výpotku</li></ol>	
Splněno 6 a více kritérií:	SENSITIVITA / 87,6 %
	SPECIFITA / 97,2 %

Evropská liga proti revmatismu navrhla „Doporučení pro diagnostiku dny“, které bylo vypracováno skupinou expertů a které je uspořádáno do 10 doporučujících bodů (Pavelka, 2008).

Tabulka 2. EULAR doporučení pro diagnostiku dny (Pavelka, 2008)

EULAR doporučení pro diagnostiku dny
1. Při akutní atace je rychlý rozvoj závažné bolesti, palpační citlivosti a zarudnutí, který dosahuje maxima za 6 – 12 hodin vysoce podezřelým z dnavého zánětu, i když není zcela specifický pro dnu.
2. Klinická prezentace dny ve formě recidivující podagry je relativně přesná pro diagnózu, ale není definitivní bez nálezu krystalů.
3. Demonstrace krystalů natriumurátu ve výpotku či v tofu umožňuje definitivní diagnózu dny.
4. Rutinní vyšetřování synoviální tekutiny na krystaly natriumurátu je doporučováno u všech vzorků synoviální tekutiny u pacientů, kde zatím nebyla stanovena diagnóza.
5. Identifikace krystalů z asymptomatických kloubů v intermitentním období může pomoci k diagnóze.
6. Dna a sepse mohou koincidovat, takže Gramovo barvení a kultivace synoviální tekutiny by měly být v suspektních případech provedeny, i když krystaly natriumurátu byly již identifikovány.
7. Hyperurikémie je sice nejdůležitějším rizikovým faktorem pro dnu, ale nález hyperurikémie není potvrzující ani vylučující faktor, protože řada lidí má hyperurikémii bez přítomné artritidy a obecně část atak vznikne při normální urikémii.
8. Renální vylučování kyseliny močové by mělo být provedeno u vybraných pacientů, zvláště u těch s rodinnou anamnézou začátku dny v mladém věku do 25 let nebo s ledvinovými kameny.
9. Ačkoliv mohou být rentgenogramy užitečné v diferenciální diagnóze a mohou ukazovat znaky typické pro chronickou dnu, nejsou příliš užitečné pro potvrzení diagnózy dny v akutním stadiu.
10. Rizikové faktory pro dnu a asociovaná onemocnění by měly být vyhodnoceny včetně rysů metabolického syndromu (obezita, hyperglykemie, hyperinzulinemie, hypertenze).

Obecně je ale o dně uvažováno u každé:

- a) akutní artritidy
- b) recidivující artritidy
- c) oligoartritidy, zvláště dolních končetin u mužů středního věku
- d) při zarudnutí kloubů
- e) při přítomnosti artritických projevů a urolitiázy
- f) při artritidě a metabolickém syndromu (Pavelka, 2008).

## 4.2 Vyšetření kloubní tekutiny

Kloubní (synoviální) tekutina je viskózní tekutina vyplňující dutiny kloubů. Svými vlastnostmi se podílí na mazacích pochodech v kloubech. Kloubní tekutina je v kontaktu jak s povrchem chrupavky tak i s buňkami synoviální tkáně a krevními vlásečnicemi, zajišťuje transport živin a kyslíku z krve ke chrupavce a transport metabolitů ven z kloubu (Zima, 2002). Hyaluronát v ní obsažený navíc působí jako protektivní obal „receptorů“ pro bolest a snižuje tak jejich dráždivost. Tento glykosaminoglykan, který je syntetizován v B synoviocytech, působí jako lubrikant kloubních povrchů. Jeho molekula tvořena lineárním nesulfatovaným řetězcem, představuje vysokomolekulární cukerný polymer o molekulové hmotnosti  $3 \cdot 10^6$  daltonů (Zima, 2002).

