

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ  
Katedra biologických a biochemických věd

**STANOVENÍ KYSELINY MOČOVÉ V SÉRU  
U VYBRANÝCH SKUPIN PACIENTŮ POMOCÍ HPLC**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce:  
Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.

Autorka:  
Bc. Tereza Mocová

2009

UNIVERSITY OF PARDUBICE

FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

Department of Biological and Biochemical Sciences

**DETERMINATION OF URIC ACID IN SERUM IN THE  
SELECTED GROUPS OF PATIENTS USING HPLC**

THESIS

Supervisor:

Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.

Author:

Bc. Tereza Mocová

2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6. 5. 2009

Tereza Mocová

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu práce Mgr. Romanu Kandárovi, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při zpracování této diplomové práce.

Také děkuji všem pacientům, kteří poskytli vzorky své krve a zaměstnancům Oddělení klinické biochemie a diagnostiky Nemocnice Pardubice. Další poděkování patří celé rodině za podporu během mého studia a Vítovi za trpělivost a pomoc při úpravě textu.

## ABSTRAKT

Kyselina močová (2,6,8-trioxypurin) je u člověka konečným produktem odbourávání purinových bází. Není pouze odpadním metabolitem, ale zastává i významnou funkci v organismu při antioxidační ochraně proti nepříznivým účinkům volných radikálů. Zvýšená hladina kyseliny močové, hyperurikémie, má zřejmě přímou souvislost s mnoha patologickými stavy, jako je primární hypertenze, ateroskleróza, ischemická choroba srdeční, diabetes mellitus 2. typu, nefropatie nebo urátová nefrolitiáza.

Pro stanovení kyseliny močové v séru byla použita metoda HPLC v systému obrácených fází s UV detekcí. Byla použita kolona MAG1 4,6 x 150 mm, Biospher PSI 200 C18, 5  $\mu\text{m}$  a mobilní fáze 25 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – methanol (95:5, v/v), pH =  $4,75 \pm 0,005$ .

Kalibrační křivka byla lineární v celém rozsahu koncentrací použitých standardů kyseliny močové. Analytické parametry prezentované metody byly dostačující. Přesnost v sérii vyjádřená variačním koeficientem: 2,61 %, přesnost mezi sériemi vyjádřená variačním koeficientem: 4,22 %, správnost vyjádřená průměrnou výtěžností: 101,55 % (CV 2,39 %).

Hladina kyseliny močové v séru pacientů jednotlivých souborů se pohybovala v těchto rozmezích: pacienti s kardiovaskulárním onemocněním  $359,41 \pm 91,47 \mu\text{mol/l}$ , pacienti s primární hypertenzí  $326,10 \pm 77,54 \mu\text{mol/l}$ , pacienti s diabetem mellitus 2. typu  $334,86 \pm 83,79 \mu\text{mol/l}$ , pacienti s onemocněním vylučovací soustavy  $306,63 \pm 101,50 \mu\text{mol/l}$  a kontrolní skupina pacientů s ostatními diagnózami  $306,08 \pm 84,18 \mu\text{mol/l}$ .

## ABSTRACT

Uric acid (2,6,8-trioxypurin) is the final product of purine bases degradation in human. It is not only the final product of metabolism but also acts important role in antioxidant protection against the negative effect of free radicals. Hyperuricemia – increased level of uric acid – has the most probably direct relationship with a lot of pathological states, e.g. primary hypertension, atherosclerosis, ischemic heart disease, diabetes mellitus 2. type, nephropathy or urate nephrolithiasis.

For the determination of uric acid in serum reversed-phase HPLC method with UV detection was used. Column MAG1 4.6 x 150 mm, Biospher PSI 200 C18, 5  $\mu\text{m}$  and a mobile phase 25 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – methanol (95:5, v/v), pH =  $4.75 \pm 0.005$  was used.

Calibration curve was linear in the whole range of concentrations of uric acid standards. Analytical parameters of the method were as follows. Intra-assay expressed as a coefficient of variation: 2.61 %, inter-assay expressed as coefficient of variation: 4.22 %, accuracy expressed as average recovery: 101.55 % (CV 2.39 %).

Uric acid levels in serum of patients in selected groups were in the ranges as follows. Patients with cardiovascular diseases  $359.41 \pm 91.47 \mu\text{mol/l}$ , patients with primary hypertension:  $326.10 \pm 77.54 \mu\text{mol/l}$ , patients with diabetes mellitus 2. type:  $334.86 \pm 83.79 \mu\text{mol/l}$ , patients with excretory system disease:  $306.63 \pm 101.50 \mu\text{mol/l}$ , and control group with other diagnosis:  $306.08 \pm 84.18 \mu\text{mol/l}$ .

## SEZNAM ZKRATEK

APRT	Adeninfosforibosyltransferasa
ATP	Adenosintrifosfát
AVG	Průměrná hodnota
CV	Variační koeficient
FJHN	Familiární juvenilní hyperurikemická nefropatie
HPRT	Hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasa
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
KM	Kyselina močová
n	Počet pacientů v souboru
p	Pravděpodobnost
PRPPs	Fosforibosyldifosfátsyntetasa
R	Korelační koeficient
SD	Směrodatná odchylka

## Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1. Chemická struktura a povaha kyseliny močové</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2. Kyselina močová jako antioxidant</b> .....	<b>14</b>
<b>2.3. Odbourávání purinových bází a vznik kyseliny močové</b> .....	<b>16</b>
<b>2.4. Metabolismus kyseliny močové</b> .....	<b>17</b>
<b>2.5. Vliv věku na hladiny kyseliny močové v séru</b> .....	<b>18</b>
<b>2.6. Hyperurikémie a její příčiny</b> .....	<b>19</b>
2.6.1. Zvýšený příjem exogenních purinů potravou .....	19
2.6.2. Zvýšená degradace nukleových kyselin při zániku velkého množství buněk .....	19
2.6.3. Zvýšený metabolismus purinů způsobený enzymopatií .....	20
2.6.4. Zvýšená degradace adenosintrifosfátu .....	20
2.6.5. Snížené renální vylučování kyseliny močové .....	20
2.6.6. Jiné příčiny .....	20
<b>2.7. Patologické stavy spojené s hyperurikémií</b> .....	<b>21</b>
2.7.1. Charakteristika poškození ledvin a vývodných cest močových .....	21
2.7.2. Charakteristika dědičných metabolických onemocnění .....	22
2.7.2.1. Lesch-Nyhanův syndrom .....	22
2.7.2.2. Kelley–Seegmillerův syndrom .....	23
2.7.2.3. Zvýšená aktivita fosforibosyldifosfátsyntetasy (PRPPs) .....	23
2.7.2.4. Familiární juvenilní hyperurikemická nefropatie (FJHN) .....	24
2.7.3. Hyperurikémie a kardiovaskulární onemocnění .....	25
2.7.4. Hyperurikémie a hypertenze .....	26
2.7.5. Hyperurikémie a diabetes mellitus 2. typu .....	27
<b>2.8. Hypourikémie a její příčiny</b> .....	<b>28</b>
2.8.1. Deficit xanthinoxidasy .....	28
2.8.2. Deficit purinnukleosidfosforylasy .....	28
2.8.3. Renální hypourikémie .....	29
<b>2.9. Analytické metody stanovení kyseliny močové</b> .....	<b>30</b>
2.9.1. Rutinní metody používané v klinické praxi .....	30
2.9.1.1. Chemické metody .....	30
2.9.1.2. Enzymové metody .....	30
2.9.2. Elektrochemické metody .....	32
2.9.2.1. Polarografie .....	32
2.9.2.2. Voltametrie .....	32
2.9.2.3. Amperometrie .....	32
2.9.3. Kapilární elektromigrační metody .....	33
2.9.3.1. Kapilární elektroforéza .....	33
2.9.3.2. Kapilární elektroforéza na mikročipu .....	33
2.9.4. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	33



2.9.4.1. HPLC s isotopovým zředováním a hmotností spektrometrií (HPLC/ID-MS).....	34
2.9.4.2. Iontově výměnná chromatografie.....	34
2.9.4.3. HPLC v systému obrácených fází .....	34
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1. Soubor pacientů.....</b>	<b>36</b>
3.1.1. Chemikálie .....	37
3.1.2. Pomůcky a přístroje.....	37
3.1.3. Pracovní roztoky .....	39
<b>3.2. Postup stanovení kyseliny močové pomocí HPLC s UV detekcí.....</b>	<b>41</b>
3.2.1. Příprava vzorků .....	41
3.2.2. Chromatografická analýza .....	41
3.2.3. Kalibrace .....	42
3.2.4. Analytické parametry .....	42
3.2.4.1. Přesnost v sérii.....	42
3.2.4.2. Přesnost mezi sériemi .....	42
3.2.4.3. Výtežnost (recovery test).....	43
3.2.5. Zpracování výsledků .....	43
<b>4. VÝSLEDKY.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1. Chromatografická analýza .....</b>	<b>44</b>
4.1.1. Kalibrační křivka.....	44
4.1.2. Analytické parametry .....	45
4.1.2.1. Přesnost v sérii.....	45
4.1.2.2. Přesnost mezi sériemi .....	45
4.1.2.3. Výtežnost (recovery test).....	46
<b>4.2. Distribuce hladin kyseliny močové .....</b>	<b>47</b>
4.2.1. Distribuce hladin kyseliny močové v souboru pacientů s kardiovaskulárním onemocněním.....	47
4.2.2. Distribuce hladin kyseliny močové v souboru pacientů s primární hypertenzí.....	48
4.2.3. Distribuce hladin kyseliny močové v souboru pacientů s diabetem ...	49
4.2.4. Distribuce hladin kyseliny močové v souboru pacientů s onemocněním vylučovací soustavy .....	50
4.2.5. Distribuce hladin kyseliny močové u kontrolní skupiny pacientů.....	51
4.2.6. Vliv věku na hladiny kyseliny močové.....	52
<b>4.3. Porovnání hladiny kyseliny močové mezi pacienty a kontrolní skupinou</b>	<b>53</b>
4.3.1. Soubor pacientů s kardiovaskulárním onemocněním versus kontrolní skupina .....	53
4.3.2. Soubor pacientů s primární hypertenzí versus kontrolní skupina .....	54
4.3.3. Soubor pacientů s diabetem versus kontrolní skupina .....	54
4.3.4. Soubor pacientů s onemocněním vylučovací soustavy versus kontrolní skupina .....	55
<b>4.4. Porovnání HPLC s enzymovou metodou .....</b>	<b>56</b>
4.4.1. Soubor pacientů s kardiovaskulárním onemocněním .....	56
4.4.2. Soubor pacientů s primární hypertenzí .....	58

4.4.3. Soubor pacientů s diabetem .....	60
4.4.4. Soubor pacientů s onemocněním vylučovací soustavy.....	62
4.4.5. Porovnání HPLC s enzymovou metodou u kontrolní skupiny pacientů . .....	64
<b>5. DISKUZE.....</b>	<b>66</b>
<b>6. ZÁVĚR.....</b>	<b>69</b>
<b>7. PŘÍLOHY .....</b>	<b>70</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>72</b>

# 1. ÚVOD

---

Kyselina močová je velmi často stanovovaným analytem. Její zvýšená hladina, hyperurikémie, je diagnostikována u mnoha patologických stavů, od vrozených metabolických onemocnění až po obezitu. Mnohé současné studie se zabývají otázkou, zda by bylo možné zařadit kyselinu močovou mezi rizikové faktory vzniku kardiovaskulárních onemocnění.

Metod stanovení kyseliny močové bylo vyvinuto mnoho, od nejstarší a dnes již nepoužívané chemické metody, až po nejmodernější metody využívající nanotechnologie. Rutinní laboratorní metodou je enzymové stanovení kyseliny močové, které je plně automatizované, snadné, rychlé, dostatečně citlivé a relativně levné. Citlivost této metody může být ale ovlivňována řadou látek běžně se vyskytujících v krvi. Jsou to látky s redukčními vlastnostmi - glukosa, kyselina askorbová a bilirubin a mohou poskytovat falešně vyšší výsledky.

Cílem této práce je stanovení kyseliny močové vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s UV detekcí u vybraných skupin pacientů, u nichž se očekávají vyšší hladiny interferujících látek. Hladiny kyseliny močové zjištěné pomocí HPLC byly porovnány s hladinami získanými rutinní enzymatickou metodou.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

---

Kyselina močová je u člověka konečným produktem odbourávání purinových bází. Není pouze odpadním metabolitem, ale zastává i významnou funkci v organismu při antioxidační ochraně proti nepříznivým účinkům volných radikálů. Celkový pool kyseliny močové činí kolem 1 g a denní obrat tvoří asi 60 %. V lidském organismu se kyselina močová nachází v krvi (volná i vázaná na proteiny: albumin a specifický globulin), moči, synoviální tekutině, sekretu dýchacích cest a kolostru.

Referenční rozmezí kyseliny močové v séru je u dospělých lidí závislé na pohlaví.

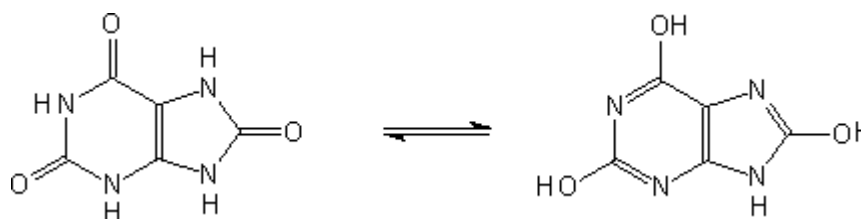
**Tab. 2-1:** Referenční rozmezí

Pohlaví	Rozmezí
Muži	180 – 420 $\mu\text{mol/l}$
Ženy	120 – 350 $\mu\text{mol/l}$

V moči je koncentrace kyseliny močové podstatně vyšší, a to 1,5 – 4,8 mmol/l (2).

### 2.1. Chemická struktura a povaha kyseliny močové

Kyselina močová neboli 2,6,8-trioxypurin se sumárním vzorcem  $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$  a molární hmotností 168,11 g/mol se řadí mezi heterocyklické sloučeniny. Její struktura je odvozena od purinu, jehož skelet tvoří pyrimidinový a imidazolový kruh. Kyselina močová se vyskytuje ve dvou izomerních formách (keto a enol forma), které jsou v rovnováze:



Je slabou dvojsytnou kyselinou ( $\text{pK}_1 = 5,8$ ,  $\text{pK}_2 = 10,3$ ), ve vodě téměř nerozpustnou, nerozpustná je také v alkoholu a éteru. Dobře se rozpouští v glycerolu, roztocích hydroxidů a uhličitanů, octanu a fosforečnanu sodném. Při fyziologickém pH krve 7,4 je

nedisociovaná kyselina močová přítomna pouze v malém množství, převládá její ionizovaná forma – monosodná sůl, neboli mononatriumurát. Poměr mezi nedisociovanou formou a urátem je v tělních tekutinách tedy závislý na pH.

Rozpustnost volné kyseliny močové při 37 °C je 64 mg/l (381 μmol/l), rozpustnost urátů je 84 mg/l (500 μmol/l). Pokud je hladina kyseliny močové v séru vyšší než její rozpustnost, je sérum přesyceným roztokem kyseliny močové, což za určitých podmínek vede ke krystalizaci mononatriumurátu. Ten se poté může ve formě bílých jehlicovitých krystalů ukládat do kloubů nebo ložisek zvaných tofy v měkkých tkáních (2-4).

## 2.2. Kyselina močová jako antioxidant

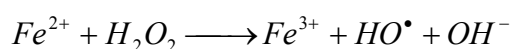
U savců, kromě vyšších primátů, není kyselina močová konečným metabolitem purinových látek. Je dále oxidována enzymem urikasou na allantoin, který je ve vodě více rozpustný. Mutací genu následovanou snížením urikasové aktivity během evoluce primátů došlo ke zvýšení koncentrace kyseliny močové v krvi, a tím i zlepšení ochranného antioxidantního mechanismu před působením volných radikálů. Tyto evoluční změny byly pravděpodobně následovány rozvojem vyšší nervové činnosti a prodloužením průměrného věku primátů (1).

Ovšem i lidský organismus dokáže vytvořit malé množství allantoinu. Volné kyslíkové radikály mohou neenzymaticky oxidovat kyselinu močovou na allantoin a jeho přítomnost v plazmě se stanovuje jako ukazatel zátěže organismu volnými radikály (5).

Kyselina močová tvoří až 65 % celkové antioxidantní kapacity plazmy. Patří mezi hlavní extracelulární antioxidantní látky především proto, že její hladina v plazmě zcela přesahuje koncentrace ostatních antioxidantů (plazmatické proteiny, askorbát,  $\alpha$ -tokoferol) (1,5).

Antioxidančně nejvýznamnějším mechanismem působení kyseliny močové v lidském organismu je schopnost vytvářet stabilní koordinační komplexy s dvojmocnými ionty železa a jednomocnými ionty mědi. Vyvázáním těchto kovových iontů inhibuje kyselina močová Fentonovu reakci, při níž vzniká velmi reaktivní hydroxylový radikál. Navázáním železnatých iontů do komplexu s kyselinou močovou dochází také k výrazné inhibici oxidace askorbátu a k potlačení peroxidace lipidů.

Fentonova reakce:



Kyselina močová jako lapač, scavenger, vycytává hydroxylové radikály a kyselinu chlornou a reaguje s nimi za vzniku netoxických produktů – allantoinu, močoviny, oxalátu nebo glyoxalátu.

Brání také tvorbě oxohemových oxidantů vznikajících reakcí hemoglobinu s peroxidy, čímž zabraňuje lýze erytrocytů. Je také schopna přijmout nepárový elektron od hydroxylového, peroxylového radikálu či radikálu oxidu dusnatého za tvorby urátového aniontového radikálu. Urátový radikál je pro organismus toxický a je účinně vychytáván dalším významným antioxidantem – kyselinou askorbovou (1,5-10).

Je ovšem zajímavé, že se kyselina močová ve vysokých koncentracích může chovat i prooxidačně. Její reakcí s oxidanty vznikají další radikály, které poškozují především lipidy (LDL a membrány). Vznik kyseliny močové je také doprovázen tvorbou superoxidu, takže při její zvýšené syntéze se úměrně zvyšuje i tvorba tohoto volného kyslíkového radikálu (6,9).

## **2.3. Odbourávání purinových bází a vznik kyseliny močové**

Katabolismus purinových bází začíná defosforylací nukleotidů. Vzniklé nukleosidy se dále metabolizují dvěma cestami.

