



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

**Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra biomedicínské techniky**

Systém pro stanovení koncentrace kreatininu v moči

System for determining of creatinin concentration in urine

Bakalářská práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínský technik

Autor bakalářské práce: Dominika Jánská

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Jana Štěpanovská

Konzultant bakalářské práce: Ing. Roman Matějka

Kladno, Květen 2016

Katedra biomedicínské techniky

Akademický rok: 2015/2016

Z a d á n í b a k a l á ř s k é p r á c e

Student: **Dominika Jánská**
Obor: Biomedicínský technik
Téma: **Systém pro stanovení koncentrace kreatininu v moči**
Téma anglicky: System for determining of creatinin concentration in urine

Zásady pro vypracování:

V rámci práce vytvořte zařízení pro stanovení koncentrace kreatininu v moči. Zařízení musí být využitelné pro rychlé orientační stanovení během animálních experimentů. Navrhněte vhodný design zařízení, elektroniku a senzorku. Vytvořte také aplikaci pro ovládání a zobrazení měření. Dále navrhněte metodiku pro měření během experimentů. Zařízení ověřte s využitím lidské (vlastní) moči.

Seznam odborné literatury:

- [1] Stefan Silbernagel, Agamemnon Despopoulos, Atlas fyziologie člověka, ed. šesté vydání, Grada, 2004, ISBN 978-80-247-0630-6
- [2] Joseph D Bronzino, The Biomedical Engineering Handbook, ed. First edition, Boca Raton : CRC Press, 2000, ISBN 0-8493-0461-X
- [3] John G. Webster, The measurement, instrumentation and sensors handbook, ed. 1st, Boca Raton : CRC Press, 1999, ISBN 9780471676003

zadání platné do: 30.09.2017
Vedoucí: Ing. Jana Štěpanovská
Konzultant: Ing. Roman Matějka

.....
vedoucí katedry / pracoviště

.....
děkan

V Kladně dne 22.02.2016

Název bakalářské práce:

Systém pro stanovení koncentrace kreatininu v moči

Abstrakt:

Cílem mé bakalářské práce je sestavit systém pro stanovení koncentrace kreatininu v moči na operačním sále během animálních experimentů (především experimentů prováděných na prasatech).

V první části je popsána teorie o stanovení koncentrace kreatininu v moči. Je zde vysvětlen metabolismus kreatininu v těle, popsány vylučovací cesty zaměřené na prase domácí a následně výčet metod používaných pro stanovení této látky v moči. Poslední kapitola teoretické části jsou uvedeny příklady na trhu dostupných spektrofotometrů.

V rámci experimentální části BP byla navržena metodika pro stanovení koncentrace kreatininu během animálních experimentů. Dále bylo navrženo a sestaveno zařízení, sloužící jak k vytvoření kalibrační křivky koncentrace kreatininu, tak k samotnému měření koncentrace kreatininu v moči. Zařízení vysílá naměřená data do řídicí jednotky (PC) přes analogový kanál. Ke zpracování dat a řízení zařízení je také vytvořen software v programovacím jazyku LabVIEW.

Klíčová slova:

kreatinin, spektrofotometr, spektrofotometrie, Jaffého metoda, glomerulární filtrace

Bachelor's Thesis title:

System for determining of creatinin concentration in urine

Abstract:

The aim of my bachelor thesis is to assemble a system for specification of creatinine concentration in urine at operating room during animal experiments (especially experiments realized with pigs).

In the first part, there is the theoretical description of specification of creatinine concentration in urine. There is the explanation of creatinine metabolism in a body, the description of urinary system with focus on a domestic pig, followed by description of methods used for identification of creatinine in urine. In the last chapter of the theoretical part, there are presented examples of some market accessible spectrophotometers.

The experimental part is focused on the methodics designed for identification of creatinine concentration during animal experiments. Furthermore, there is designed and assembled a apparatus for creation of calibration curve of creatinine concentration and also for the measurement of creatinine concentration in urine. The apparatus sends measured data into a control unit (PC) through an analog channel. The software for data processing and apparatus control is also designed here in the programming language LabVIEW

Keywords:

creatinine, spectrophotometry, spectrophotometer, Jaffe method, glomerular filtration

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Janě Štěpanovské za její ochotu, rady a čas, který mi věnovala při vytváření. Děkuji také své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „*Systém pro stanovení koncentrace kreatininu v moči*“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k bakalářské práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V dne

.....

podpis

Obsah

Úvod.....	1
1 Anatomie a fyziologie vylučovací soustavy se zaměřením na prase domácí.....	5
1.1 Vylučovací cesty	6
1.2 Glomerulární filtrace	7
1.3 Řízení činnosti ledvin.....	8
1.4 Moč	8
2 Metody stanovení koncentrace kreatininu v moči	8
2.1 Stanovení kreatininu.....	8
2.2 Metody stanovení kreatininu.....	9
2.2.1 Jaffého metoda.....	9
2.2.2 Enzymové stanovení	9
2.2.3 Metody založené na stanovení amoniaku	10
2.2.4 Další metody stanovení.....	10
2.3 Srovnání metod	11
3 Spektrofotometrie	11
3.1 Dostupné spektrofotometry	11
4 Navržená metodika stanovení	14
4.1 Příprava před experimentem	14
4.2 Průběh experimentu	16
5 Návrh zařízení.....	18
5.1 Návrh zapojení	19
5.1.1 Zdroj světla:	19
5.1.2 Detektor záření.....	20
5.2 Konstrukce přístroje	21
6 Návrh aplikace	23