Synoviální tekutina je za fyziologických podmínek čirá, velmi vazká tekutina, někdy s lehce žlutavým nádechem. Je to vlastně ultrafiltrát krevní plazmy obohacený o produkty buněk synoviálních obalů kloubu. Koncentrace elektrolytů a malých molekul (urea) je stejná jako v plazmě. Koncentrace glukózy je nižší, neboť je využívána buňkami chrupavky. V malém množství jsou zastoupeny fosfolipidy a cholesterol. Vlivem selektivní permeability stěn krevních kapilár jsou plazmatické proteiny přítomny v mnohem nižší koncentraci než v plazmě. Převažujícím proteinem je albumin, který se podílí na koloidně osmotickém tlaku. Fibrinogen ani další faktory krevního srážení se v normální kloubní tekutině nevyskytují (Zima, 2002).

V normálních diarthodiálních kloubech se kloubní tekutina nachází v malém množství a pro vyšetření je prakticky nedostupná. Udává se, že kolení kloub obsahuje 1-2 ml kloubní tekutiny. Za určitých okolností (zánět, degenerativní změny, trauma) se může vytvářet výpotek. Změny objemu a látkového složení kloubní tekutiny jsou odrazem patologických procesů probíhajících v synoviální tkáni (Zima, 2002).

### 4.2.1 Odběr vzorku

Obvyklou metodou pro získání výpotku je punkce kloubu s jehlovou aspirací synoviální tekutiny. Pokud není vzorek bezprostředně zpracován, je třeba přidat antikoagulační přípravek, neboť patologické výpotky se někdy spontánně srážejí. Jediným vhodným antikoagulantem při analýze krystalů je heparin (heparinát sodný nebo heparinát lithný). Jiné látky se nedoporučují vzhledem k možné tvorbě artefaktů (Zima, 2002).

#### 4.2.2 Makroskopické vyšetření

Makroskopické posouzení barvy, zákalu a viskozity poskytuje první představu o typu výpotku. Orientačně lze posoudit, o jaký typ výpotku se může jednat.

Vzhled může být čirý, kalný, mléčný, krvavý. Barva žlutá, šedožlutá, načervenalá, nazelenalá. Viskozita se zkouší kvalitativně pomocí dvou jednoduchých testů:

- a) Vlákno test: Punktát se nechá ze stříkačky volně odkapávat a pozoruje se, jak dlouhé vlákno se tvoří předtím, než kapka odkápne. Normálně je vlákno asi 3 cm dlouhé. Při snížené viskozitě je to 0,5 – 1 cm nebo dokonce tekutina odkapává volně (zánětlivý výpotek). Vysoká viskozita je u osteoartrózy, traumatického výpotku, lupus erythematoses; nízká při dně, pseudodně, revmatoidní a septické artritidě.
- b) Test na mucinové koagulum: do Petriho misky se dá 1% roztok kyselina octové, odkápne se 0,1 ml punktátu a pozoruje se proti tmavému pozadí, zda kapka zůstává celistvá (typ 1 a 2), což je typické pro nezářlivé výpotky; naproti tomu rozpad kapky na drobné vločky (typ 3 a 4) svědčí pro zánětlivý výpotek (snížená viskozita) (Masopust, 1998).

#### 4.2.3 Mikroskopické vyšetření

Prvním krokem mikroskopické analýzy je pozorování nativního preparátu v optickém mikroskopu. Při obvykle používaném zvětšení (400krát) lze dobře rozpoznat leukocyty, erythrocyty, fibrilární materiál a kapénky tuku. Pomocí speciálních pozorovacích technik (fázový kontrast nebo tzv. pseudofáze) je možné vyhodnotit zastoupení ragocytů. Tímto termínem jsou označovány buňky obsahující inkluze. Vysoké procento ragocytů (více než 60 %) se nachází u septické artritidy, dny, pseudodny a revmatoidní artritidy.