První cestou je recyklační dráha, tzv. „salvage pathway“. Odštěpením monosacharidu z nukleosidů vznikají volné purinové baze, ty se přeměňují zpět na nukleotidy, jež mohou být využity k resyntéze nukleových kyselin. Tyto reakce katalyzují enzymy adeninfosforibosyltransferasa (APRT) a hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasa (HPRT).

Druhou cestou je přeměna purinů na kyselinu močovou. Sled reakcí začíná u nukleosidů. Adenosin je nejprve deaminován adenosindeaminasou na inosin. Fosforolýzou N-glykosidové vazby inosinu vzniká ribosa-1-fosfát a hypoxanthin, tato reakce je katalyzovaná enzymem purinnukleosidfosforylasou. Guanosen je shodnou reakcí se stejným enzymem purinnukleosidfosforylasou metabolizován na ribosa-1-fosfát a guanin. Fosforolýzou vzniklé produkty guanin a hypoxanthin se poté přeměňují na stejný meziprodukt – xanthin. Přeměna hypoxanthinu je katalyzována enzymem xanthinoxidasou, guaninu pak enzymem guanasou. Poslední reakcí odbourávání purinových bází u člověka je oxidace xanthinu enzymem xanthinoxidasou na kyselinu močovou.

Kyselina močová nevzniká pouze z *de novo* syntetizovaných purinových bází, ale také z nukleotidů obsažených v potravě a z rozpadu tkáňových nukleoproteinů (3).



## 2.4. Metabolismus kyseliny močové

Hlavními místy vzniku kyseliny močové jsou játra, střevní sliznice a mléčná žláza, které mají vysokou aktivitu xanthinoxidasy. Průměrná celková exkrece kyseliny močové se u zdravého člověka pohybuje mezi 600 – 800 mg/24 hodin. Z této hodnoty tvoří více jak 50 % kyselina močová metabolizovaná z endogenních purinů. Exogenní, potravou přijaté puriny se metabolizují především ve střevní sliznici. Snadno se do enterocytů resorbují a jsou zde kompletně oxidovány na kyselinu močovou za katalýzy enzymem xanthindehydrogenasou. Xanthinoxidasa i xanthindehydrogenasa jsou dvě formy jednoho enzymu, liší se akceptory elektronů. Xanthindehydrogenasa předává po oxidaci elektrony na  $\text{NAD}^+$ , xanthinoxidasa na  $\text{O}_2$ . Kyselina močová je z mléčné žlázy, jater a střevní sliznice vstřebávána do krve, kde se vyskytuje především jako sodná sůl – mononatriumurát (1,3).

Z průměrné celkové exkrece kyseliny močové se 70 % vyloučí ledvinami, přibližně 30 % trávicím traktem. V tlustém střevě se kyselina močová rozkládá bakteriální intestinální urikolýzou na oxid uhličitý a amoniak (11,12).

V ledvinách se odehrává složitý proces, tvořený čtyřmi na sebe navazujícími mechanismy:

1. glomerulární filtrace, při níž dochází k profiltrování veškeré kyseliny močové obsažené v glomerulárních kapilárách,
2. zpětná resorpce více jak 90-ti % urátu v proximálním tubulu,
3. aktivní sekrece urátu do lumen distální části proximálního tubulu,
4. zpětná aktivní resorpce v distálním tubulu (zde může docházet k ovlivňování řadou aniontů a léků) (13).

Dějů v proximálním tubulu se účastní i urátové transportéry: URAT1 (je cílem působení urikosurických léků), OATs, UAT a OATv1 (14). Clearance kyseliny močové je 8 – 10 ml/min, definitivní močí se ale vyloučí pouze 6 – 12 %.

## **2.5. Vliv věku na hladiny kyseliny močové v séru**

Sérová hladina kyseliny močové je závislá nejen na pohlaví, ale také na věku. Od dětského věku až do puberty jsou hodnoty urikémie u obou pohlaví stejné: 180 – 240  $\mu\text{mol/l}$ . V pubertě dochází u chlapců k vzestupu hladiny, která je již během života neměnná: 180 – 420  $\mu\text{mol/l}$ . U žen je změna urikémie během puberty minimální, mezi 20. – 45. rokem je koncentrace kyseliny močové konstantní, o 30 – 60  $\mu\text{mol/l}$  nižší než u mužů (2).

V menopauze se urikémie zvyšuje a dosahuje hodnot jako u mužů, což kompenzuje úbytek estrogenů a jejich antioxidačních účinků (15).

Hladina kyseliny močové v séru či plazmě vykazuje též denní či sezónní kolísání. Její koncentrace kolísá ze dne na den v rozsahu 4 – 10 %, u většiny zdravých osob je obvykle vyšší ráno a nižší večer, a také vyšší v létě než v zimě.

## 2.6. Hyperurikémie a její příčiny

Hyperurikémie, zvýšená hladina kyseliny močové v séru, je důsledkem porušení rovnováhy mezi vznikem z exo- i endogenních purinů, koncentrací v krvi a jejím vylučováním. Biochemický nález hyperurikémie je diagnostikován až u 30 % mužů a 3 % žen ve středním věku, u dětí je poměrně vzácný.

**Tab. 2–2:** *Hraniční koncentrace kyseliny močové*

Pohlaví	Hyperurikémie
Muži	> 420 $\mu\text{mol/l}$
Ženy	> 350 $\mu\text{mol/l}$

Hyperurikémie vzniká na podkladě získaných onemocnění, dietních návyků i působením dědičně podmíněných onemocnění a často jde o kombinaci více vlivů (12).

### 2.6.1. Zvýšený příjem exogenních purinů potravou

Denní exkrece kyseliny močové močí při běžném stravování je u zdravého člověka do 4,8 mmol, při bezpurinové dietě do 3,6 mmol. Porovnáním hladin kyseliny močové v plazmě a moči před a po zavedení bezpurinové diety je možné prokázat vliv vysokého příjmu purinů stravou na hyperurikémii. Plazmatická hladina urátu by měla po 5 – 7 dnech bezpurinové diety klesnout o více než 60  $\mu\text{mol/l}$ , vylučování močí o více než 1,2 mmol/24 hodin (2).

### 2.6.2. Zvýšená degradace nukleových kyselin při zániku velkého množství buněk

Zvýšený rozpad nukleoproteinů vedoucí ke zvýšenému uvolňování purinů, a tím i nadměrné tvorbě kyseliny močové doprovází chemoterapeutickou léčbu cytostatiky či ozáření rentgenem. Jedná se nejčastěji o lymfoproliferativní a myeloproliferativní procesy. Zvýšený rozpad buněk se vyskytuje také u polycytémie, hemolytické a perniciózní anémie, hemoglobinopatie, tkáňové hypoxie a asi u třetiny pacientů s psoriázou (2).

### **2.6.3. Zvýšený metabolismus purinů způsobený enzymopatií**

Snížená aktivita hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasy vede ke snížení resyntézy purinů recyklační metabolickou drahou.

Zvýšená aktivita fosforibosylpyrofosfátsyntetasy vede ke zvýšené syntéze purinů *de novo* (2,3).

### **2.6.4. Zvýšená degradace adenosintrifosfátu**

Zvýšené odbourávání ATP probíhá u hereditární intolerance fruktosy, mitochondriálních poruch energetického metabolismu a intenzivní svalové zátěži (je-li ale zátěž anaerobní, dojde k hyperurikémii až v zotavovací fázi, protože k tvorbě kyseliny močové je nezbytný kyslík) (2).

### **2.6.5. Snížené renální vylučování kyseliny močové**

Snížená exkrece kyseliny močové ledvinami může být způsobena postižením glomerulárních nebo tubulárních funkcí. Hyperurikémie se vyskytuje u všech stavů se sníženou glomerulární filtrací, a také u pacientů s primární dnou. Aktivní sekreci kyseliny močové v distálním tubulu inhibuje alkohol, organické anionty, jako laktát a 3-hydroxybutyrát. Hyperurikémie doprovází tedy laktátovou acidózu a ketoacidózu. Snížená exkreční frakce kyseliny močové zapříčiňuje také familiární juvenilní hyperurikemickou nefropatii a spolu se zvýšenou tvorbou kyseliny močové je příčinou glykogenóz I. typu. Hyperurikémie v důsledku snížených renálních funkcí je také jedním z důležitých ukazatelů závažnosti preeklampsie u těhotných žen (2,16).

### **2.6.6. Jiné příčiny**

Koncentraci kyseliny močové v séru zvyšují i některé léky, např. diuretika, pyrazinamid, metoxyfluran, cyklosporin A, furosemid, fenytoin, kyselina nikotinová, dlouhodobé užívání salicylátů či otrava olovem. Hyperurikémie je přítomna u endokrinologických chorob, jako je hypoparathyreóza nebo hyperparathyreóza, dále také u obezity, diabetu, hladovění či u poruch metabolismu lipidů, nejčastěji hypertriacylglycerolémii a primární hyperlipoproteinémii III a IV (2,12).

## **2.7. Patologické stavy spojené s hyperurikémií**

Rozpoznání zvýšené hladiny kyseliny močové v séru je důležité pro odhalení mnoha patologických stavů, které lze rozdělit do čtyř typů:

- poškození ledvin a vývodných cest močových,
- dědičné metabolické onemocnění,
- kardiovaskulární onemocnění a hypertenze,
- diabetes mellitus typu 2.

### **2.7.1. Charakteristika poškození ledvin a vývodných cest močových**

Onemocnění ledvin je většinou doprovázeno hyperurikémií jako sekundárním následkem. Ovšem hyperurikémie může být i primárním faktorem vyvolávajícím poškození ledvin. Precipitace kyseliny močové v ledvinách a vývodných cestách močových způsobuje dva typy poškození: nefropatii doprovázenou urolitiázou a urátovou nefropatii.

U prvního typu poškození dochází k precipitaci urátu ve sběrných kanálcích, ledvinné pánvičce či ureteru, což způsobuje sníženou reabsorpci následovanou zvýšeným vylučováním kyseliny močové močí, hyperurikurií. Při dlouhodobé hyperurikurií dochází ke vzniku urátové urolitiázy, nebo-li ke vzniku konkrementů z kyseliny močové a její soli ve vývodných cestách močových a ledvinách. Urátové kameny jsou složeny z drobných lištovitých krystalů kyseliny močové, které jsou zbarveny močovými pigmenty od žluté přes oranžovou až do hnědé a mají skelný lesk. Při pH 5 je moč nasyceným roztokem kyseliny močové o koncentraci 892  $\mu\text{mol/l}$  (150 mg/l), zatímco při pH 7 má nasycený roztok koncentraci 11,9 mmol/l (2000 mg/l). Rozpustnost kyseliny močové je tedy při pH 7 více než desetkrát vyšší než při pH 5, a proto vznik urátových kamenů je kromě hyperurikémie podmíněn především nízkým pH moči. Krystaly kyseliny močové a urátů se vyskytují asi u 10 % pacientů s močovými kameny.

U urátové nefropatie dochází k precipitaci mononatriumurátu v intersticiu ledvin, což je spojeno se zánětem a poškozením glomerulární filtrace a doprovázeno také hyperurikémií, hypertenzí a proteinurií (2,11).

## **2.7.2. Charakteristika dědičných metabolických onemocnění**

### **2.7.2.1. Lesch-Nyhanův syndrom**

Lesch-Nyhanův syndrom je dědičné metabolické onemocnění způsobené kompletním deficitem hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasy (HPRT). Je X-recesivně vázané, vyskytuje se tedy pouze u chlapců. Ztrátou HPRT dochází k poruše recyklační dráhy v metabolismu purinů a zároveň ke zvýšení intracelulárního 5-fosforibosyl-1-difosfátu, který měl být během recyklační dráhy spotřebován. Výsledkem je nadměrné odbourávání a také i nadměrná tvorba purinových látek.

Klinicky se Lesch-Nyhanův syndrom manifestuje jednak hyperurikémií, ale také výrazně neurologicky. Nadprodukce kyseliny močové způsobuje ukládání jejích krystalů v kloubech, akutní nefropatii a hyperurikurii s urátovou litiázou. Nadměrnou exkreci kyseliny močové lze prokázat již záhy po narození červenooranžovým zbarvením moči od vysrážených krystalů kyseliny močové.

Kolem 4. měsíce života chlapců dochází k prvním neurologickým projevům, opoždování v psychomotorickém vývoji. V období batolete nastupují další neurologické symptomy:

- atetoidní pohyby (pomalé krouživé pohyby především dolních končetin),
- choreatiformní pohyby (nepravidelné cloumavé pohyby rukou, v obličeji),
- hyperreflexie (nadměrné vystupňování reflexních pohybů),
- torzní dystonie (trvalá mimovolní svalová kontrakce, která uvádí končetiny nebo jiné části těla do abnormálních poloh),
- hypotonie,
- dysartrie (motorická porucha řeči).

Nejvýznamnějším neurologickým projevem tohoto syndromu je automutilace, sebepoškozování, která se projevuje zhruba od 2. roku života. Pacienti si okusují rty, konečky prstů, jazyk a toto nutkavé chování, které nelze ovládnout vůlí bývá někdy tak sebepoškozující, že je nezbytná extrakce zubů. Současné výzkumné práce ukazují, že možnou primární příčinou neurologických projevů by mohl být deficit dopaminergních neurotransmiterů v mozku.

Diagnostika Lesch-Nyhanova syndromu je založena na průkazu hyperurikémie, hyperurikurie a zvýšeného vylučování hypoxanthinu. Tyto laboratorní nálezy je nutné doplnit enzymovým vyšetřením z lyzátu erytrocytů. Prvním, zcela jasným příznakem bývá červenooranžové zbarvení moči, dobře viditelné na plenách. Tento nálezy je indikací k laboratornímu vyšetření koncentrace kyseliny močové v krvi a v moči, a také hladiny hypoxanthinu v moči. Hyperurikurie dosahuje hodnot 300 – 850  $\mu\text{mol/kg/24h}$ , hyperurikémie 416 – 1000  $\mu\text{mol/l}$ . Hypoxanthin se v moči stanovuje metodou HPLC a jeho hladina je zvýšena více než 30  $\text{mmol/mol}$  kreatininu (2,12,17,18).

#### **2.7.2.2. Kelley–Seegmillerův syndrom**

Kelley–Seegmillerův syndrom je dědičné metabolické onemocnění způsobené částečným deficitem hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasy. Na rozdíl od kompletního deficitu nejsou přítomny neurologické projevy, ale častěji se manifestuje dnavá artritida. Tento syndrom tak bývá zaměňován za diagnózu primární dny. Nadprodukce kyseliny močové může vést k poškození až akutnímu selhání ledvin.

Laboratorní diagnostika je stejně jako u Lesch-Nyhanova syndromu založena na průkazu hyperurikémie, hyperurikurie a pro rozlišení těchto dvou syndromů je nutné provést enzymové vyšetření (2,19).

#### **2.7.2.3. Zvýšená aktivita fosforibosyldifosfátsyntetasy (PRPPs)**

Enzym PRPPs hraje klíčovou úlohu v syntéze purinů *de novo*. Její superaktivita tedy stimuluje produkci, a tím i katabolismus purinů, což se projevuje hyperurikémií a hyperurikurií. Onemocnění je dědičné gonosomálně recesivně, aktivitu PRPPs kódují dva geny, které leží v odlišných oblastech X chromozomu.

Klinicky se projevuje ve dvou fenotypech. První fenotyp je charakterizován časným nástupem onemocnění (v dětském věku), poruchou růstu, opožděným psychomotorickým vývojem, nedoslýchavostí až hluchotou. Klinické projevy druhého fenotypu se objevují v časně dospělosti a jsou klasickými důsledky nadprodukce kyseliny močové, tedy postižením kloubů a ledvin (2,12,20).

#### **2.7.2.4. Familiární juvenilní hyperurikemická nefropatie (FJHN)**

FJHN je autosomálně dominantní onemocnění. V dětství, adolescenci či včasné dospělosti se objevuje hyperurikémie a dnová artritida, které jsou způsobené sníženou renální exkrecí kyseliny močové. Postižení ledvinných funkcí se projevuje mezi 15. až 30. rokem a do 10 let následuje progresivní ledvinné selhání.

Na rozdíl od primární dny se FJHN vyskytuje u mladých pacientů nezávisle na pohlaví, tedy i u žen před menopauzou a častá je také pozitivní rodinná anamnéza.

Diagnostika je vzhledem ke genetické i fenotypické heterogenitě onemocnění obtížná. Biochemickým markerem je snížená exkreční frakce kyseliny močové pod 6 % (poměr mezi clearancí kyseliny močové a clearancí kreatininu) a hyperurikémie. Purinové metabolity i aktivita enzymů jsou zcela v normě. Biopsií ledvin je prokazatelný nález nespecifické intersticiální nefritidy (2,12,21,22).



### 2.7.3. Hyperurikémie a kardiovaskulární onemocnění

Hypotéza, že hyperurikémie může mít přímou souvislost se vznikem a rozvojem kardiovaskulárních onemocnění byla poprvé vyslovena před více než padesáti lety. Dodnes neexistuje na tuto otázku jednotná odpověď. Jisté je, že se u většiny kardiovaskulárních onemocnění zvýšená hladina kyseliny močové vyskytuje. Bylo by tedy možné považovat hyperurikémii za nezávislý ukazatel rizika kardiovaskulárního onemocnění? Její stanovení ze séra, plazmy či moči je rychlé a levné, představovala by tedy ideální biochemický marker. Onemocnění kardiovaskulárního systému ovšem vzniká na základě výskytu mnoha dalších rizikových faktorů jako je věk, hypertenze, diabetes mellitus, hyperlipidémie a obezita. Všechny tyto stavy jsou doprovázeny zvýšenou hladinou kyseliny močové. Proto není možné jednoznačně určit, zda je kyselina močová primární příčinou nebo pouze sekundárním následkem (23).

Přesný mechanismus patologického působení kyseliny močové na kardiovaskulární systém je dosud neznámý. Na přímém poškození endotelu a kardiovaskulárních funkcí se podílí kyselina močová mnohými vlivy. Podporuje adhezivitu a agregaci krevních destiček, zvyšuje trombotické sklony, dle současných poznatků může poskytovat příslušné signály pro diferenciaci dendritických buněk (24,27). Webb a kol. (24) ve své studii prokázali, že kyselina močová také dokáže přímo aktivovat T-lymfocyty bez přítomnosti antigenu. Dalším ze zásadních vlivů je snižování produkce radikálu oxidu dusnatého ve vaskulárním endotelu. Radikál oxidu dusnatého inhibuje funkce krevních destiček a má silné vazodilatační účinky. Konečným efektem působení kyseliny močové je tedy endoteliální dysfunkce, která se řadí mezi rizikové faktory vzniku aterosklerózy (25-27,31).