6.1	Ovládání měření	24
6.2	Kalibrace a měření	24
7	Výsledky	26
7.1	Ověření	26
7.2	Laboratorní úloha	29
8	Diskuze	31
	Závěr	34
	Seznam použité literatury	35
	Seznam symbolů a zkratk	37
	Seznam obrázků	38
	Seznam příloh	39

Úvod

Na diagnostice poruch funkce ledvin se v současné době významně podílí různá stanovení koncentrace kreatininu. Čím více se zvyšuje jeho koncentrace v krevním séru a naopak se snižuje obsah v moči, tím větší je poškození ledvin. Kreatinin se v moči začne snižovat, pokud se poškodí kolem 50 % nefronů. Díky tomu, že je kreatinin bezprahová látka a není významně ovlivňován dalšími faktory, se hodí jako indikátor funkce ledvin. Jeho stanovení je využíváno hlavně k výpočtu odhadu glomerulární filtrace pomocí kreatininové clearance, která bude rozebrána později. Kreatinin se může vyšetřovat rutinně, pokud nemá pacient konkrétní zdravotní problémy nebo pokud má akutní chorobu či podezření na dysfunkci ledvin. Pravidelně se stanovuje, pokud pacient trpí poruchou ledvin či jiným onemocněním, které může jejich funkci ovlivnit.[1,2,6,7]

Tvorba a vylučování kreatininu jsou závislé na množství kreatinu v krvi. Obecně se dá ovlivnění tohoto množství rozdělit do dvou kategorií - exogenní (strava) či endogenní (zátěž svalů). Závisí také na množství svalové hmoty a činnosti svalů, poškození kosterního svalstva, věku, pohlaví (ženy ho mají méně asi o 15% díky tomu že mají méně svalové hmoty) a funkční schopnosti ledvin ho vylučovat. Právě díky příjmu potravy a svalovému zatížení se množství kreatinu v těle a tedy i vylučovaného kreatininu přes den mění, ráno může být téměř o 50% nižší než večer.[1,2,3]

Běžně je poměr produkce a vylučování kreatininu konstantní. Při snížené glomerulární filtraci klesá vylučování kreatininu ledvinami a zvyšuje se jeho obsah v krvi (pokud je filtrace snižena pod 50%). Tento stav může značit selhávání ledvin.[1,3]

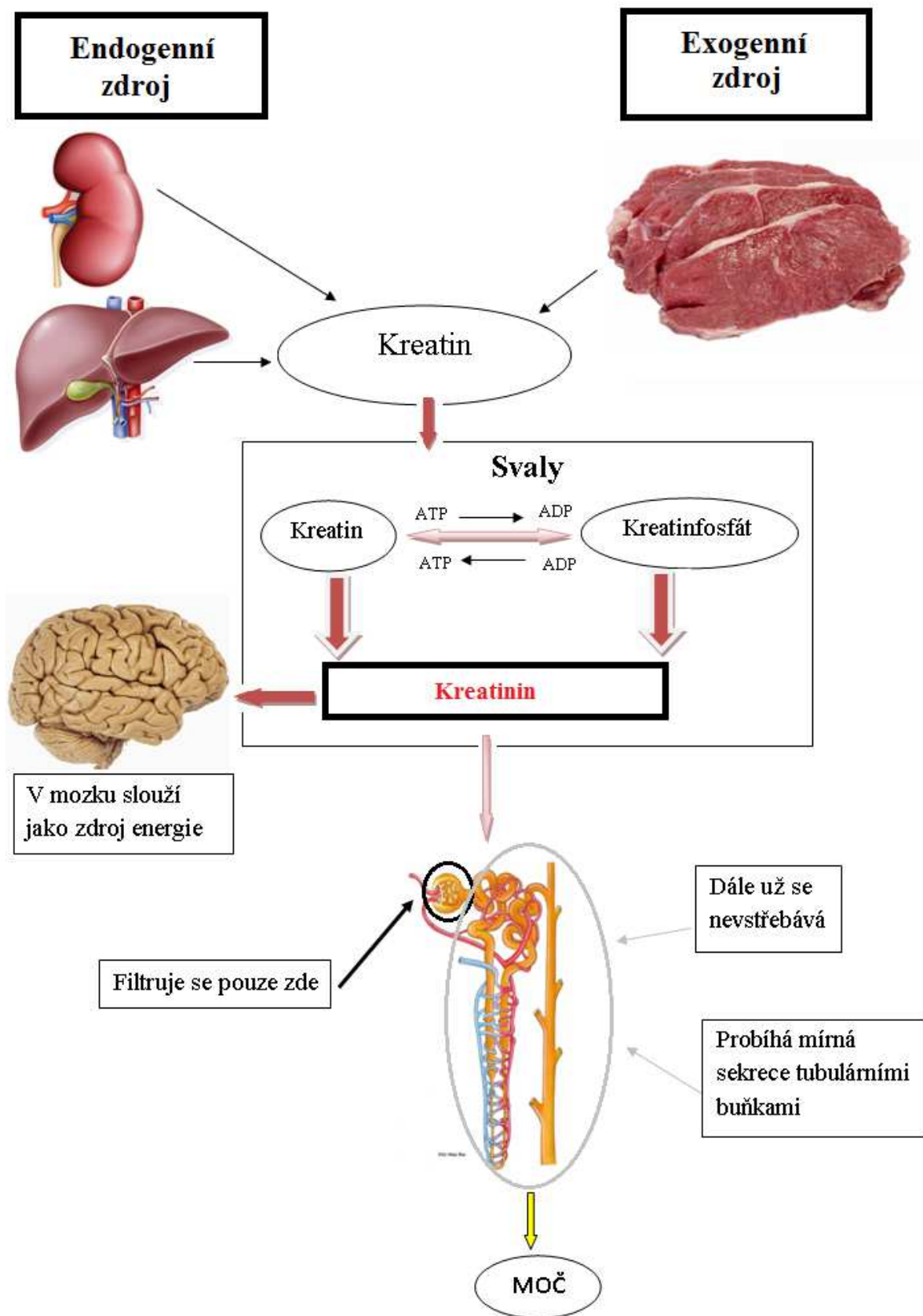
Renální regulace kreatininu je běžně zajištěna glomerulární filtrací. Nefron je však pro kreatinin nepropustný, kreatinin se tedy nemůže zpětně resorbovat, protože se jedná o bezprahovou látku.[3,4]