U pacientů s hyperurikémií s akutní synovitiidou je nejdůležitějším vyšetřením analýza synoviálního výpotku v polarizačním mikroskopu. Jestliže jsou jeho polarizační filtry otočeny do polohy, že svírají pravý úhel, vznikne tmavé pole, ve kterém urátové krystaly jasně svítí. Někdy vzniká až tzv. obraz „hvězdného nebe“. Krystaly mají většinou jehlicovitý tvar, jsou dlouhé 2-20  $\mu\text{m}$  a 0,5-2  $\mu\text{m}$  široké. V akutním záchvatu je většina krystalů fagocytována a nacházíme je intracelulárně. Důležitý je průkaz dvojlohu: křemenný kompenzátor první třídy vložený mezi polarizační filtry vytváří červené pole, ve kterém se krystaly jeví jako modré, jestliže jejich osa probíhá paralelně s osou polarizovaného světla, a žluté, jestliže jsou na ní kolmé. Krystaly natriumurátu

jsou tedy silně negativně dvojlomné, na rozdíl od krystalů kalciumpyrofosfátu dihydrátu, které jsou slabě pozitivně dvojlomné (Pavelka, 2003). Průkaz krystalů znamená diagnózu dnave artritidy, což ale nevylučuje jiná současně přítomná onemocnění (pseudodnu, septickou artritidu, fraktury aj.). Nepřítomnost krystalů v prvních 24 a 48 hodinách po začátku záchvatu diagnózu dny zpochybňuje. Krytaly jsou uloženy převážně intracelulárně a nacházejí se až v 70 % kloubů pacientů s dnou i v interkritickém období, tj. v období bez záchvatu (Zima, 2002).

#### 4.2.4 Cytologická analýza kloubního výpotku

Cytologická analýza kloubního výpotku využívá obvyklé hematologické techniky s některými malými modifikacemi. Stanovení celkového počtu leukocytů a erytrocytů se provádí v Bürkerově komůrce po obarvení methylenovou modří. Nátěry pro diferenciální rozpočet se zhotovují podobně jako u periferní krve. Po panoptickém barvení (May-Grünwald, Giemsa-Romanovski) se počítají lymfocyty, monocyty a neutrofilní segmenty. Výsledek se vyjadřuje v procentech (Zima, 2002).

K podrobnější cytologické analýze se používají histochemické metody. Detekci buněčných subtypů nad rámec běžného cytologického vyšetření umožňují imunocytochemické postupy s využitím monoklonálních protilátek.

*Tabulka 3. Hodnocení počtu leukocytů (Masopust, 1998)*

<b>Onemocnění, syndrom</b>	<b>Počet leukocytů v <math>\mu</math>l</b>	<b>% granulocytů</b>
Reaktivní výpotek: osteoartróza, traumatická artritida aj.	2 000	25
Zánětlivý výpotek: - revmatoidní artritida - revmatická horečka, lupus erythematodes - dna a pseudodna - septická artritida	5 000 – 20 000 2 000 – 10 000 5 000 – 20 000 nad 100 000	65 a více 10 – 50 65 a více nad 75

Tabulka 4. Diferenciální diagnostika nálezů v kloubním punktátu (Masopust, 1998)

Nález	Normál	Onemocnění			
		arthritis deformans	dna	revmatoidní artritida	septická artritida
Barva	slámová	žlutá	žlutobílá	žlutozelenavá	šedá
Vzhled	čirý	čirý	kalný	kalný	kalný
Viskozita	vysoká	vysoká	nízká	nízká	nízká
Mucin-Clot	I	I	III	IV	IV
Leukocyty v $\mu$ l	< 200	< 2 000	5 000 až 12 000	5 000 až 20 000	> 20 000
% granulocytů	25	25	60 – 70	75	> 75
Krystaly	-	-	uráty	cholesterol	-
Komplement	N	N - $\uparrow$	N - $\uparrow$	$\downarrow$	N - $\uparrow$
Baktérie	-	-	-	-	+
Revmatoidní faktor	-	-	-	+	-