Vztah mezi kyselinou močovou a ischemickou chorobou srdeční ovšem nepotvrdily všechny dosud provedené epidemiologické studie. Například Hashemi a kol. (27) neprokázali přímou spojitost mezi koncentrací kyseliny močové a koronární aterosklerózou. Jejich studie byla provedená na 240 pacientech obojího pohlaví. Naproti tomu studie Tatli a kol. (26) vedená na mladých mužích (< 35 let) s akutním infarktem myokardu prokázala přímou asociaci mezi vysokou hladinou kyseliny močové a ischemickou chorobou srdeční. Alimonda a kol. (28) popisují ve své studii

hyperurikémii jako nezávislý předpoklad mortality u pacientů s akutním srdečním selháním.

Také Edwards (11) souhlasí se zařazením kyseliny močové mezi hlavní rizikové faktory pro vznik kardiovaskulárních chorob. Vyslovuje také zajímavý názor, že snížením hladiny kyseliny močové v séru je možné předejít nebo snížit riziko komplikací spojených s hyperurikémií. Ovšem léčba allopurinolem (inhibuje xanthinoxidasu) nebo probenecidem (urikosurikum – podporuje vylučování kyseliny močové) je v současnosti indikována pouze u pacientů s dnou a urátovými ledvinnými kameny. Allopurinol neredukuje pouze hladinu kyseliny močové, ale zlepšuje také vaskulární endoteliální funkci u pacientů s chronickým srdečním selháním (25,26).

#### **2.7.4. Hyperurikémie a hypertenze**

Přímá souvislost mezi zvýšenou hladinou kyseliny močové a hypertenzí byla poprvé popsána u pacientů se dnou před více než stoletím. Současné odborné práce se zabývají otázkou, jakými patologickými mechanismy přispívá hyperurikémie ke zvýšení tlaku a také zkoumají spojitost hyperurikémie, hypertenze a věku. Kosugi a kol. (29) ve své studii došli k závěru, že ovlivnění hypertenze kyselinou močovou klesá s věkem. U dospělých pacientů s hypertenzí je hyperurikémie diagnostikována v 25 – 50 % případů, kdežto u dospívajících pacientů s primární hypertenzí až v 90 % případů (30). Během experimentu došlo u hyperurikemických krys ke zvýšení tlaku krve nejspíše v důsledku stimulace renin-angiotenzin-aldosteronového systému a snížení produkce endoteliálního NO<sup>•</sup>. Ovšem po čase se u krys vyvinul zánět a mikrovaskulární poškození ledvin doprovázené sůl-senzitivitou a tyto vlivy převzaly hlavní zodpovědnost za hypertenzi.

Dle Kosugiho fungují popsané mechanismy v lidském organismu stejně, hyperurikémie se přímo podílí na vysokém tlaku pouze v jeho časných počátcích, poté ovlivňují tlak krve další faktory uvedené výše (29).

Vznik hypertenze může podporovat i insulinová rezistence. Hyperinsulinémie tlumí sympatický nervový systém a podílí se na stimulaci renin-angiotenzin-aldosteronového systému i na zvyšování zpětné resorpce sodíku. Souvislost mezi hladinou kyseliny močové, insulinovou rezistencí a hypertenzí popisují u mladých žen Forman a kol. (32).

Zpětná renální resorpce sodíku, která je asociována s hyperurikémií, doprovází oba patologické stavy – hypertenzi i hyperinsulinémií (27).

### **2.7.5. Hyperurikémie a diabetes mellitus 2. typu**

Diabetes mellitus 2. typu, na insulinu nezávislý, je často se vyskytující onemocnění především u pacientů středního a staršího věku s typickým nálezem hyperinsulinémie. Současné závěry odborných prací nasvědčují, že hyperurikémie může souviset s rozvojem insulinové rezistence a tím i diabetu 2. typu. A stejně jako v případě hypertenze či kardiovaskulárního onemocnění by mohla představovat významný rizikový faktor.

Kyselina močová se přímo podílí na vzniku insulinové rezistence tím, že redukuje vznik endoteliálního NO<sup>•</sup> a jeho nedostatek blokuje působení insulinu (33). Také fruktosou indukovaná hyperurikémie hraje důležitou roli při vzniku diabetu a metabolického syndromu, což prokázali Nakagawa a kol. (34) během jejich experimentů na krysách.

Mechanismus, kterým fruktosa zvyšuje hladinu kyseliny močové v séru, začíná jejím vstupem do hepatocytů. Zde je fruktokinásou fosforylována na fruktosa-1-fosfát za přeměny ATP na ADP. Adenosindifosfát je dále metabolizován na kyselinu močovou (34).

Existuje ovšem i názor, že hyperurikémie je následkem zvýšené hladiny insulinu v séru, jež podporuje reabsorpci kyseliny močové v proximálním tubulu ledvin (34).

## **2.8. Hypourikémie a její příčiny**

Za hypourikémií se považují koncentrace kyseliny močové v séru nižší než 120  $\mu\text{mol/l}$ . Nemá nijak důležitý diagnostický význam.

Příčinou vzniku hypourikémie může být vzácný dědičný deficit xanthinoxidasy, deficit purinnukleosidfosforylasy, stavy se zvýšeným vylučováním kyseliny močové, renální tubulární defekty a často také terapie některými léky, např. urikosuriky (probenecid či deriváty fenylobutazonu snižují resorpci kyseliny močové v distálním tubulu), vysoké dávky aspirinu, kyseliny askorbové, kortikosteroidů (2,3).

### **2.8.1. Deficit xanthinoxidasy**

Xanthinoxidasa je klíčovým enzymem tvorby kyseliny močové z purinových metabolitů. Katalyzuje přeměnu hypoxanhtinu na xanthin a jeho následnou oxidaci za vzniku kyseliny močové. Genetický defekt enzymu se u pacientů projevuje hypourikémií a xanthin-, hypoxanthinurií. Onemocnění probíhá často asymptomaticky, ovšem u některých pacientů může být doprovázeno vznikem xanthinových kamenů.

Odhalení enzymového defektu bývá spíše náhodné, když je v rámci biochemického vyšetření diagnostikována hypourikémie. Tento nález je vhodné doplnit stanovením koncentrací xanthinu a hypoxanhtinu v moči, jež jsou zvýšené, což je pro tento deficit typické. Aktivita xanthinoxidasy se vyšetřuje z bioptických vzorků střeva či jater (2,35).

### **2.8.2. Deficit purinnukleosidfosforylasy**

Purinnukleosidfosforylasa je dalším enzymem podílejícím se na katabolismu purinů. Katalyzuje přeměnu inosinu na hypoxanhtin a guanosinu na guanin. Jedná se o autozomálně recesivní onemocnění postihující imunitní systém. Deficit enzymu způsobí nahromadění jeho substrátů, které jsou toxické a poškozují T lymfocyty. Tato primární kombinovaná imunodeficience se projevuje brzy v kojeneckém věku zvýšenou náchylností k běžným virovým i bakteriálním infekcím. Nevládnutá oportunní infekce bývá příčinou úmrtí v dětském věku.

Laboratorní diagnostika je založena na průkazu inosinu, deoxyinosinu, guanosinu a deoxyguanosinu v moči. Bývá doprovázena lymfopenií v důsledku deficitu T lymfocytů, hypourikémií a hypourikurií. Pro potvrzení diagnózy je nutné stanovit aktivitu purinnukleosidfosforylasy v erytrocytech (3).

### **2.8.3. Renální hypourikémie**

Renální hypourikémie se řadí mezi transportní poruchy kyseliny močové. Dědičný či získaný defekt tubulárního transportu v ledvinách je důvodem zvýšené clearance kyseliny močové, a tím i hypourikémie.

Dědičná renální hypourikémie je autosomálně recesivní onemocnění, které je způsobeno defektem membránového transportu kyseliny močové v proximálním tubulu ledvin.

Získaná renální hypourikémie se vyskytuje u různých typů malignit, u stavů se zvýšeným objemem extracelulární tekutiny (např. snížená sekrece antidiuretického hormonu), u otrav těžkými kovy či po podání širokospektrých antibiotik, tetracyklinů (2,36).

## 2.9. Analytické metody stanovení kyseliny močové

### 2.9.1. Rutinní metody používané v klinické praxi

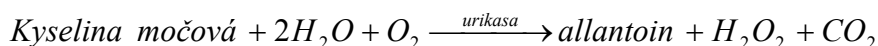
V klinické praxi se koncentrace kyseliny močové stanovuje nejčastěji v séru a moči. Omezeno je pouze stanovení v plazmě, jako antikoagulant nesmí být použita EDTA, citrát ani oxalát. Inhibují totiž urikasu, což má za následek falešné snížení koncentrace kyseliny močové. Urikasu dále inhibuje fluorid sodný, kyanid a formaldehyd. Rutinně používané metody stanovení kyseliny močové využívají jejich oxidoredukčních vlastností.

#### 2.9.1.1. Chemické metody

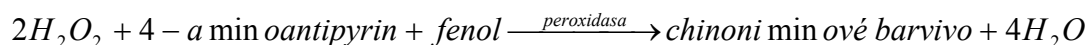
Chemické metody jsou založeny na redukčních schopnostech kyseliny močové. Reakcí s kyselinou fosfowolframovou v alkalickém prostředí vzniká zbarvený komplex wolframové modři. Jeho koncentrace se stanovuje fotometricky při 600 nm. Redukční metody se používají jen zřídka, jsou nespecifické a za přítomnosti jiných redukujících látek (glukosa, kyselina askorbová, bilirubin) poskytují falešně vyšší výsledky.

#### 2.9.1.2. Enzymové metody

Enzymové metody jsou oproti chemickým více specifické a dnes jsou v běžné laboratorní praxi nejvíce používané. Kyselina močová se oxiduje za katalýzy enzymem urikasou na allantoin, oxid uhličitý a peroxid vodíku.



Koncentrace kyseliny močové se poté stanovuje dvěma způsoby. Prvním je přímé měření poklesu její absorbance při 293 nm. Druhým způsobem je stanovení vzniklého peroxidu vodíku. Vzniklý  $\text{H}_2\text{O}_2$  se stanovuje oxidační kopulací s fenolem a 4-aminoantipyrinem za katalýzy enzymem peroxidasou. Červený chinoniminový komplex se měří fotometricky při 500 nm.



U enzymové metody také interferují redukující látky plazmy, a to především bilirubin a kyselina askorbová. Reagují s peroxidem vodíku a tím zkreslují výsledky stanovení. Při výskytu zvýšených koncentrací bilirubinu či kyseliny askorbové v krvi je vhodné do reakční směsi přidat hexakynoželeznatan draselný, který přeměňuje bilirubin na biliverdin a enzym askorbát oxidasu (AOD), která katalyzuje oxidaci kyseliny askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou.

## **2.9.2. Elektrochemické metody**

### **2.9.2.1. Polarografie**

Hladinu kyseliny močové je možné stanovit také polarograficky. Existují dva přístupy, přímé stanovení nebo nepřímé, kdy je do reakční směsi přidána urikasa a měří se úbytek kyslíku Clarkovou elektrodou.

### **2.9.2.2. Voltametrie**

Huang a kol. modifikovali uhlíkovou pastovou elektrodu a ve své práci popisují její excelentní katalytickou elektrochemickou aktivitu, kterou je možné využít pro stanovení kyseliny močové v reálných vzorcích. Uhlíkovou pastovou elektrodu modifikovali nanopartikulami palladia uloženými v nanovláčkách uhlíku. Dle autorů lze toto uspořádání využít také jako substrát pro imobilizaci enzymů v biosenzorech (37).

### **2.9.2.3. Amperometrie**

Amperometrický systém pro stanovení kyseliny močové vyvinuli Wang a kol. Sestává ze tří elektrod, referenční Ag/AgCl, pomocné platinové a zlaté pracovní. Zlatý disk pracovní elektrody je pokryt polystyrenovou membránou s urikasou. Mebrána vznikla nanášením směsi roztoků chloroformu s polystyrenem a chloroformu s polymaleimidostyrenem a suspenzí urikasy (polymaleimidostyren stabilizuje a rovnoměrně rozptyluje urikasu na membráně). Toto uspořádání umožňuje měřit koncentraci kyseliny močové i v přítomnosti kyseliny askorbové, která u elektrochemických stanovení interferuje (38).



### **2.9.3. Kapilární elektromigrační metody**

#### **2.9.3.1. Kapilární elektroforéza**

Stanovení kyseliny močové v séru a moči kapilární elektroforézou s chemiluminiscenční detekcí popisuje ve své práci Zhao a kol. Tato metoda se dostává do popředí zájmu především proto, že je rychlá, jednoduchá, vysoce efektivní a senzitivní, spotřebovává malé množství rozpouštědel i vzorku a je relativně levná. Kapilární elektroforéza využívá také spojení s UV nebo elektrochemickou detekcí, ale dle Zhaa a kol. je chemiluminiscenční detekce nejcitlivější. Kyselina močová nepatří mezi látky s vlastní chemiluminiscencí. Její stanovení je tedy založené na reakci s luminolem a hexakynoželezitanem draselným v alkalickém prostředí (39).

#### **2.9.3.2. Kapilární elektroforéza na mikročipu**

Kapilární elektroforéza na mikročipu představuje moderní mikrofluidní systém s krátkým separačním časem a nízkou spotřebou reagensů. Tuto techniku s elektrochemickou detekcí využili pro stanovení kyseliny močové a askorbové v moči Qiu a kol. Mikročip se skládá ze skleněné destičky o rozměrech 3 x 6 x 0,3 cm, na kterou je natavená vrstva polydimethylsiloxanu. V této polymerové vrstvě jsou vytvořeny kanálky, separační mají na šířku 50  $\mu\text{m}$  a vzorkové 30  $\mu\text{m}$ , hloubka je stejná, maximálně 18  $\mu\text{m}$ . Mikročip je modifikován polydiallyldimethylammonium chloridem a polystyrensulfonyl sodným (40).

Stejní autoři popisují o rok později ve své další práci jiný způsob modifikace mikročipu pro stanovení kyseliny močové a askorbové v moči. Polydimethylsiloxanový čip modifikují vrstvením chitosanu a deoxyribonukleové kyseliny (41).

### **2.9.4. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je dnes nejpoužívanější chromatografickou metodou. Vyvinula se z plynové chromatografie a její největší výhodou je široká oblast separace od iontů až po látky vysokomolekulární.

#### **2.9.4.1. HPLC s isotopovým zředováním a hmotností spektrometrií (HPLC/ID-MS)**

Dai a kol. popisují tuto metodu ve své práci jako alternativní referenční metodu stanovení kyseliny močové v séru. Ke vzorkům séra je přidáván isotopicky značený vnitřní standard [1,3-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>] kyseliny močové, jsou odstraněny proteiny a směs je separována vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s ionizací elektrosprejem a hmotnostní detekcí (42).

#### **2.9.4.2. Iontově výměnná chromatografie**

Iontově výměnná chromatografie se používá pro separaci látek iontové povahy, které se dělí na základě elektrostatických interakcí se stacionární fází. Jako stacionární fáze se používají organické polymery či silikagel. Tato matrice je modifikována iontově výměnnými funkčními skupinami. Pro stanovení kyseliny močové jsou využívány slabé měniče iontů, například aminoskupina nebo diethylaminoethylová funkční skupina (43,44).

#### **2.9.4.3. HPLC v systému obrácených fází**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na obrácené fázi je nejčastějším chromatografickým uspořádáním kapalinové chromatografie. Systém je charakterizován nepolární stacionární a polární mobilní fází. Nejběžnějším nosičem stacionární fáze je silikagel, jehož volné silanolové skupiny mohou být nahrazeny různými funkčními skupinami, nejčastěji oktadecylem. Mobilní fázi představuje voda nebo pufr s nízkým obsahem organického modifikátoru (methanol, ethanol, acetonitril), který podporuje separaci solutu.

Selektivita v systému s obrácenými fázemi závisí na délce alkylového řetězce a na složení mobilní fáze. Čím je alkyl delší a mobilní fáze obsahuje více vody, je retence nepolárních látek vyšší (44).

Pro stanovení kyseliny močové v tělních tekutinách metodou HPLC v systému obrácených fází se nejčastěji používá chemicky vázaná oktadecylová stacionární fáze a mobilní fáze s pufrům (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) a přísadkou methanolu či acetonitrilu. Pro detekci kyseliny močové se běžně využívají UV-VIS nebo elektrochemické detektory (45-47).

Spektrofotometrické detektory patří k nejvíce používaným. Jsou jednoduché, spolehlivé a použitelné pro velký počet látek. Musí být zvolena taková mobilní fáze, která při dané vlnové délce co nejméně absorbuje. Elektrochemické detektory jsou oproti spektrofotometrickým selektivnější. Mohou být použity pouze pro látky s oxidoredukčními vlastnostmi. Jsou založeny na měření vodivosti nebo elektrického proudu. Nejběžněji používanými pracovními elektrodami jsou uhlíkové nebo rtuťové (44).

Dalším možným využitím systému s obrácenými fázemi pro stanovení kyseliny močové je použití iontově párového činidla. Benzie I. a kol. ve své práci popisují simultánní stanovení allantoinu a kyseliny močové za použití heptansulfonové kyseliny jako iontově párového činidla (48).

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

---

#### 3.1. Soubor pacientů

Vzorky pro tuto studii byly získány od vyšetřovaných pacientů na Oddělení klinické biochemie a diagnostiky Nemocnice Pardubice. Koncentrace kyseliny močové v séru vyšetřovaných pacientů zde byla analyzována enzymovou metodou s měřením poklesu její absorpance při 293 nm. Sérum bylo odebíráno po 200  $\mu$ l do polyethylenových mikrozkušavek a uskladněno v mrazícím boxu při teplotě  $-20$  °C. Doba skladování nepřesáhla jeden měsíc. Prováděná studie byla povolena etickou komisí Krajské nemocnice Pardubice (viz příloha 1).

#### Charakteristika sledované populace

Pro tuto studii bylo zvoleno pět souborů pacientů:

1. soubor pacientů s kardiovaskulárním onemocněním,
2. soubor pacientů s primární hypertenzí,
3. soubor pacientů s diabetem typu 2,
4. soubor pacientů s onemocněním vylučovací soustavy,
5. kontrolní skupina pacientů s ostatními diagnózami.