### 4.3 Průkaz krystalů natriumurátu v tofech

Krystaly natriumurátu mohou být prokázány i v tofech, které se vzácně objevují i před vznikem dnave artritidy. Nicméně přítomnost podkožních uzlíků vyžaduje ověření, zda-li nejde o tofy. Na přítomnost tofů lze také nepřímou usuzovat při nálezů erozí a cystických, jakoby průbojníkem vyražených cystoidních projasnění na rentgenu, zvláště pak při nálezů na I. MTP a na kloubech dolních končetin. Tato morfa však není pro dnu specifická a diferenciální diagnóza proti revmatoidní artritidě a osteoartróze nemusí být snadná.

Jestliže jde o tofus podkožní v měkkých tkáních, tak stačí jednoduchá přímá biopsie, jestliže jde o tofus v chrupavce nebo v synovii, odběr se dělá artroskopicky. Materiál pro analýzu se získává aspirací materiálu za aseptických podmínek velkou jehlou. Aplikace malého množství fyziologického roztoku může usnadnit odběr krystalů. Při punkci stačí i minimální množství materiálu (např. obsah jehly), který se rozetře na sklíčko (Pavelka, 2003). Jestliže se nepodaří krystaly prokázat, je možné provést otevřenou chirurgickou biopsii. Takto získaná tkáň musí být ihned fixována v absolutním alkoholu, aby se předešlo rozpouštění krystalů (Zima, 2002).



## 4.4 Rentgenový obraz

Na začátku onemocnění v akutním stadiu jsou postižené klouby bez rentgenologických změn. V pokročilém stadiu onemocnění je predilekčním místem postižení I. MTP kloubu. Tofy se mohou objevit kdekoliv, nejčastěji však na hřbetu nohy, na kotníku a extenzorových částech loketních kloubů. Kostní eroze jsou ostře ohraničené, popisují se jakoby vyražené průbojníkem. Někdy se vyskytují marginální eroze. Kloubní štěrbinu mohou být zúženy. Při postupující nemoci někdy vznikají v blízkosti kloubů rozsáhlé osteolytické léze (Pavelka, 2003).

## 4.5 Stanovení kyseliny močové v krvi a moči

### 4.5.1 Preanalytické fáze

K analyzovanému materiálu touto metodou patří srážlivá krev - sérum (S), nesrážlivá krev - plazma (P), moč (U) – náhodný vzorek nebo sběr za 24 hodin.

Odběr se provádí ráno nalačno po tělesném klidu, bez předchozího slunění. Pacient by neměl jíst vnitřnosti, maso max. 150 g/den. Neměl by pít kávu, coca-colu, čaj, pivo a alkohol. (Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF uk, 2009).

Moč se sbírá 24 hodin do plastových sběrných lahví bez konzervačních přísad. Laboratoř musí před analýzou provést alkalizaci moče (5M NaOH) na hodnotu pH vyšší než 8,0, aby nedošlo k vysrážení solí kyseliny močové. Alternativně lze alkalizaci provést pomocí 15 ml 5M NaOH, který se přidá do sběrné nádoby. Po ukončení sběru se objem promíchá, změří a do laboratoře se doručí 10 ml (SEKK, 2010).

Stabilita vzorku viz Tabulka 5.

*Tabulka 5. Stabilita vzorku (Novák, 2002)*

Materiál	Pokojová teplota (+20 °C až +25 °C)	Lednice (+4 °C až +8 °C)	Mrazák (-20 °C)
S, P	3 dny	1 týden	1 rok
U	3 dny	1 týden	nemrazit

Někteří autoři uvádí stabilitu obecně kratší.

## 4.5.2 Používané metody

### 4.5.2.1 Referenční metoda

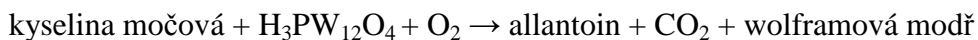
Referenční metodou je hmotnostní spektrometrie s izotopovým zředováním (ID-GC/MS). Metoda umožňuje stanovení s absolutní chybou v řádu 0,1 %. Vyžaduje speciální vybavení a je realizována na omezeném počtu pracovišť v celosvětovém měřítku.