**Tab. 3-1:** *Charakteristika sledované populace*

Soubor	Ženy		Muži	
	Počet	Věk	Počet	Věk
pacienti s kardiovaskulárním onemocněním	25	50 – 89	27	56 – 92
pacienti s primární hypertenzí	25	34 – 84	26	51 – 86
pacienti s diabetem	18	40 – 88	17	53 – 77
pacienti s onemocněním vylučovací soustavy	40	20 – 83	44	34 – 97
kontrolní skupina	35	21 – 81	42	9 – 83

### 3.1.1. Chemikálie

- Kyselina chlorovodíková (HCl,  $\rho = 1,18$ ,  $w = 36,6\%$ , Mr 36,45) p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo, H-7020),
- kyselina chloristá (HClO<sub>4</sub>,  $\rho = 1,664$ ,  $w = 70\%$ , Mr 100,46) p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo, 24,425-2),
- methanol gradient grade pro chromatografii LiChrosolv (R) (CH<sub>4</sub>O, Mr 32,04) (Merck KGaA, Darmstadt, Německo, 1.06007.2500),
- ethanol gradient grade pro chromatografii LiChrosolv (R) (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O, Mr 46,07) (Merck KGaA, Darmstadt, Německo, 1.11727.2500),
- hydrogenfosforečnan disodný (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Mr 142) p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo, S-7907),
- deionizovaná voda ( $G < 0,055 \mu\text{S}$ ),
- kontrolní roztoky (Liquid Assayed Chemistry Control, Passau, Germany, TLM10081, TLM10082),
- kalibrační roztoky (ChemI Calibrator, Dade Behring, Newark, DE, USA, 8JJ178, 8JD278, 8JD378).

### 3.1.2. Pomůcky a přístroje

- Vysokotlaké analytické čerpadlo LC-10 AD<sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japonsko),
- autosampler SIL-10 AD<sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japonsko),
- chromatografická kolona MAG1, 4,6 x 150 mm, Biospher PSI 200 C18, 5  $\mu\text{m}$  (Labio, Praha, Česká republika),
- termostat kolon CTO-10 AC<sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japonsko),
- UV-VIS detektor SPD-10 A<sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japonsko),
- řídicí systém SCL-10 A<sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japonsko),

- vyhodnocovací software: Clarity (DataApex, Praha, Česká republika),
- analytické váhy LB-1050/2 (LABERTE, Budapešť, Maďarsko),
- digitální předvážky Sartorius 2000P (Sartorius, Německo),
- ultrazvuková vana K2 (Kraintek, Podhájska, Slovensko),
- ultrazvuková vana K12 (Kraintek, Podhájska, Slovensko),
- laboratorní pH metr (WTW GmbH, Weilheim, Německo),
- pH elektroda (WTW GmbH, Weilheim, Německo),
- čerpadlo (KNF Neuberger, Freiburg, Německo),
- vortex (Heidolph, Schwabach, Německo),
- kombinovaná chladnička s mrazničkou (Liebherr, Švýcarsko),
- chlazená centrifuga MR 23 (Jouan, St. Herblain, Francie),
- centrifuga Sorvall TC 6 (Du Pont, Newtown, CT, USA),
- filtrační aparatura Supelco (Supelco, Bellefonte, PA, USA),
- nylonové filtry pro filtrování mobilní fáze (0,20 µm x 47 mm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA),
- magnetické míchadlo (Heidolph, Schwabach, Německo),
- polyethylenové mikrokumavky s víčkem typu Eppendorf (1,5 ml),
- nylonové filtry pro filtrování vzorku (Corning, New York, USA),
- automatické pipety (Biohit, Helsinky, Finsko),
- skleněné vialky se šroubovacím víčkem,
- kádinky, odměrné válce, odměrné baňky.

### 3.1.3. Pracovní roztoky

#### Deproteinační roztok kyseliny chloristé (cca 1 mol/l)

Ke 100 ml deionizované vody bylo přidáno 22 ml HClO<sub>4</sub> (c = 11,59 mol/l) a doplněno deionizovanou vodou na konečný objem 250 ml. Roztok byl uchováván v ledničce.

#### Kalibrační roztoky

Kalibrační roztoky K1, K2 a K3 byly připraveny rozpuštěním obsahu lahvičky ve 2 ml deionizované vody.

**Tab. 3-2:** *Koncentrace kalibračních roztoků*

Kalibrační roztok	Koncentrace KM
K1	1439, 1457 μmol/l
K2	708 μmol/l
K3	0 μmol/l

#### Kontrolní roztoky

Kontrolní roztoky TLM1 a TLM2 byly pozvolna rozmrazeny. Kontrolní sérum pro přesnost stanovení mezi sériemi (inter-assay) bylo připraveno odebráním srážlivé venózní krve a centrifugací (3000 rpm, 15 min.), poté bylo rozpipetováno po 200 μl do polyethylenových mikrozkušavek a uskladněno v mrazícím boxu při teplotě -20 °C.

**Tab. 3-3:** *Koncentrace kontrolních roztoků*

Kalibrační roztok	Koncentrace KM
TLM1	319 ± 32 μmol/l
TLM2	653 ± 130 μmol/l

### Mobilní fáze

Mobilní fáze: 25 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – methanol (95:5, v/v), pH = 4,75 ± 0,005.

Navážka 7,08 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> byla rozpuštěna v 1995 ml deionizované vody, po rozpuštění bylo přidáno 105 ml methanolu. pH mobilní fáze bylo upraveno pomocí kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 4,75. Mobilní fáze byla přefiltrována přes nylonový filtr a odvzdušněna pomocí ultrazvuku.

### Roztok 50 % methanolu ve vodě

Mobilní fáze pro regeneraci a pro účely uchovávání kolony o objemu 1 l byla připravena smícháním 500 ml methanolu a 500 ml deionizované vody. Takto připravená mobilní fáze byla přefiltrována přes nylonový filtr a odvzdušněna pomocí ultrazvuku.

### Deionizovaná voda

Deionizovaná voda určena pro proplach HPLC systému včetně kolony byla přefiltrována přes nylonový filtr a odvzdušněna pomocí ultrazvuku.



## **3.2. Postup stanovení kyseliny močové pomocí HPLC s UV detekcí**

### **3.2.1. Příprava vzorků**

Čtyři sta mikrolitrů vychlazené kyseliny chloristé bylo přidáno k 200  $\mu$ l séra, směs byla důkladně promíchána pomocí vortexu a inkubována v chladničce po dobu 10 minut. Obsah zkumavky byl poté centrifugován (22000 rpm, 12 °C, 10 minut). Dvě stě mikrolitrů supernatantu bylo přefiltrováno pomocí centrifugačních nylonových filtrů (22000 rpm, 12 °C, 5 minut). Padesát mikrolitrů filtrátu bylo poté převedeno do skleněných vialek a bylo přidáno 450  $\mu$ l přefiltrované mobilní fáze.

### **3.2.2. Chromatografická analýza**

Kyselina močová v upravených vzorcích byla stanovena metodou HPLC v systému obrácených fází s UV detekcí.

HPLC systém byl složen z čerpadla, autosampleru, termostatu kolon, UV-VIS detektoru a řídicí stanice. Jako stacionární fáze byla použita analytická kolona MAG1 4,6 x 150 mm, Biospher PSI 200 C18, 5  $\mu$ m, opatřená ochranou kolonkou MAG1 4,6 x 20 mm, Biospher PSI 200 C18, 5  $\mu$ m.

HPLC podmínky pro stanovení kyseliny močové:

- mobilní fáze: 25 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – methanol (95:5, v/v), pH = 4,75  $\pm$  0,005,
- průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min,
- dávkovaný objem: 10  $\mu$ l,
- teplota: 25 °C,
- doba analýzy: 10 min,
- detekce: 292 nm.

### 3.2.3. Kalibrace

Pro kvantifikaci kyseliny močové v séru byla použita metoda kalibrační křivky. Pro její konstrukci byly připraveny standardy (naředěním kalibračního roztoku K3) o koncentracích 0 – 720  $\mu\text{mol/l}$ . Rovnice kalibrační křivky byla získána proložením závislosti plochy píku na koncentraci metodou nejmenších čtverců.

### 3.2.4. Analytické parametry

#### 3.2.4.1. Přesnost v sérii

Přesnost stanovení kyseliny močové v sérii (intra-assay) byla určena analýzou 10ti nezávisle připravených vzorků. Vzorky byly analyzovány během jednoho dne. Jako míra přesnosti byl použit variační koeficient (CV%).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - AVG)^2}{n - 1}}$$

$$CV\% = \frac{SD}{AVG} * 100$$

#### 3.2.4.2. Přesnost mezi sériemi

Přesnost stanovení kyseliny močové mezi sériemi (inter-assay) byla určena analýzou jednoho kontrolního vzorku séra. Kontrolní vzorek byl analyzován s každou měřenou sérií během jedenácti dní. Jako míra přesnosti byl použit variační koeficient (CV%).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - AVG)^2}{n - 1}}$$

$$CV\% = \frac{SD}{AVG} * 100$$

### 3.2.4.3. Výtežnost (recovery test)

Výtěžnost metody (recovery) byla zjištěna pomocí přídavek známého množství kyseliny močové ke vzorkům a přesně stanoveným ředěním vzorků deionizovanou vodou. Přídavky i ředění byly voleny tak, aby se konečná koncentrace pohybovala v rozmezí daném rozsahem kalibrační křivky. Hodnoty výtěžnosti metody (recovery) byly vypočítány jako stonásobek poměru mezi nalezeným a přidaným množstvím kyseliny močové.

$$recovery(\%) = \frac{x_i - x_0}{y} * 100$$

kde  $x_i$  je koncentrace vzorku s přídavkem nebo vzorku ředěného,  $x_0$  je endogenní koncentrace a  $y$  je přidané množství analytu nebo ředění.

### 3.2.5. Zpracování výsledků

Pro statistické zpracování dat byl použit program MS Excel a program poskytovaný softwarem SigmaStat (Systat Software, Richmond, USA). Statistické zpracování bylo provedeno na hladině významnosti 0,05.

## 4. VÝSLEDKY

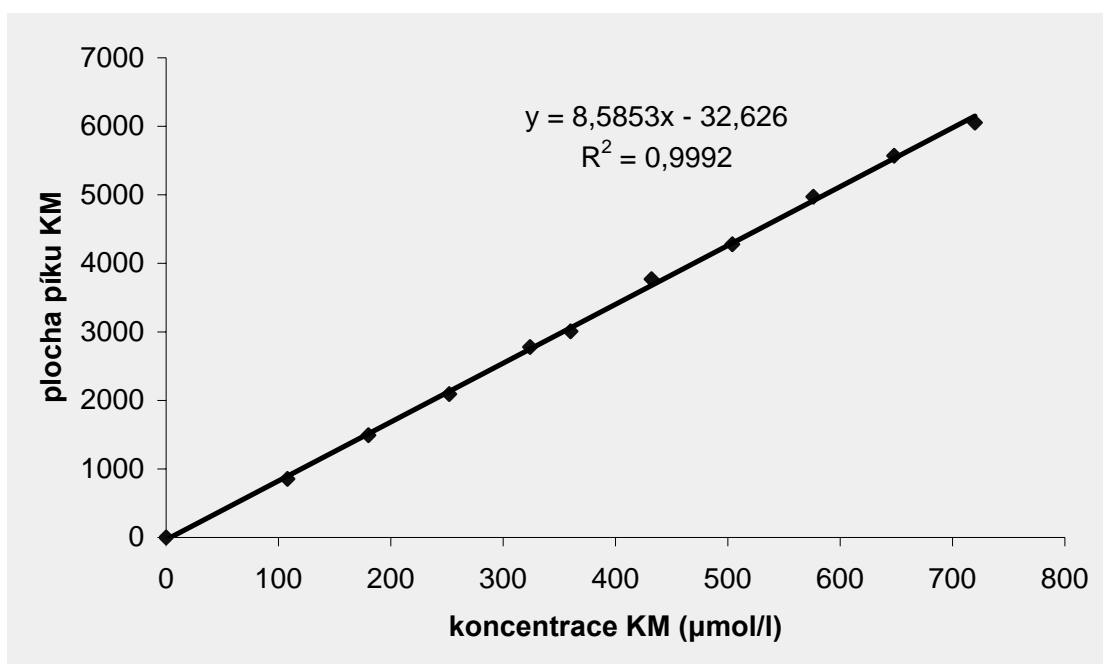
---

### 4.1. Chromatografická analýza

Chromatografické záznamy kyseliny močové ve standardu a vzorku pacienta jsou znázorněny v příloze 2 a 3. Retenční čas se pohyboval v rozmezí  $5,6 \pm 0,1$  min.

#### 4.1.1. Kalibrační křivka

Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci standardů kyseliny močové byla lineární v celém rozsahu použitých koncentrací (0 – 720  $\mu\text{mol/l}$ ).



Obr. 4-1: Kalibrační křivka pro stanovení kyseliny močové v séru

## 4.1.2. Analytické parametry

### 4.1.2.1. Přesnost v sérii

Přesnost stanovení kyseliny močové v sérii byla určena analýzou 10ti nezávisle připravených vzorků.

**Tab. 4-1:** *Přesnost v sérii kyseliny močové v séru*

Průměr ( $\mu\text{mol/l}$ )	Směrodatná odchylka ( $\mu\text{mol/l}$ )	Variační koeficient (%)
351,79	9,19	2,61

### 4.1.2.2. Přesnost mezi sériemi

Přesnost stanovení kyseliny močové mezi sériemi byla určena analýzou kontrolního séra v jedenácti po sobě jdoucích sériích měření.

**Tab. 4-2:** *Přesnost mezi sériemi kyseliny močové v séru*

Průměr ( $\mu\text{mol/l}$ )	Směrodatná odchylka ( $\mu\text{mol/l}$ )	Variační koeficient (%)
207,49	8,77	4,22

#### 4.1.2.3. Výtežnost (recovery test)

Správnost stanovení kyseliny močové v séru byla určena recovery testem, metodou standardních přidavků a ředěním.

**Tab. 4-3:** *Správnost stanovení kyseliny močové metodou standardních přidavků*

Přídavek (μmol/l)	Výtěžnost (%)	Průměrná výtěžnost (%)	Směrodatná odchylka (%)	Variační koeficient (%)
28,8	103,38	101,55	2,43	2,39
57,6	102,22			
86,4	104,11			
115,2	99,47			
144	98,57			

**Tab. 4-4:** *Správnost stanovení kyseliny močové metodou ředění*

Ředění	Výtěžnost (%)	Průměrná výtěžnost (%)	Směrodatná odchylka (%)	Variační koeficient (CV%)
2x	103,23	104,31	4,50	4,31
4x	105,6			
10x	98,82			
20x	109,58			

## 4.2. Distribuce hladin kyseliny močové

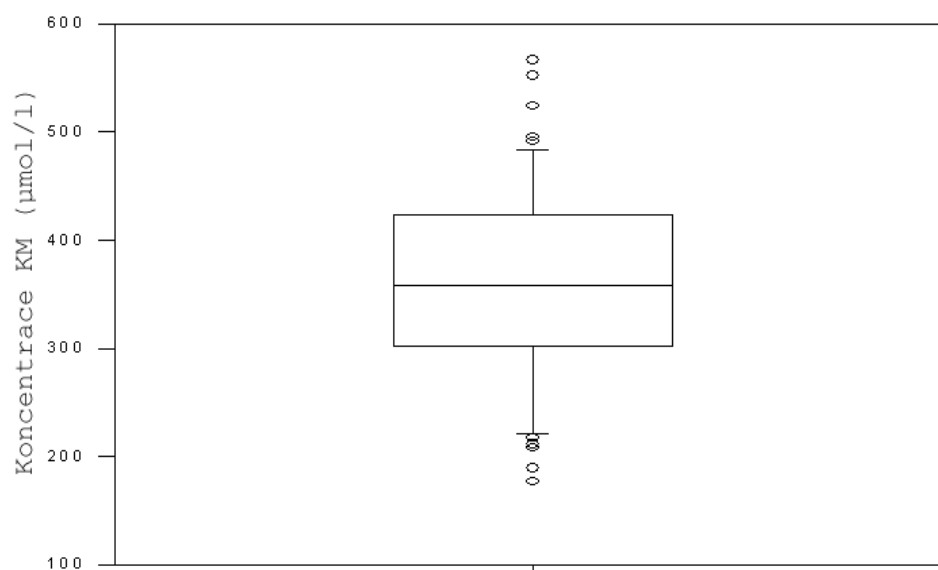
### 4.2.1. Distribuce hladin kyseliny močové v souboru pacientů s kardiovaskulárním onemocněním

Hladiny kyseliny močové v séru pacientů s kardiovaskulárním onemocněním se pohybovaly v rozmezí  $359 \pm 91$   $\mu\text{mol/l}$ . Rozdělení dle pohlaví je uvedeno v tabulce. Předpoklad normality a nezávislosti dat byl u testovaného souboru přijat. Jako optimální rozdělení dat bylo navrženo normální rozdělení.

**Tab. 4-5:** Hladiny kyseliny močové v séru pacientů s kardiovaskulárním onemocněním

Pohlaví	n	Průměr ( $\mu\text{mol/l}$ )	SD ( $\mu\text{mol/l}$ )	Medián ( $\mu\text{mol/l}$ )	95 % spolehlivost	
					Spodní mez	Horní mez
ženy	25	339,26	105,56	316,20	263,57	405,97
muži	27	378,08	73,31	370,06	338,01	426,05
obojí	52	359,41	91,47	357,91	303,55	423,6

Krabicový graf



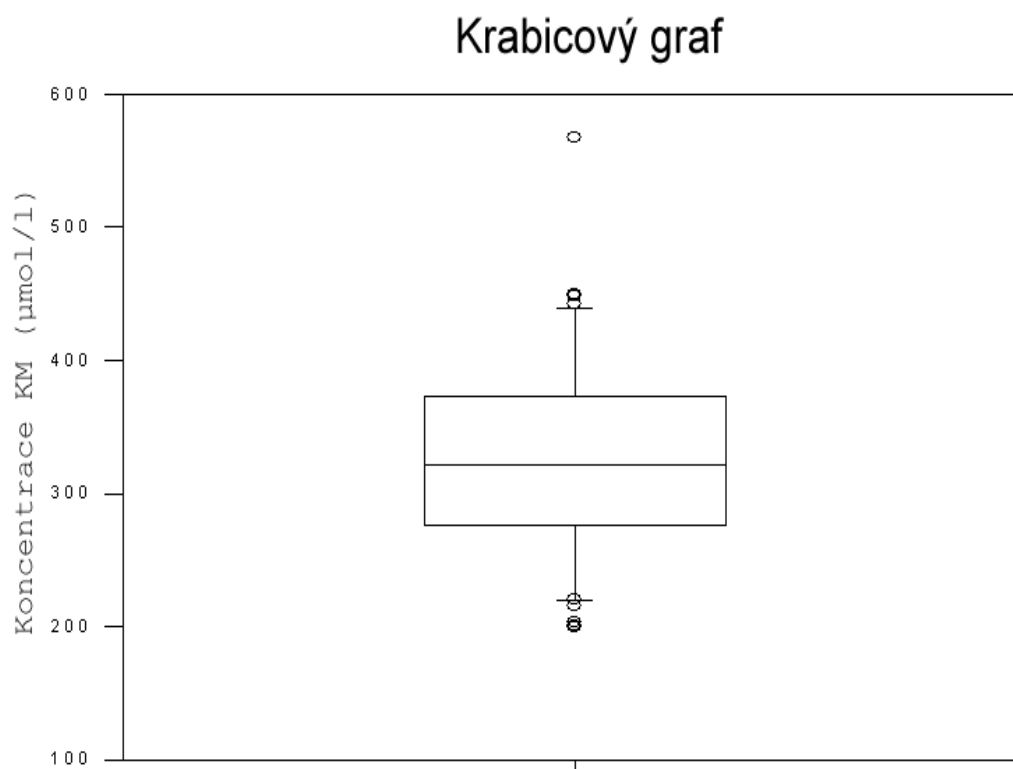
**Obr. 4-2:** Krabicový graf hladiny kyseliny močové v séru mužů i žen s kardiovaskulárním onemocněním

#### 4.2.2. Distribuce hladin kyseliny močové v souboru pacientů s primární hypertenzí

Hladiny kyseliny močové v séru pacientů s primární hypertenzí se pohybovaly v rozmezí  $326 \pm 78$   $\mu\text{mol/l}$ . Rozdělení dle pohlaví je uvedeno v tabulce. Předpoklad normality a nezávislosti dat byl u testovaného souboru přijat. Jako optimální rozdělení dat bylo navrženo normální rozdělení.