Ke vzorku se přidá známé množství kyseliny močové, značené uhlíkem  $C^{14}$  a po složité úpravě vzorku se určí hmotnostní spektrometrií poměr kyseliny močové  $C^{12}$  a  $C^{14}$ . Z tohoto poměru a známého přídatku lze pak určit koncentraci KM ve vzorku (Doležalová, 1990).

### 4.5.2.2 Chemické metody

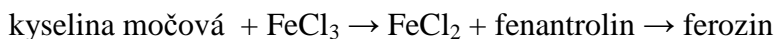
Chemické metody využívají redukční vlastnosti kyseliny močové.

Metody s kyselinou fosfowolframovou jsou založeny na tvorbě wolframové modře po redukcí fosfowolframové kyseliny urátem v alkalickém prostředí. Zabarvení se měří spektrofotometricky v oblasti 650 - 700 nm. Reakce probíhá podle následující reakce:



Jedním z nutných kroků je deproteinace vzorku plazmy, protože vznikající zákal, který proteiny způsobují, může nepředvídatelně ovlivnit absorbanci. Při reakci dále interferuje celá řada endogenních látek: glukosa, kyselina askorbová, glutathion, cystein. Z exogenních látek pak acetaminofen, acetylsalicylová kyselina, theofylin a puriny z nápojů (kofein, theobromin). Všechny tyto látky také redukují fosfowolframovou kyselinu, a způsobují tak pozitivní chybu (Novák, 2002).

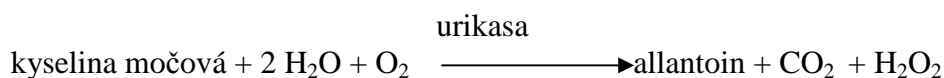
Na stejném principu je založeno stanovení s chloridem železitým a fenantrolinem, jehož produktem je červený ferozin:



Obecně jsou tyto metody jsou nespecifické a pro kvantitativní stanovení kyseliny močové se nepoužívají (Dastyh, 2008).

### 4.5.2.3 Enzymové metody

Enzymové metody jsou založeny na užití enzymu urikasy, který rozkládá kyselinu močovou podle reakce:

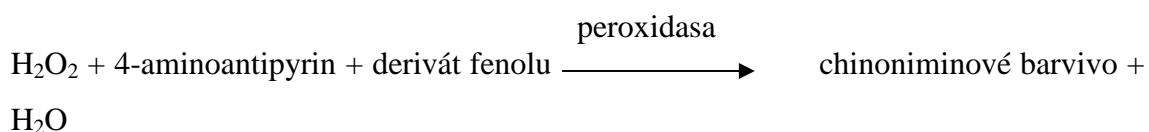


Koncentraci kyseliny močové lze pak určit:

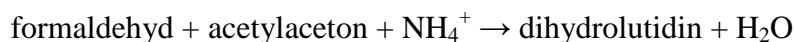
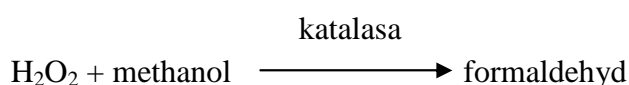
**A) přímo** - měřením úbytku absorbance při 293 nm (allantoin vzniklý oxidací kyseliny močové při této vlnové délce neabsorbuje). Tento způsob stanovení byl dříve používán jako referenční. Nelze jej ale automatizovat, navíc měření při 293 nm vyžaduje speciální zdroj záření (deuteriová lampa)