**Tab. 4-6:** Hladiny kyseliny močové v séru pacientů s primární hypertenzí

Pohlaví	n	Průměr ( $\mu\text{mol/l}$ )	SD ( $\mu\text{mol/l}$ )	Medián ( $\mu\text{mol/l}$ )	95 % spolehlivost	
					Spodní mez	Horní mez
ženy	25	292,22	65,57	280,78	253,14	333,71
muži	26	358,68	75,14	348,32	312,62	409,05
obojí	51	326,10	77,54	321,67	276,40	370,89



**Obr. 4-3:** Krabicový graf hladiny kyseliny močové v séru mužů i žen s primární hypertenzí



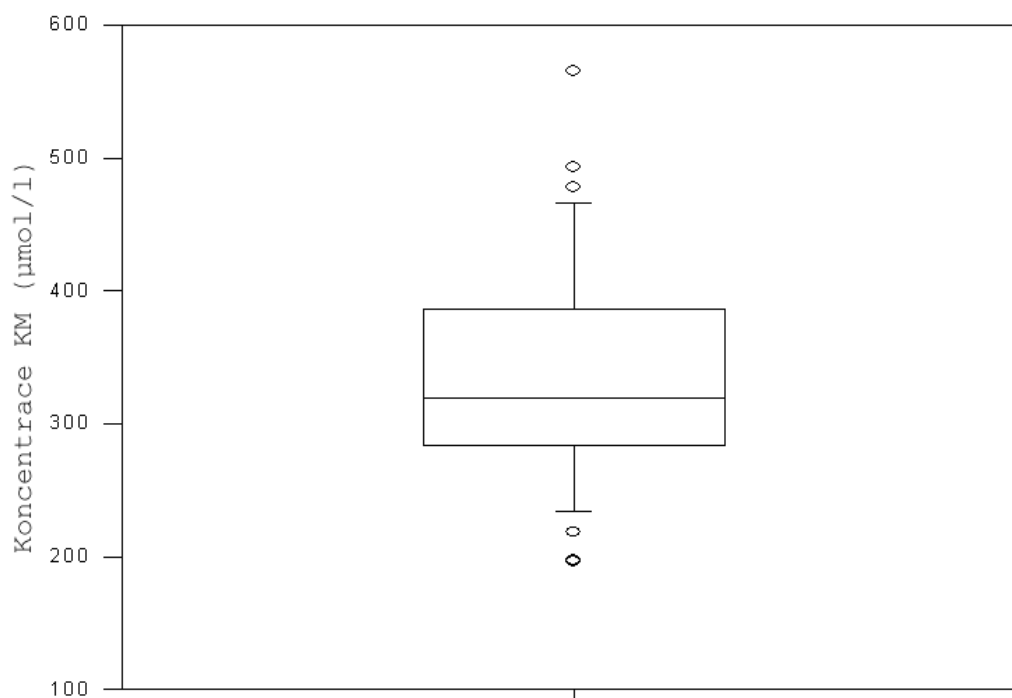
### 4.2.3. Distribuce hladin kyseliny močové v souboru pacientů s diabetem

Hladiny kyseliny močové v séru pacientů s diabetem 2. typu se pohybovaly v rozmezí  $335 \pm 84 \mu\text{mol/l}$ . Rozdělení dle pohlaví je uvedeno v tabulce. Předpoklad normality a nezávislosti dat byl u testovaného souboru přijat. Jako optimální rozdělení dat bylo navrženo normální rozdělení.

**Tab. 4-7:** Hladiny kyseliny močové v séru pacientů s diabetem

Pohlaví	n	Průměr ( $\mu\text{mol/l}$ )	SD ( $\mu\text{mol/l}$ )	Medián ( $\mu\text{mol/l}$ )	95 % spolehlivost	
					Spodní mez	Horní mez
ženy	18	308,43	77,71	294,22	264,20	336,73
muži	17	362,84	82,97	339,45	306,32	396,20
obojí	35	334,86	83,79	319,82	284,26	382,39

Krabicový graf



**Obr. 4-4:** Krabicový graf hladiny kyseliny močové v séru mužů i žen s diabetem

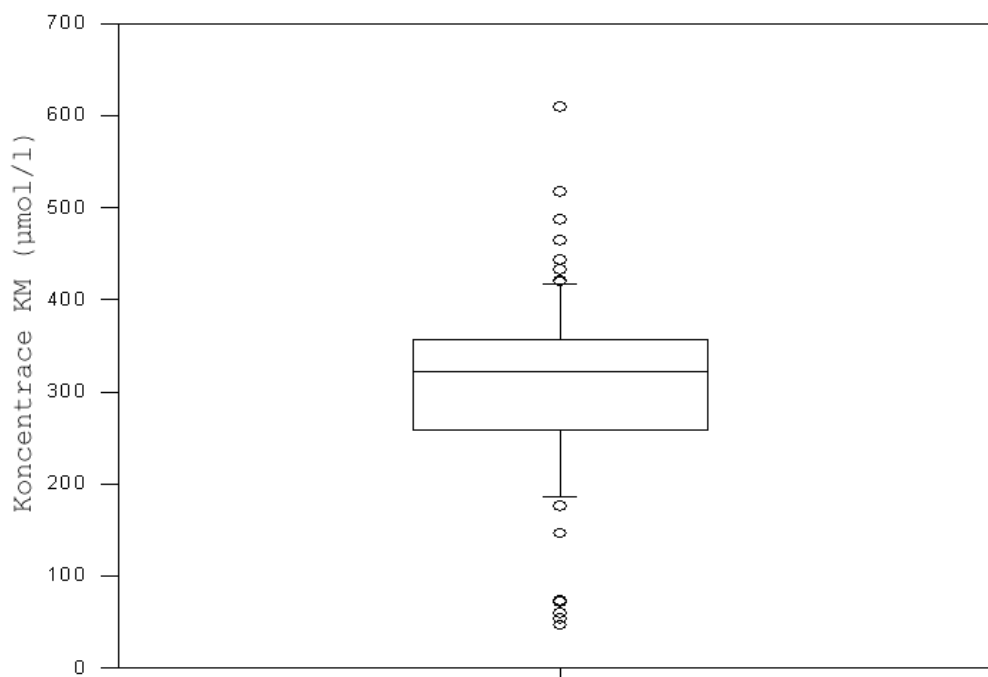
#### 4.2.4. Distribuce hladin kyseliny močové v souboru pacientů s onemocněním vylučovací soustavy

Hladiny kyseliny močové v séru pacientů s onemocněním vylučovací soustavy se pohybovaly v rozmezí  $307 \pm 102 \mu\text{mol/l}$ . Rozdělení dle pohlaví je uvedeno v tabulce. Předpoklad normality a nezávislosti dat byl u testovaného souboru přijat. Jako optimální rozdělení dat bylo navrženo normální rozdělení.

**Tab. 4-8:** Hladiny kyseliny močové v séru pacientů s onemocněním vylučovací soustavy

Pohlaví	n	Průměr ( $\mu\text{mol/l}$ )	SD ( $\mu\text{mol/l}$ )	Medián ( $\mu\text{mol/l}$ )	95 % spolehlivost	
					Spodní mez	Horní mez
ženy	40	284,49	123,02	306,96	223,83	344,50
muži	44	326,76	72,72	331,60	306,45	364,99
obojí	84	306,63	101,50	322,12	259,51	355,88

Krabicový graf



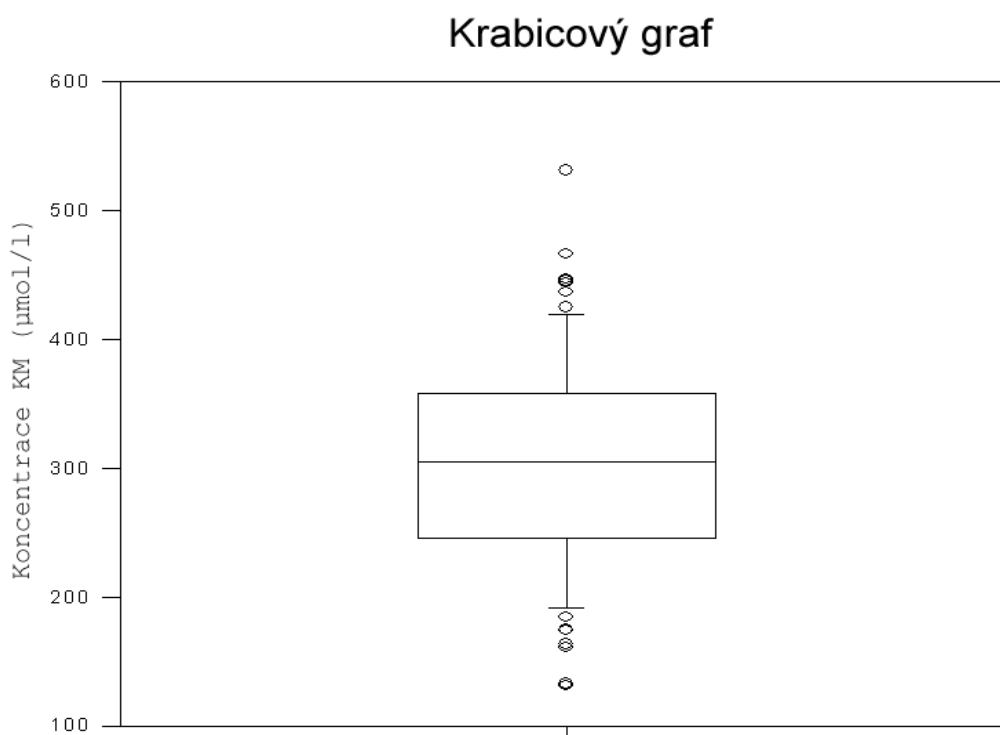
**Obr. 4-5:** Krabicový graf hladiny kyseliny močové v séru mužů i žen s onemocněním vylučovací soustavy

#### 4.2.5. Distribuce hladin kyseliny močové u kontrolní skupiny pacientů

Hladiny kyseliny močové v séru pacientů kontrolního souboru se pohybovaly v rozmezí  $307 \pm 102 \mu\text{mol/l}$ . Rozdělení dle pohlaví je uvedeno v tabulce. Předpoklad normality a nezávislosti dat byl u testovaného souboru přijat. Jako optimální rozdělení dat bylo navrženo normální rozdělení.

**Tab. 4-9:** Hladiny kyseliny močové v séru pacientů z kontrolní skupiny

Pohlaví	n	Průměr ( $\mu\text{mol/l}$ )	SD ( $\mu\text{mol/l}$ )	Medián ( $\mu\text{mol/l}$ )	95 % spolehlivost	
					Spodní mez	Horní mez
ženy	35	275,95	75,51	265,5	224,67	314,77
muži	42	331,19	83,59	333,69	287,70	398,40
obojí	77	306,08	84,18	305,02	247,12	356,84



**Obr. 4-6:** Krabicový graf hladiny kyseliny močové v séru mužů i žen z kontrolní skupiny

#### 4.2.6. Vliv věku na hladiny kyseliny močové

Tabulka 4-10 zobrazuje vliv věku na hladiny kyseliny močové v séru pacientů dle jednotlivých souborů a pohlaví. Statisticky významně vyšší hladina kyseliny močové ve spojení s věkem byla nalezena pouze u obojího pohlaví kontrolní skupiny. Ostatní soubory nevykazují statisticky významné odlišnosti.

**Tab. 4-10:** *Vliv věku na hladiny kyseliny močové*

Soubor	Pohlaví	Spearmanův korelační koeficient (R)	Fisher-Snedecorův test (p)	Korelace
kardiovaskulární onemocnění	ženy	0,273	0,183	ne
	muži	-0,139	0,485	ne
	obojí	0,0798	0,572	ne
primární hypertenze	ženy	0,00385	0,984	ne
	muži	0,193	0,341	ne
	obojí	0,104	0,465	ne
diabetes mellitus	ženy	0,0724	0,773	ne
	muži	0,164	0,344	ne
	obojí	0,00385	0,984	ne
onemocnění vylučovací soustavy	ženy	0,0777	0,632	ne
	muži	0,0217	0,888	ne
	obojí	0,0448	0,685	ne
kontrolní skupina	ženy	0,292	0,0884	ne
	muži	0,250	0,110	ne
	<b>obojí</b>	<b>0,258</b>	<b>0,0236</b>	<b>ano</b>

### 4.3. Porovnání hladiny kyseliny močové mezi pacienty a kontrolní skupinou

#### 4.3.1. Soubor pacientů s kardiovaskulárním onemocněním versus kontrolní skupina

Ze statistické analýzy dat Studentovým t-testem bylo zjištěno, že pacienti s kardiovaskulárním onemocněním mají statisticky významně vyšší hladinu kyseliny močové.

**Tab. 4-11:** Porovnání hladiny kyseliny močové mezi pacienty s kardiovaskulárním onemocněním a kontrolní skupinou

Soubor pacientů s kardiovaskulárním onemocněním			Kontrolní skupina pacientů			Studentův t-test (p)
Pohlaví	n	Průměr ± SD (μmol/l)	Pohlaví	n	Průměr ± SD (μmol/l)	
ženy	25	339,26 ± 105,56	ženy	35	275,95 ± 75,51	<b>0,009</b>
muži	27	378,08 ± 73,31	muži	42	331,19 ± 83,59	<b>0,02</b>
obojí	52	359,41 ± 91,47	obojí	77	306,08 ± 84,18	<b>&lt; 0,001</b>

### 4.3.2. Soubor pacientů s primární hypertenzí versus kontrolní skupina

Ze statistické analýzy dat Studentovým t-testem nebyla zjištěna statisticky významná odlišnost mezi souborem pacientů s primární hypertenzí a kontrolní skupinou.

**Tab. 4-12:** *Porovnání hladiny kyseliny močové mezi pacienty s primární hypertenzí a kontrolní skupinou*

Soubor pacientů s primární hypertenzí			Kontrolní skupina pacientů			Studentův t-test (p)
Pohlaví	n	Průměr ± SD (μmol/l)	Pohlaví	n	Průměr ± SD (μmol/l)	
ženy	25	292,22 ± 65,57	ženy	35	275,95 ± 75,51	0,389
muži	26	358,68 ± 75,14	muži	42	331,19 ± 83,59	0,176
obojí	51	326,10 ± 77,54	obojí	77	306,08 ± 84,18	0,177

### 4.3.3. Soubor pacientů s diabetem versus kontrolní skupina

Ze statistické analýzy dat Studentovým t-testem nebyla zjištěna statisticky významná odlišnost mezi souborem pacientů s diabetem a kontrolní skupinou.

**Tab. 4-13:** *Porovnání hladiny kyseliny močové mezi pacienty s diabetem a kontrolní skupinou*

Soubor pacientů s diabetem			Kontrolní skupina pacientů			Studentův t-test (p)
Pohlaví	n	Průměr ± SD (μmol/l)	Pohlaví	n	Průměr ± SD (μmol/l)	
ženy	18	308,43 ± 77,71	ženy	35	275,95 ± 75,51	0,148
muži	17	362,84 ± 82,97	muži	42	331,19 ± 83,59	0,192
obojí	35	334,86 ± 83,79	obojí	77	306,08 ± 84,18	0,096

#### 4.3.4. Soubor pacientů s onemocněním vylučovací soustavy versus kontrolní skupina

Ze statistické analýzy dat Studentovým t-testem nebyla zjištěna statisticky významná odlišnost mezi souborem pacientů s onemocněním vylučovací soustavy a kontrolní skupinou.

**Tab. 4-14:** *Porovnání hladiny kyseliny močové mezi pacienty s onemocněním vylučovací soustavy a kontrolní skupinou*

Soubor pacientů s onemocněním vylučovací soustavy			Kontrolní skupina pacientů			Studentův t-test (p)
Pohlaví	n	Průměr ± SD (μmol/l)	Pohlaví	n	Průměr ± SD (μmol/l)	
ženy	40	284,49 ± 123,02	ženy	35	275,95 ± 75,51	0,148
muži	44	326,76 ± 72,72	muži	42	331,19 ± 83,59	0,192
obojí	58	306,63 ± 101,50	obojí	77	306,08 ± 84,18	0,096

## 4.4. Porovnání HPLC s enzymovou metodou

Byly porovnány dvě metody stanovení kyseliny močové v séru pacientů vybraných souborů. Metoda použitá na Oddělení klinické biochemie a diagnostiky Nemocnice Pardubice byla enzymová s měřením poklesu absorbance kyseliny močové při 293 nm. Námi použitá metoda byla vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí. K určení závislosti mezi těmito dvěma metodami byl použit Spearmanův korelační koeficient a lineární regresní analýza.

### 4.4.1. Soubor pacientů s kardiovaskulárním onemocněním

Naměřené hladiny kyseliny močové metodou HPLC se pohybovaly v rozmezí  $359 \pm 92,6 \mu\text{mol/l}$  (medián  $348,3 \mu\text{mol/l}$ ), enzymovou metodou v rozmezí  $350,1 \pm 106,7 \mu\text{mol/l}$  (medián  $347 \mu\text{mol/l}$ ).

Závislost obou metod lze vyjádřit následující rovnicí lineární regrese.

$$y = -41,541 + (1,091 * x),$$

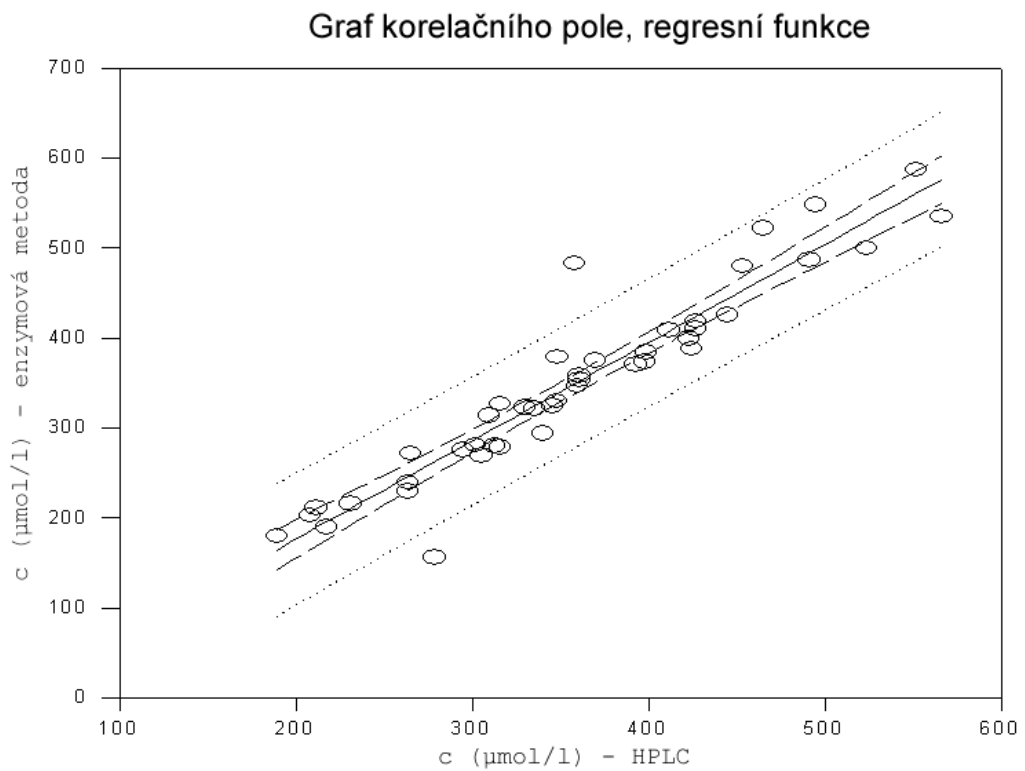
kde  $y$  je koncentrace kyseliny močové naměřená enzymovou metodou a  $x$  je koncentrace kyseliny močové naměřená metodou HPLC.

Hodnoty korelačních koeficientů ukazují na velmi silnou korelaci. Dosazením průměrných hodnot koncentrací kyseliny močové do rovnice lineární regrese bylo zjištěno, že enzymová metoda poskytuje hodnoty přibližně o 2,5 % nižší.

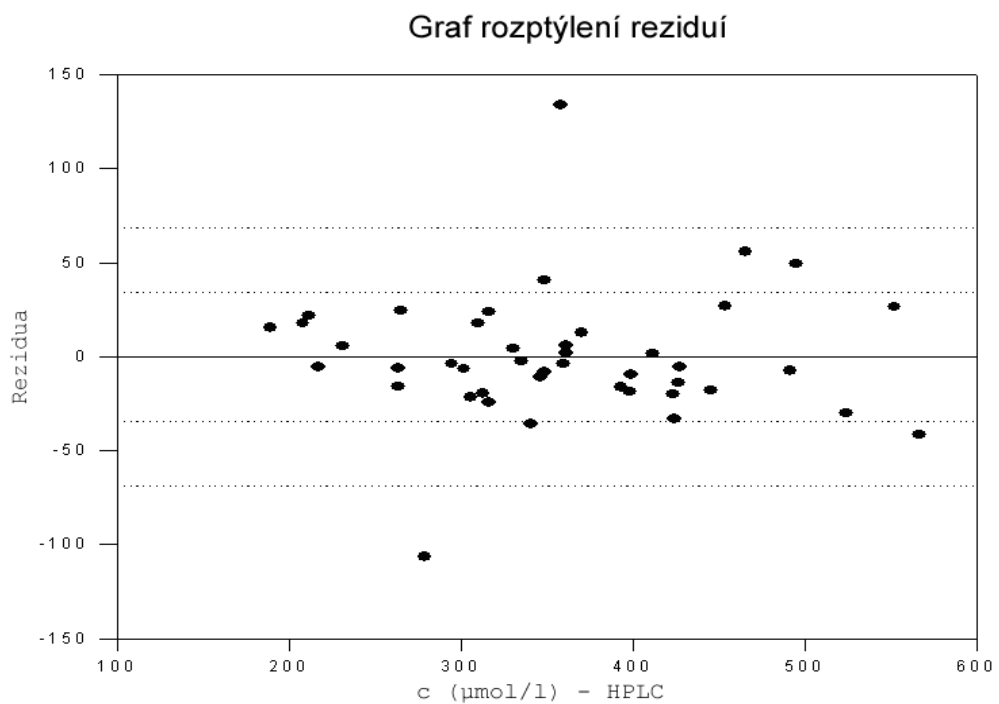
**Tab. 4-15:** Lineární regresní analýza u souboru pacientů s kardiovaskulárním onemocněním

n	Regresní koeficient	Korelační koeficient	Koeficient determinace	Spearmanův korelační koeficient
43	1,091	0,947	0,897	0,965





**Obr. 4-7:** Graf korelačního pole u souboru pacientů s kardiovaskulárním onemocněním



**Obr. 4-8:** Graf rozptýlení reziduí u souboru pacientů s kardiovaskulárním onemocněním

#### 4.4.2. Soubor pacientů s primární hypertenzí

Naměřené hladiny kyseliny močové metodou HPLC se pohybovaly v rozmezí  $329,2 \pm 78,6 \mu\text{mol/l}$  (medián  $328,3 \mu\text{mol/l}$ ), enzymovou metodou v rozmezí  $327 \pm 84,3 \mu\text{mol/l}$  (medián  $324,5 \mu\text{mol/l}$ ).

Závislost obou metod lze vyjádřit následující rovnicí lineární regrese.

$$y = -12,988 + (1,033 * x),$$

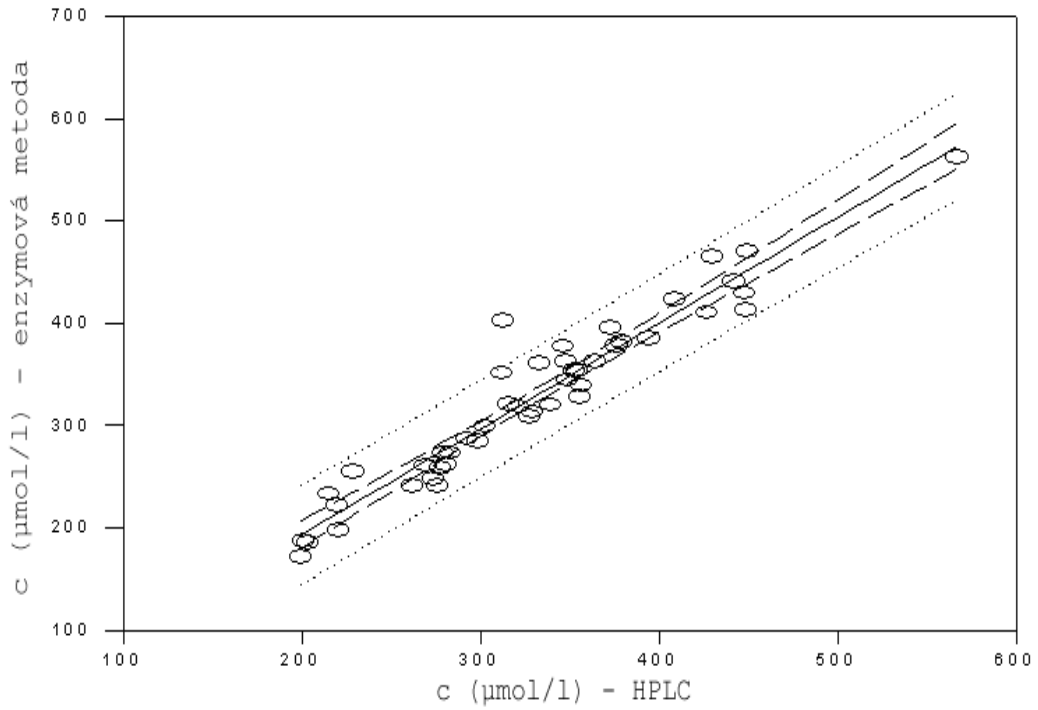
kde  $y$  je koncentrace kyseliny močové naměřená enzymovou metodou a  $x$  je koncentrace kyseliny močové naměřená metodou HPLC.

Hodnoty korelačních koeficientů ukazují na velmi silnou korelaci. Dosazením průměrných hodnot koncentrací kyseliny močové do rovnice lineární regrese bylo zjištěno, že enzymová metoda poskytuje hodnoty přibližně o 0,6 % nižší.

**Tab. 4-16:** Lineární regresní analýza u souboru pacientů s primární hypertenzí

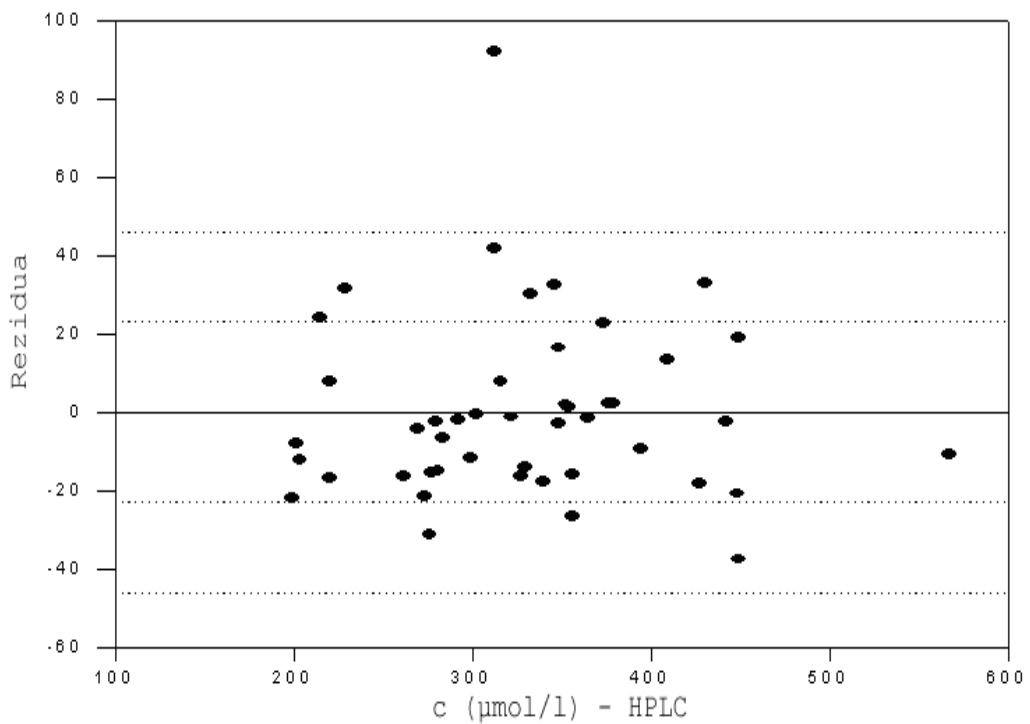
n	Regresní koeficient	Koeficient korelace	Koeficient determinace	Spearmanův korelační koeficient
46	1,033	0,962	0,926	0,953

Graf korelačního pole, regresní funkce



Obr. 4-9: Graf korelačního pole u souboru pacientů s primární hypertenzí

Graf rozptýlení reziduí



Obr. 4-10: Graf rozptýlení reziduí u souboru pacientů s primární hypertenzí

### 4.4.3. Soubor pacientů s diabetem

Naměřené hladiny kyseliny močové metodou HPLC se pohybovaly v rozmezí  $332,1 \pm 83,5 \mu\text{mol/l}$  (medián  $319,5 \mu\text{mol/l}$ ), enzymovou metodou v rozmezí  $320,4 \pm 81,4 \mu\text{mol/l}$  (medián  $314,5 \mu\text{mol/l}$ ).

Závislost obou metod lze vyjádřit následující rovnicí lineární regrese.

$$y = 27,953 + (0,881 * x),$$

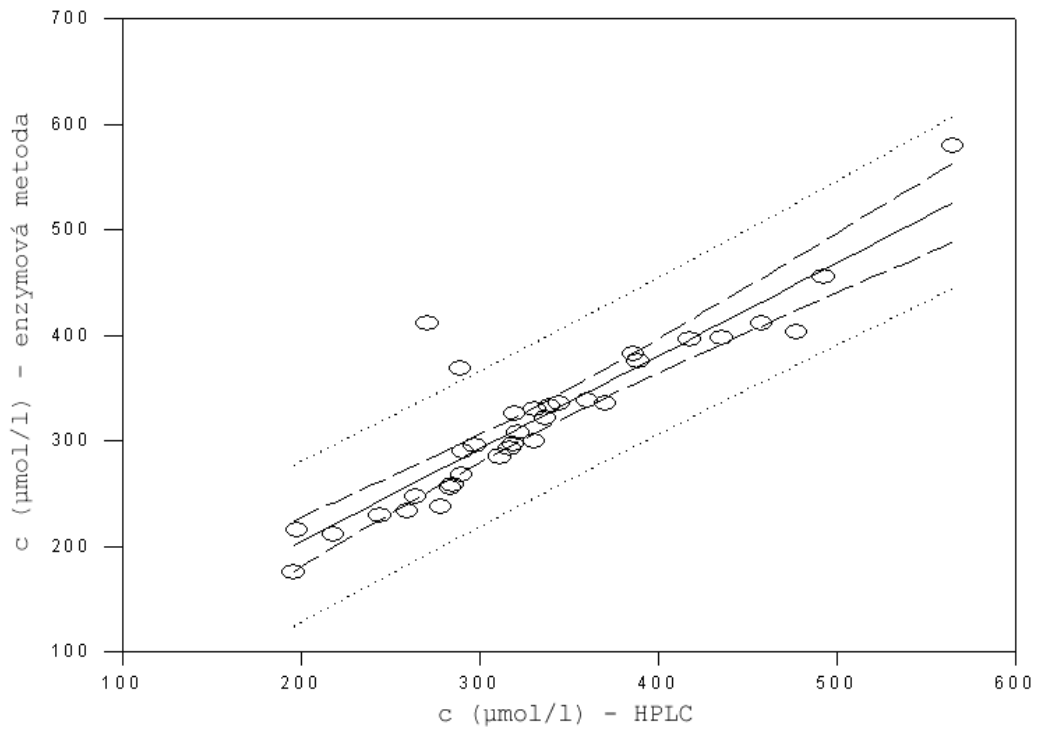
kde  $y$  je koncentrace kyseliny močové naměřená enzymovou metodou a  $x$  je koncentrace kyseliny močové naměřená metodou HPLC.

Hodnoty korelačních koeficientů ukazují na velmi silnou korelaci. Dosazením průměrných hodnot koncentrací kyseliny močové do rovnice lineární regrese bylo zjištěno, že enzymová metoda poskytuje hodnoty přibližně o 3,5 % nižší.

**Tab. 4-17:** *Lineární regresní analýza u souboru pacientů s diabetem*

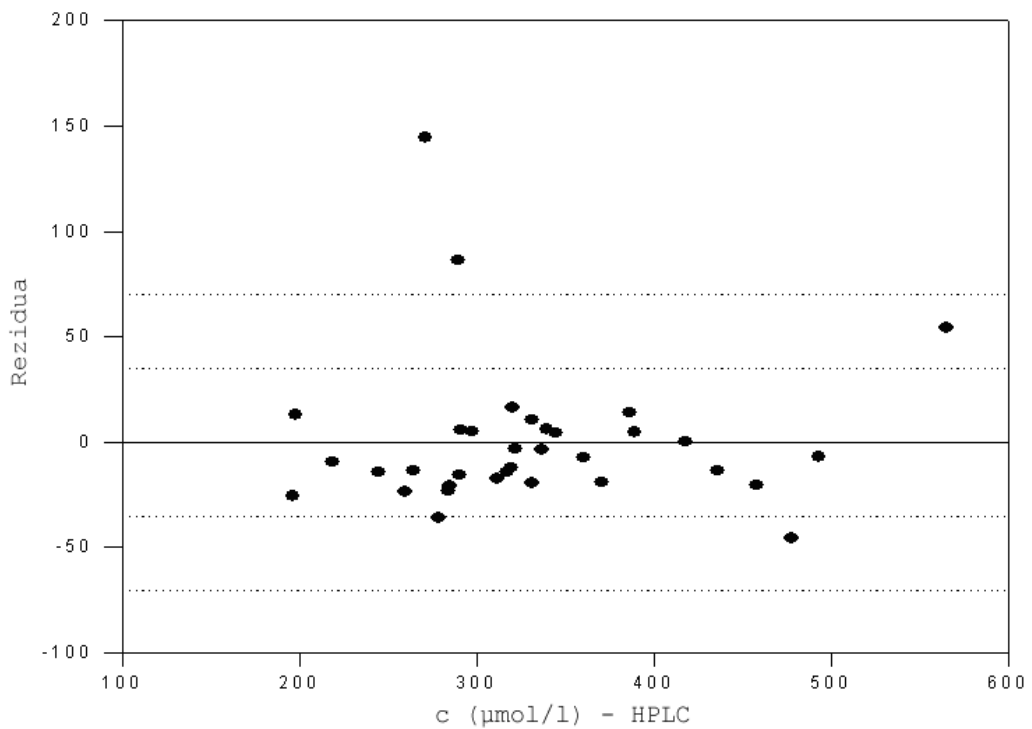
n	Regresní koeficient	Koeficient korelace	Koeficient determinace	Spearmanův korelační koeficient
34	0,881	0,903	0,815	0,861

Graf korelačního pole, regresní funkce



Obr. 4-11: Graf korelačního pole u pacientů s diabetem

Graf rozptýlení reziduí



Obr. 4-12: Graf rozptýlení reziduí u souboru pacientů s diabetem

#### 4.4.4. Soubor pacientů s onemocněním vylučovací soustavy

Naměřené hladiny kyseliny močové metodou HPLC se pohybovaly v rozmezí  $299 \pm 100 \mu\text{mol/l}$  (medián  $318,6 \mu\text{mol/l}$ ), enzymovou metodou v rozmezí  $285,7 \pm 100,1 \mu\text{mol/l}$  (medián  $305 \mu\text{mol/l}$ ).