**B) nepřímo** - stanovením vzniklého  $\text{H}_2\text{O}_2$ :

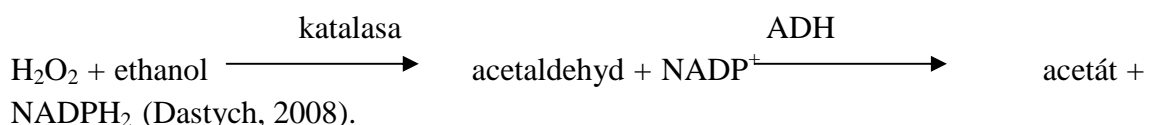
- peroxid vodíku se stanoví Trinderovou reakcí (oxidativní kopulace), při které reaguje s 4-aminoantipyrinem a fenolem (nebo jeho derivátem, např. N-ethyl-N-/2-hydroxy-2- sulfopropyl/-m-toluidin, TOOS) v přítomnosti enzymu peroxidasa za vzniku červeného chinonmonoiminového barviva, které se stanoví spektrofotometricky při 490 nm:



- při stanovení podle Kageyamy oxiduje peroxid methanol za katalýzy katalasou a vzniklý formaldehyd pak přejde Hantschovou kondenzací s amoniakem a acetylacetonem na žlutý dihydrolutidin, měří se při 405 nm:



- metoda s alkoholdehydrogenasou (ADH) využívá místo methanolu ethanol, který je pomocí katalasy oxidován na acetaldehyd a dále ALDH na acetát. Koenzymem je NADP, který je redukován na  $\text{NADPH}_2$ , což se projeví změnou absorbance při 340 nm:



Enzymová stanovení obecně ruší kyselina askorbová a bilirubin.

Měření provádí laboratoře klinické biochemie na automatických analyzátořech pomocí komerčních souprav. Objem vzorku se pohybuje kolem 10  $\mu\text{l}$ , objem reakční směsi je většinou mezi 200 – 300  $\mu\text{l}$  (podle typu analyzátoru). Vlastní analýza trvá 8 – 10 minut. Vzorky moče jsou automaticky předředěny (nejčastěji v poměru 1 : 10), aby se výsledky dostaly do kalibračního rozsahu (cca do 1 000  $\mu\text{mol/l}$ ). O přesnosti měření vypovídá nejlépe hodnota kombinované nejistoty měření, která se pohybuje v rozmezí 3 – 4 % (SEKK, 2010). Teoretické toleranční rozpětí (TMU) je přitom 17,2 % pro sérum a 22,1 % pro moč (Novák, 2002), TMU požadované při externí kontrole kvality je 14 % pro sérum a 26 % pro moč (SEKK, 2010).

#### **4.5.2.4 Elektrochemické metody**

Koncentraci kyseliny močové lze stanovit polarograficky přímo nebo měřením úbytku kyslíku Clarkovou elektrodou po přidání vzorku do reakční směsi obsahující urikasu. Známe je i stanovení pomocí enzymové elektrody, na jejíž membráně je immobilizovaná urikasa.

O četnosti všech výše uvedených metod v laboratorní rutinní praxi nejlépe vypovídá statistika systémů externích kontrol kvality. V cyklu Analyty krevního séra AKS1/10 českého organizátora SEKK s.r.o. (Pardubice) uvedlo ze 187 účastníků 183 enzymovou fotometrickou metodu (tj. 98 %) a pouze 1 účastník Kageyamu. Podobně v německém cyklu RfB (Referenzinstitut für Bioanalytik) KS2/10 použilo z 552 účastníků 442 enzymatickou metodu s barevnou reakcí (tj. 80 %), 103 účastníků uvedlo Kageyamu (18 %), 3 používají metodu s ADH a 4 účastníci „jinou“ (SEKK, 2010).

#### **4.5.3 Referenční rozmezí hodnot**

Na základě řady měření hladin kyseliny močové v séru nebo plazmě zdravých osob byla navržena referenční rozmezí hodnot pro muže 150 – 420  $\mu\text{mol/l}$  a 150 -350  $\mu\text{mol/l}$  pro ženy. Referenční rozsahy hodnot však závisí na použité metodě (literatuře):

*Tabulka 6. Srovnání referenčních rozsahů hodnot*

<b>Materiál, sex</b>	<b>Jednotky</b>	<b>Zima</b>	<b>Roche</b>	<b>Beckman-Coulter</b>
Krev – muži	μmol/l	220 – 420	202 - 416	286 - 518
Krev - ženy	μmol/l	140 – 340	143 - 339	155 - 476
Ranní moč	mmol/l		2,2 – 5,5	
Moč za 24 h	mmol/d	1,5 – 4,5	1,2 – 5,9	1,5 – 4,4

Zvýšená hladina kyseliny močové v plazmě nad hodnotu 540 μmol/l znamená u mužů 159 krát vyšší riziko pravděpodobnosti výskytu dnaové artritidy než ve skupině mužů s hladinou nižší než 360 μmol/l (Novák, 2002).

## ZÁVĚR

Každý pátý až desátý obyvatel střední Evropy má zvýšenou koncentraci kyseliny močové v krvi. Velké procento populace však nemusí mít žádné potíže. V těchto případech se jedná o asymptomatickou hyperurikémii. Manifestní dnou onemocní méně než 1% populace, a to především muži mezi 40. - 50. rokem věku. Projevuje se nepříjemnými záněty kloubů a postižením ledvin. Vlivem špatného životního stylu však procento onemocnění stále narůstá a tímto onemocněním trpí stále častěji lidé mladších věkových skupin. Základním předpokladem léčby dny je především přesná diagnóza a určení eventuálních asociovaných onemocnění. Zatímco nález hyperurikémie je nezbytný pro asymptomatickou hyperurikémii, absolutním průkazem dnavé artritidy je potvrzení přítomnosti krystalů natriumurátu v synoviální tekutině polarizačním mikroskopem. Hladina kyseliny močové v krvi totiž kolísá a v období akutního dnavého záchvatu vůbec nemusí být přítomna hyperurikémie. Hladina kyseliny močové může být normální nebo dokonce snižena. V laboratorní rutinní praxi se pro stanovení kyseliny močové používá nejčastěji enzymatická fotometrická metoda. V chronickém stádiu je pro diagnózu důležité rentgenové vyšetření postižených kloubů.

## SEZNAM ZKRATEK

CRP	C- reaktivní protein
EFKM	exkreční frakce kyseliny močové
FJHN	familiární juvenilní hyperurikemická nefropatie
HPRT	hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasa
ID-GC/MS	hmotnostní spektrometrie s izotopovým zředováním
IMP	inosinmonofosfát
KM	kyselina močová
LSN	Lesch-Nyhanův syndrom
MRP4	human multidrug resistance protein 4
OAT1	organic anion transporter 1
OAT3	organic anion transporter 3
P	plazma
RF	revmatoidní faktor
S	sérum
SLC22A12	solute carrier family 22 (organic anion/cation transporter), member 12
TMU	teoretické toleranční rozpětí
U	moč
UMOD	gen kódující uromodulin
URAT1	ledvinný aniontový kanál
XMP	xanthinylát
I.MTP	I. metatarzofalangeální kloub

## LITERATURA

DASTYCH, M., Breinek, P. (2008) *Klinická biochemie*, 1. vydání, Masarykova univerzita, Brno, 232s.

DOLEŽALOVÁ, V. a kol. (1990) *Principy biochemických vyšetřovacích metod*, 2. část, 1. vydání, IDV SZP, Brno, 384s.

FERNANDES, J. a kol. (2008) *Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch*, 4. vydání, TRITON, Praha, 607s.

HEDIGER, M. A., ENDOU, H., JOHNSON, R. J., MYIAZAKI, H. (2005duben) Molecular Physiology of Urate Transport. *Physiology*. American Physiological Society. 20/2005, 125 – 133s.