Závislost obou metod lze vyjádřit následující rovnicí lineární regrese.

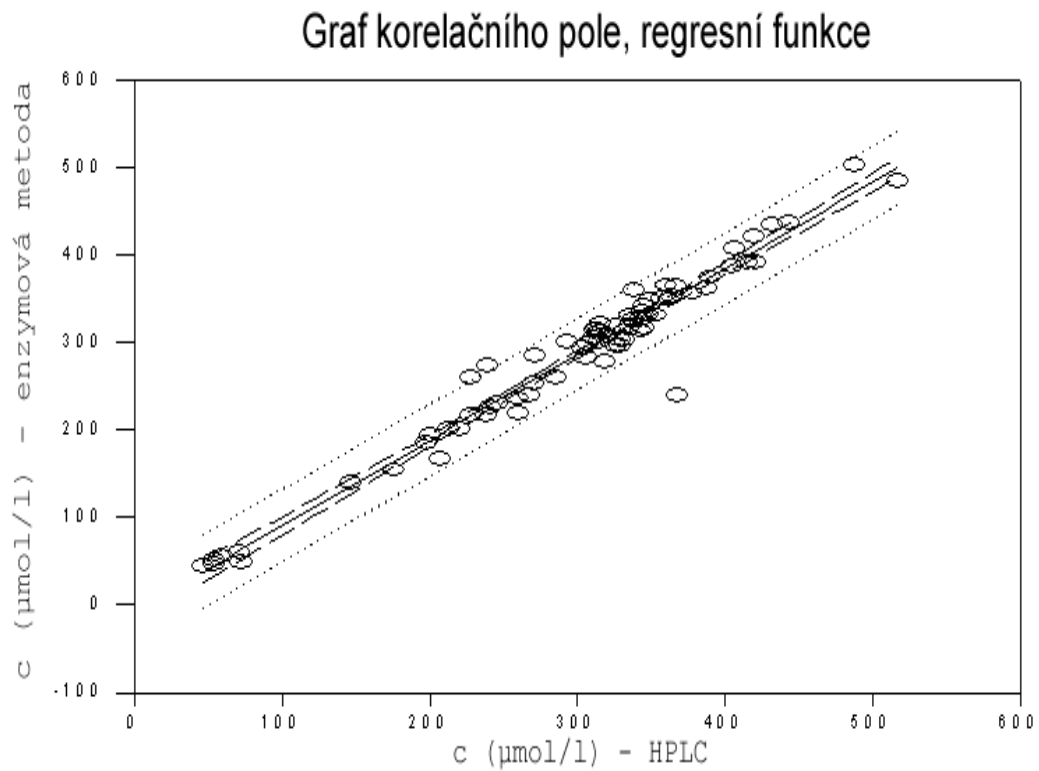
$$y = -7,558 + (0,981 * x),$$

kde  $y$  je koncentrace kyseliny močové naměřená enzymovou metodou a  $x$  je koncentrace kyseliny močové naměřená metodou HPLC.

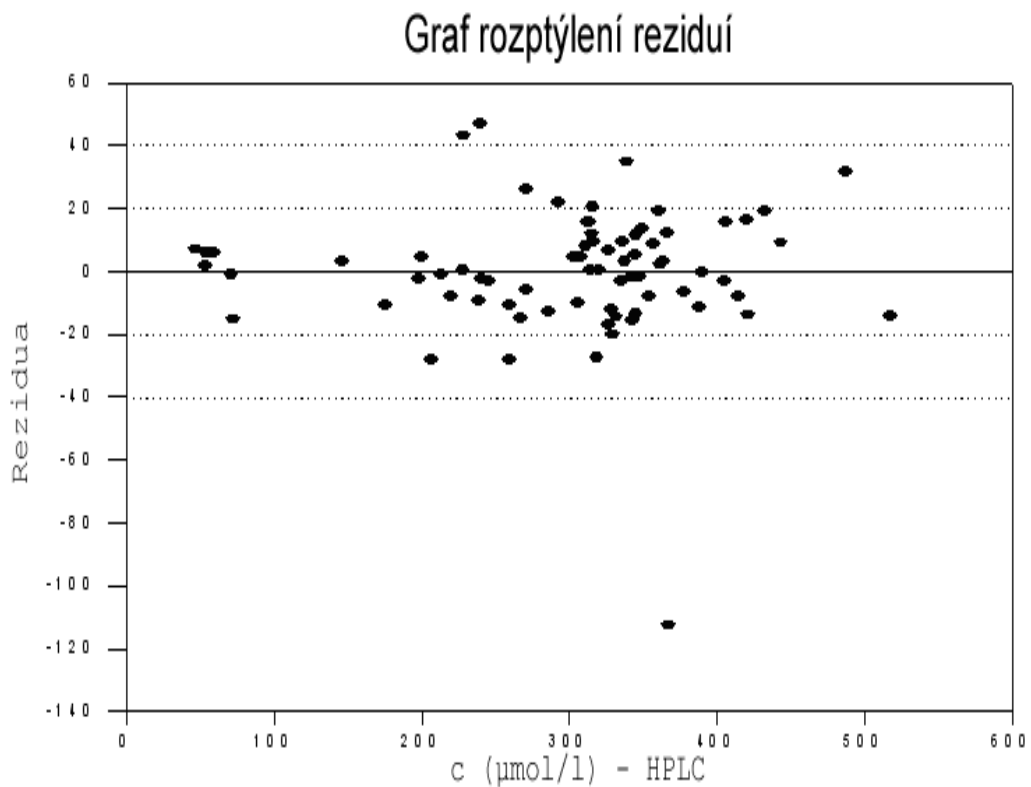
Hodnoty korelačních koeficientů ukazují na velmi silnou korelaci. Dosazením průměrných hodnot koncentrací kyseliny močové do rovnice lineární regrese bylo zjištěno, že enzymová metoda poskytuje hodnoty přibližně o 4,4 % nižší.

**Tab. 4-18:** *Lineární regresní analýza u souboru pacientů s onemocněním vylučovací soustavy*

n	Regresní koeficient	Koeficient korelace	Koeficient determinace	Spearmanův korelační koeficient
73	0,981	0,980	0,959	0,949



**Obr. 4-13:** Graf korelačního pole u souboru pacientů s onemocněním vylučovací soustavy



**Obr. 4-14:** Graf rozptýlení reziduí u souboru pacientů s onemocněním vylučovací soustavy

#### 4.4.5. Porovnání HPLC s enzymovou metodou u kontrolní skupiny pacientů

Naměřené hladiny kyseliny močové metodou HPLC se pohybovaly v rozmezí  $309,7 \pm 84,8 \mu\text{mol/l}$  (medián  $314,7 \mu\text{mol/l}$ ), enzymovou metodou v rozmezí  $302 \pm 85,9 \mu\text{mol/l}$  (medián  $296 \mu\text{mol/l}$ ).

Závislost obou metod lze vyjádřit následující rovnicí lineární regrese.

$$y = -5,052 + (0,991 * x),$$

kde  $y$  je koncentrace kyseliny močové naměřená enzymovou metodou a  $x$  je koncentrace kyseliny močové naměřená metodou HPLC.

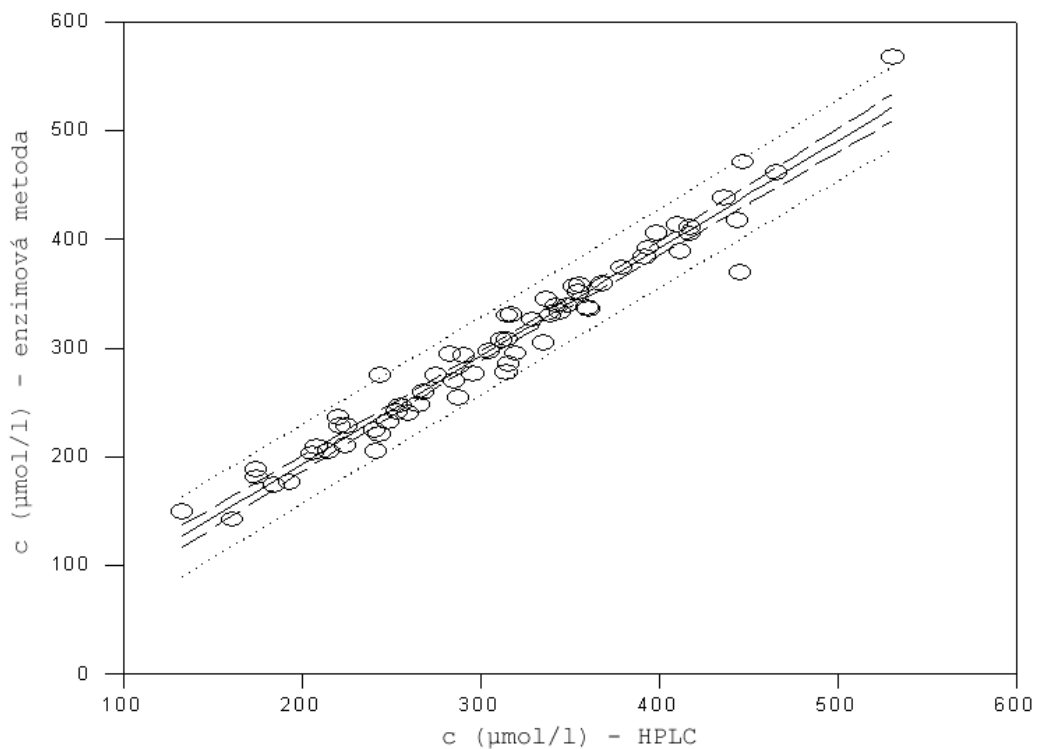
Hodnoty korelačních koeficientů ukazují na velmi silnou korelaci. Dosazením průměrných hodnot koncentrací kyseliny močové do rovnice lineární regrese bylo zjištěno, že enzymová metoda poskytuje hodnoty přibližně o 2,5 % nižší.

**Tab. 4-19:** Lineární regresní analýza u kontrolní skupiny

n	Regresní koeficient	Koeficient korelace	Koeficient determinace	Spearmanův korelační koeficient
64	0,991	0,979	0,958	0,982

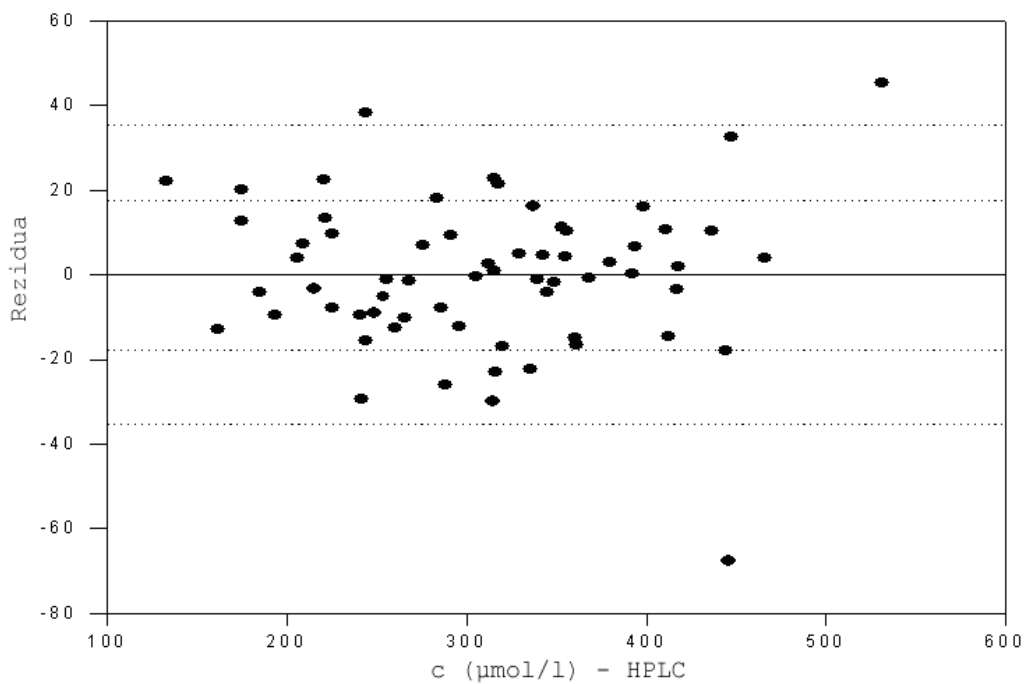


Graf korelačního pole, regresní funkce



Obr. 4-15: Graf korelačního pole u kontrolní skupiny

Graf rozptýlení reziduí



Obr. 4-16: Graf rozptýlení reziduí u kontrolní skupiny

## 5. DISKUZE

---

Kyselina močová, dusíkatá látka nebílkovinné povahy, vzniká odbouráváním purinových bází a v lidském organismu zastává důležitou ochrannou funkci. Kyselina močová tvoří až 65 % celkové antioxidační kapacity plazmy a má tak významnou úlohu při ochraně organismu proti působení volných radikálů. Na druhou stranu, hyperurikémie, zvýšená hladina kyseliny močové nad 420  $\mu\text{mol/l}$  u mužů a 350  $\mu\text{mol/l}$  u žen, se může podílet na vzniku mnoha onemocnění, jako je hypertenze, diabetes mellitus 2. typu, dna či nefropatie. Hyperurikémie byla diagnostikována u mnoha patologických stavů, od vrozených metabolických poruch až po obezitu.

Současné studie se zabývají otázkou, zda by bylo možné považovat zvýšenou hladinu kyseliny močové za rizikový faktor vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Kardiovaskulární onemocnění je na první příčce žebříčku příčin úmrtí v České republice. Především díky dobré informovanosti veřejnosti a propagaci zdravého životního stylu se počet úmrtí na kardiovaskulární onemocnění v posledních letech značně snížil. Aby tento trend pokračoval i nadále, je nutné včasné diagnostikovat rizikové faktory u pacientů. Poté stačí ve většině případů pouze upravit životní styl, případně určit správnou farmakologickou léčbu. Mezi nejznámější rizikové faktory vzniku kardiovaskulárního onemocnění patří hypertenze, hypercholesterolemie, diabetes, obezita a kouření. Zvýšená hladina kyseliny močové, hyperurikémie, tyto patologické stavy doprovází, proto je těžké jednoznačně určit, zda při vzniku kardiovaskulárního onemocnění hraje primární nebo sekundární roli. Rutinní laboratorní metody stanovení kyseliny močové jsou snadné, rychlé a relativně levné, a proto by kyselina močová představovala ideální marker pro screening rizika vzniku kardiovaskulárních onemocnění (23,25-27).

Cílem této práce bylo porovnání dvou metod stanovení kyseliny močové v séru u vybraných skupin pacientů. První metodou je metoda enzymová s měřením poklesu absorbance kyseliny močové při 293 nm, používaná na Oddělení klinické biochemie a diagnostiky Nemocnice Pardubice. Pro porovnání byla vybrána metoda HPLC v systému obrácených fází s UV detekcí, kolonou MAG1 4,6 x 150 mm, Biospher PSI 200 C18, 5  $\mu\text{m}$  a mobilní fází: 25 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – methanol (95:5, v/v),

pH =  $4,75 \pm 0,005$ . Kalibrační křivka byla lineární v celém rozsahu koncentrací použitých standardů kyseliny močové. Analytické parametry prezentované metody byly dostačující. Přesnost v sérii s CV: 2,61 %, přesnost mezi sériemi s CV: 4,22 %, správnost vyjádřená průměrnou výtěžností v rozmezí: 98,57 - 104,11 % (CV 2,39 %).

Soubory pacientů, u nichž byla kyselina močová v séru měřena oběma metodami, byly vybrány dle několika hledisek. Prvním hlediskem byla pravděpodobnost zvýšení látek, jako je glukosa, kyselina askorbová či bilirubin, které mohou interferovat s enzymovou metodou. Takto zvoleným souborem jsou pacienti s diabetem 2. typu. U tohoto onemocnění bylo také prokázáno, že se hyperurikémie může podílet na jeho vzniku a rozvoji (33,34). Dalším plánovaným souborem byli pacienti s onemocněním jater, u kterých se předpokládala zvýšená hladina bilirubinu v krvi. Tento soubor jsme ale museli z našeho výběru odstranit, protože nebyl k dispozici dostatečný počet vzorků. Nahradili jsme ho pacienty s onemocněním vylučovací soustavy. Druhým hlediskem pro výběr souboru pacientů byla již zmiňovaná kontroverzní otázka souvislosti hyperurikémie s kardiovaskulárním onemocněním. Třetím souborem tedy byli pacienti s kardiovaskulárním onemocněním jako je akutní infarkt myokardu, chronická ischemická nemoc, či ateroskleróza. Čtvrtým souborem byli pacienti s hypertenzí, která je považována za jeden z rizikových faktorů vzniku a rozvoje kardiovaskulárního onemocnění. Posledním, kontrolním souborem byli pacienti s ostatními diagnózami, kromě výše uvedených.

V jednotlivých souborech, rozdělených podle pohlaví, jsme sledovali závislost koncentrace kyseliny močové v séru na věku. Statisticky významná odlišnost byla nalezena pouze u obojího pohlaví kontrolní skupiny. Náš předpoklad, že u žen po menopauze (> 50 let) vzrůstá hladina kyseliny močové k hodnotám nacházeným u mužů a měla by tedy existovat závislost, nebyl potvrzen.

Pro porovnání souborů se specifikovanými diagnózami s kontrolní skupinou byl použit Studentův t-test. Statisticky významně vyšší hladina kyseliny močové byla nalezena pouze u žen a mužů s kardiovaskulárním onemocněním. Z tohoto zjištění by bylo možné v námi studovaném souboru považovat vztah kyseliny močové a kardiovaskulárního onemocnění za potvrzený. S úplnou jistotou to ale tvrdit nemůžeme, neboť skupina obsahovala různé diagnózy kardiovaskulárních onemocnění.

Střední hodnoty koncentrací kyseliny močové v séru pacientů s kardiovaskulárním onemocněním (muži 378,08  $\mu\text{mol/l}$ , ženy 339,26  $\mu\text{mol/l}$ ) nejsou mimo referenční rozmezí, a zvláště u žen je směrodatná odchylka velmi vysoká (105,56  $\mu\text{mol/l}$ ).

Lineární regresní analýzou byla nalezena silná korelace mezi naměřenými hodnotami pomocí enzymové a HPLC metody. Průměrné hodnoty koncentrací i mediány obou metod se u jednotlivých souborů prakticky shodují. U všech souborů bylo nalezeno mírné podhodnocování enzymatické metody oproti HPLC. Statisticky nejvýznamnější rozdíl mezi metodami byl nalezen u souboru pacientů s onemocněním vylučovací soustavy. Dosadíme-li do získané rovnice lineární regrese  $y = -7,558 + (0,981 * x)$  průměrné hodnoty koncentrací  $x = 299 \pm 100 \mu\text{mol/l}$  (medián 318,6  $\mu\text{mol/l}$ ),  $y = 285,7 \pm 100,1 \mu\text{mol/l}$  (medián 305  $\mu\text{mol/l}$ ), tak můžeme považovat hodnoty naměřené enzymovou metodou o přibližně 4,4 % nižší než hodnoty naměřené HPLC. Toto číslo je ale příliš nízké, a tak není možné jednoznačně prohlásit, která metoda je u pacientů s onemocněním vylučovací soustavy správnější. Vysokoučinná kapalinová chromatografie, referenční metoda pro stanovení hladiny kyseliny močové v séru, je oproti enzymatické metodě citlivější a selektivnější. Mezi její nevýhody patří náročnější příprava vzorků, delší doba analýzy a také vyšší náklady samotné analýzy a přístrojového vybavení. Vezmeme-li v úvahu všechny tyto aspekty spolu se zjištěním, že nebyla nalezena statisticky významná odlišnost mezi metodami, je enzymová metoda pro rutinní laboratorní použití naprosto vyhovující.

## **6. ZÁVĚR**

---

Statisticky významnou korelaci mezi hladinou kyseliny močové v séru a věkem jsme našli pouze u kontrolní skupiny pacientů.

Pacienti s kardiovaskulárním onemocněním měli statisticky významně vyšší hladiny kyseliny močové v séru oproti kontrolní skupině.

Metodou lineární regrese jsme pozorovali silnou korelaci mezi enzymatickou a HPLC metodou u všech zkoumaných skupin pacientů. Enzymatická metoda poskytovala nepatrně nižší hodnoty oproti metodě HPLC.

## 7. PŘÍLOHY

### Zápis ze schůze etické komise při Krajské nemocnici Pardubice

ze dne 4. 11. 2005 (15.00 h)

Přítomni: MUDr. Josef Hájek, CSc., doc. MUDr. Viktor Chrobok, CSc., MUDr. David Stuchlík,  
doc. MUDr. Edvard Ehler, CSc., Mgr. Jaroslav Procházka, Ing. Petr Pražák,  
JUDr. Josef Rokos, MUDr. Zuzana Grofová,

Omluven: MUDr. Vladimír Motyčka, MUDr. Tomáš Sýkora, MUDr. Marek Sychra,

Schůzi zahájil a řídil doc. MUDr. Josef Hájek, CSc., předseda etické komise (EK):

- Pharm.Dr. Jiří Skalický, primář OKBD KNP, předložil členům EK žádost o souhlas s použitím biologického materiálu ke stanovení referenčních mezí a ověření metodik u vybraných skupin pacientů. Tato výzkumná práce (je zaměřena na sledování vlivu volných radikálů na základní biochemické struktury, zejména lipidy a proteiny, s cílem zjistit význam jednotlivých stanovení pro běžnou diagnostiku) nemá komerční charakter. Výsledky jsou určeny pro potřeby OKBD a Univerzity Pardubice s cílem získání informací pro odbornou veřejnost včetně publikační činnosti.

**Členové EK předloženou žádost jednomyslně schválili.**

Předběžný termín příští schůze etické komise: **2. 12. 2005**

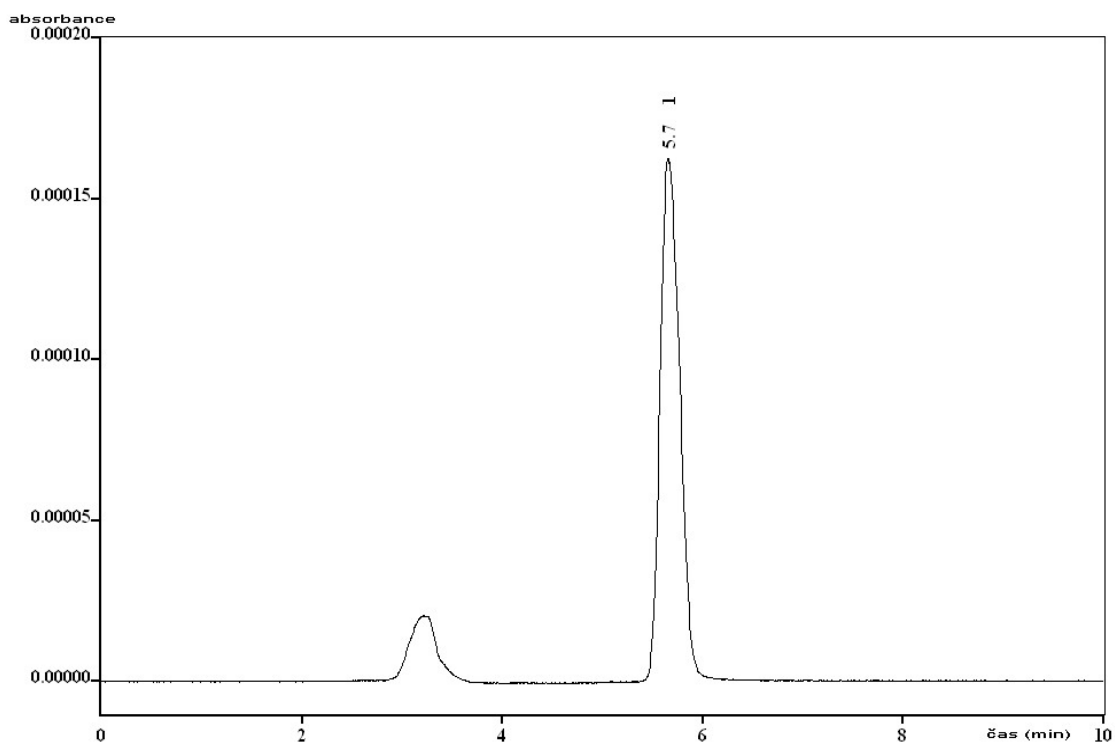
V Pardubicích 3. 11. 2005

Zapsala: Faiklová

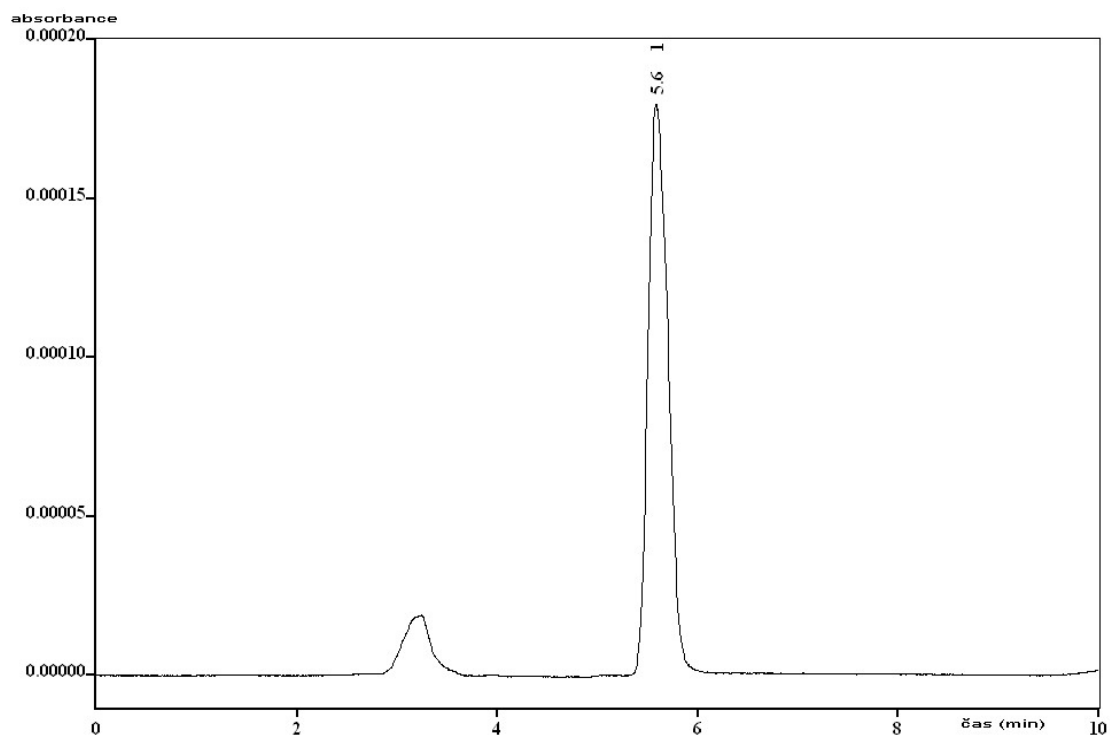
**Etická komise**  
při Krajské nemocnici Pardubice  
Kyjčavská 44  
532 03 Pardubice

MUDr. Josef Hájek, CSc.  
předseda Etické komise  
při Krajské nemocnici Pardubice

**Příloha 1:** Povolení etické komise Krajské nemocnice Pardubice pro provedení této studie.



**Příloha 2:** Chromatografický záznam standardu kyseliny močové o koncentraci 431,7  $\mu\text{mol/l}$ .



**Příloha 3:** Chromatografický záznam vzorku pacienta s kardiovaskulárním onemocněním o koncentraci 566,4  $\mu\text{mol/l}$ .

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

---

- (1) Becker B. F.: Towards the physiological function of uric acid. *Free Radical Biology & Medicine*, **14**, 1993, 615-631.
- (2) Schneiderka P. a kol.: Vybrané kapitoly z klinické biochemie. *Karolinum*, 1998, 82-89.
- (3) Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwel V. W.: Harperova biochemie. *Nakladatelství H + H*, 2001, 388 –390.
- (4) Mene P., Punzo G.: Uric acid: bystander or culprit in hypertension and progressive renal disease? *Journal of Hypertension*, **26**, 2008, 2085-2092
- (5) Pecháň I.: Kyselina močová ako významný antioxidantný metabolit. *Klinická biochemie a metabolismus*, **3**, 1995, 207-210.
- (6) Kutal V.: Je kyselina močová jen odpadním produktem? *Česká revmatologie*, **8**, 2000, 3-5
- (7) Štípek S.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. *Grada*, 2000.
- (8) Becker B. F., Reiholz N., Leipert B.: Role of uric acid as an endogenous radical scavenger and antioxidant. *Chest*, **100**, 1991, 176-181.
- (9) Sautin Y. Y., Johnson R. J.: Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **27**, 2008, 608-619.
- (10) Potáčková A.: Stanovení kyseliny močové v lidských erytrocytech pomocí HPLC/ECD. *Diplomová práce*, Univerzita Pardubice, 2004.
- (11) Edwards N.: The role of hyperuricemia and gout in kidney and cardiovascular disease. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, **75**, 2008, 13-16.
- (12) Stibůrková B., Šebesta I., Pospíšilová E., Šťastná S., Kumšta M. a kol.: Diferenciální diagnostika hyperurikémie u dědičných metabolických onemocnění, *Klinická biochemie a metabolismus*, **13**, 2005, 18-23.



- (13) Masopust J.: Klinická biochemie – požadování a hodnocení biochemických vyšetření. *Karolinum*, 1998, 230
- (14) Caufield M., Munroe P., O'Neill D., Witkowska K., Charchar F. a kol.: SLC2A9 is a high-capacity urate transporter in humans. *PLOS Medicine*, **5**, 2008, 1509-1522.
- (15) Hak A. E., Choi H. K.: Menopause, postmenopausal hormone use and serum uric acid levels in US women. *Arthritis Research & Therapy*, **10**, 2008, 1-7.
- (16) Bainbridge S. A., Roberts J. M.: Uric acid as a pathogenic factor in preeclampsia. *Placenta*, **22**, 2008, 67-72.
- (17) Jinnah H. A.: Lesch-Nyhan disease: from mechanism to model and back again. *Disease Models and Mechanisms*, **2**, 2009, 116-121.
- (18) Nyhan W. L.: Lesch-Nyhan disease. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **27**, 2008, 559-563.
- (19) Augoustides-Savopoulou P., Papachristou F., Fairbanks L., Dimitrakopoulos K., Marinaki A., Simmonds H.: Partial hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency as the unsuspected cause of renal disease spanning three generations: A cautionary tale. *Pediatrics*, **109**, 2002, 17-21.
- (20) García-Pavía P., Torres R., Rivero M., Ahmed M., García-Puig J., Becker M.: Phosphoribosylpyrophosphate synthetase overactivity as a cause of uric acid overproduction in a young woman. *Arthritis & Rheumatism*, **48**, 2003, 2036-2041.
- (21) Stibůrková B.: Diagnostické aspekty familiární juvenilní hyperurikemické nefropatie. *Časopis lékařů českých*, **7**, 2005, 466-471.
- (22) Stibůrková B., Pospíšilová E., Kmoch S., Šebesta I.: Analysis of excretion fraction of uric acid. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **25**, 2006, 1301-1304.

- (23) Koenig W., Meisinger Ch.: Uric acid, type 2 diabetes and cardiovascular diseases: fueling the common soil hypothesis? *Clinical Chemistry*, **54**, 231-233.
- (24) Webb R., Jeffries M., Sawalha A. H.: Uric acid directly promotes human T-cell activation. *The American Journal of the medical Sciences*, **337**, 2009, 23-27.
- (25) Yildiz A., Yilmaz R., Demirbag R., Gur M., Bas M., Erel O.: Association of serum uric acid level and coronary blood flow. *Coronary Artery Disease*, **8**, 2007, 607-613.
- (26) Tatli E., Aktoz M., Buyuklu M., Altun A.: The relationship between coronary artery disease and uric acid levels in young patient with acute myocardial infarction. *Cardiology Journal*, **15**, 2008, 21-25.
- (27) Hashemi M., Yavari M., Amiri N., Taheri H., Shaigannia I. a kol.: Uric acid: a risk factor for coronary atherosclerosis? *Cardiology Journal of South Africa*, **18**, 2007, 16-19.
- (28) Alimonda A. L., Núñez J., Núñez E., Husser O., Sanchis J. a kol.: Hyperuricemia in acute heart failure. More than a simple spectator? *European Journal of Internal Medicine*, **20**, 2009, 74-79.
- (29) Kosugi T., Nakagawa T., Kamath D., Johnson R. J.: Uric acid and hypertension. An age-related relationship? *Journal of Human Hypertension*, **23**, 2009, 75-76.
- (30) Feig D. I., Soletsky B., Johnson R. J.: Effect of allopurinol on blood pressure of adolescent with newly diagnosed essential hypertension. *The Journal of the American Medical Association*, **27**, 2008, 924-932.
- (31) Gersch Ch., Palii S., Kim K. M., Angerhofer A., Johnson R. J., Henderson G. N.: Inactivation of nitric oxide by uric acid. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **27**, 2008, 967-978.
- (32) Forman J., Choi H., Curhan G.: Uric acid and insulin sensitivity and risk of incident hypertension. *Archives of Internal Medicine*, **169**, 2009, 155-162.

- (33) Dehghan A., Hofmen A., Hoek M., Witteman J., Sijbrands E.: High serum uric acid as a novel risk factor for type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **31**, 2008, 361-362.
- (34) Nakagawaa T., Hu H., Zharikov S., Tuttle K., Short R.: A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, **290**, 2006, 625-631.
- (35) Levartovsky D., Lagziel A., Sperling O., Liberman U., Yaron M. a kol.: *XDH* gene mutation is the underlying cause of classical xanthinuria: A second report. *Kidney International*, **57**, 2000, 2215–2220.
- (36) Yeun J. Y., Hasbargen J. A.: Renal hypouricemia: prevention of exercise-induced acute renal failure and a review of the literature. *American Journal of Kidney Diseases*, **25**, 1995, 937-946.
- (37) Huang J., Liu Y., Hou H., You T.: Simultaneous electrochemical determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid using palladium nanoparticle-loaded carbon nanofibers modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, 2008, 632-637.
- (38) Wang X., Hagiwara T., Uchiyama S.: Immobilization of uricase within polystyrene using polymaleimido-styrene as a stabilizer and its application to uric acid sensor. *Analytica Chimica Acta*, **587**, 2007, 41-46.
- (39) Zhao S., Wang J., Ye F., Liu Y.: Determination of uric acid in human urine and serum by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. *Analytical Biochemistry*, **378**, 2008, 127-131.
- (40) Qiu J, Hu P., Liang R.: Separation and simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid on a dynamically modified poly(dimethylsiloxane) microchip. *Analytical Sciences*, **23**, 2007, 1409-1414.

- (41) Liang R., Gan G., Qiu J.: Surface modification of poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices and its application in simultaneous analysis of uric acid and ascorbic acid in human urine. *Journal of Separation Science*, **31**, 2008, 2860-2867.
- (42) Dai X., Fang X., Zhang C., Xu R., Xu B.: Determination of serum uric acid using high-performance liquid chromatography (HPLC)/isotope dilution mass spectrometry (ID-MS) as a candidate reference method. *Journal of Chromatography B*, **857**, 2007, 287-295.
- (43) Peden D. B., Hohman R., Brown M. E., Mason R. T., Berkebile C. a kol.: Uric acid is a major antioxidant in human nasal airway secretions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **87**, 1990, 7638-7642.
- (44) Štulík K. a kol.: Analytické separační metody, *Karolinum*, 2004, 148-153, 163-165.
- (45) Zuo Y., Wang C., Zhou J., Sachdeva A., Ruelos V.C.: Simultaneous determination of creatinine and uric acid in human urine by HPLC. *Analytical Sciences*, **24**, 2008, 1589-1592.
- (46) Kuračka L., Kalnovičová T., Líška B., Turčáni P.: HPLC method for measurement of purine nucleotide degradation products in cerebrospinal fluid. *Clinical Chemistry*, **42**, 1996, 756-760.
- (47) Rose R. C., Bode A. M.: Analysis of water-soluble antioxidants by HPLC with electrochemical detection. *Biochemical Journal*, **306**, 1995, 101-105.
- (48) Benzie I., Chung W., Tomlinson B.: Simultaneous measurement of allantoin and urate in plasma. *Clinical Chemistry*, **45**, 1999, 901-904.