CHOI, H. K., MOUNT, D. B., REGINATO, A. M. (2005) Pathogenesis of Gout. *Annals of Internal Medicine*. American College of Physicians. 7/143, 499 – 516s.

LEDVINA, M. a kol. (2006) *Biochemie pro studující medicíny, I. díl*, Karolinum, Praha, 274s.

MASOPUST, J. (1998) *Klinická biochemie požadování a hodnocení biochemických vyšetření, část I*, Karolinum, Praha, 429s.

MERTA, M. REITEROVÁ, J a kol. (2004) *Dědičná onemocnění ledvin*, TRITON, Praha, 2004, 272s.

MURRAY, R. K. (2002) *Harperova Biochemie*, 23. vydání, H&H, Jinočany, 872s.

NOVÁK, F. (2002) *Úvod do klinické biochemie*, 1. vydání, Karolinum, Praha, 341s.

OLEJÁROVÁ, M. (2008) *Revmatologie v kostce*, TRITON, Praha, 231s.

PAVELKA, K. (2003) *Klinická revmatologie*, 1. vydání, Galén, Praha, 952s.

PAVELKA, K. (2008) Nové pohledy na léčbu hyperurikémie a dny. *Interní medicína pro praxi*. Solen, s.r.o. 6/2008, 268 – 272s.

RŮŽIČKA V. (2003) Dna. *Interní medicína pro praxi*. Solen, s.r.o. 4/2003, 173 – 177s.



SEKK spol. s r.o.. Analyty krevního séra. [online]. [cit. 2010-05-02]. Dostupné z: <<http://www.sekk.cz/>>

TEPLAN, V. a kol. (2000) *Metabolismus a ledviny*, GRADA Publishing, spol. s r. o., Praha, 414s.

ÚSTAV KLINICKÉ BIOCHEMIE A LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY VFN A 1. LF UK. *Databáze metod a vyšetření*. [online]. [cit. 2009-05-04]. Dostupné z: <<http://ukb.lf1.cuni.cz/data/detail.php?ID=131&pre=1&start=277>>

ZIMA, T. (2002) *Laboratorní diagnostika*, 1. vydání, Galén, Praha, 728 s.

ŽUREK, M., HORÁK, P. (2006) Dnavá artritida a hyperurikemie. *Interní medicína pro praxi*, Solen, s.r.o. 11/2006, 485 – 488s.

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Tvorba IMP (Ledvina, 2006).....	12
Obr. 2. Přeměna IMP na AMP a GMP (Murray, 2002).....	14
Obr. 3. Řízení rychlosti syntézy purinových nukleotidů de novo (Murray, 2002).....	15
Obr. 4. Řízení přeměny IMP na adeninové a guaninové nukleotidy (Murray, 2002) ....	15
Obr. 5. Degradace purinových nukleotidů v buňkách (Ledvina, 2006) .....	16
Obr. 6. Tvorba kyseliny močové z purinnukleosidů s meziprodukty hypoxanthinem, xanthinem a guaninem (Murray, 2002) .....	17
Obr. 7. Fosforibosylace hypoxanthinu na IMP a guaninu na GMP. Obě reakce jsou katalyzovány hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasou (Murray, 2002) .....	18
Obr. 8. Fosforibosylace adeninu katalyzovaná adeninfosforibosyltransferasou (Murray, 2002) .....	19

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1. ACR kritéria pro klasifikaci dny (Pavelka, 2008) .....	27
Tabulka 2. EULAR doporučení pro diagnostiku dny (Pavelka, 2008).....	28
Tabulka 3. Hodnocení počtu leukocytů (Masopust, 1998).....	31
Tabulka 4. Diferenciální diagnostika nálezů v kloubním punktátu (Masopust, 1998)...	32
Tabulka 5. Stabilita vzorku (Novák, 2002).....	33
Tabulka 6. Srovnání referenčních rozsahů hodnot .....	37