Do moči se dostane při průchodu krevní plazmy ledvinami z 90% glomerulární filtrací krve a 10 % zbývajících vyloučeného kreatininu je do moči sekretováno tubulárními buňkami ledvin.[1]

Ke zvýšení hodnot kreatininu v moči může dojít u těhotných žen, které mají zvýšenou glomerulární filtraci, dále u lidí, kteří mají svalovou atrofii - jsou nuceni ležet na lůžku - nebo jsou podvyživení.[1]

Fyziologická hodnota kreatininu v moči člověka je 5,7 - 14,7 mmol/l. [4]
U prasete domácího se fyziologická hodnota pohybuje v rozmezí 141 - 239 μ mol/l.

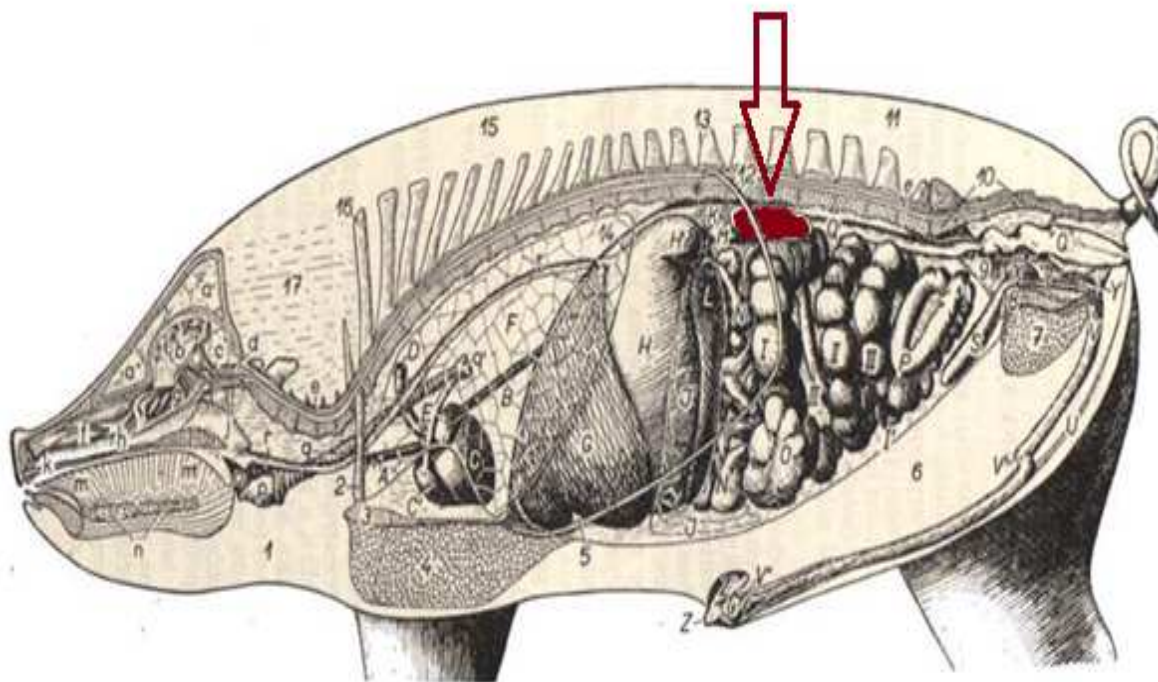
Na následujícím obrázku je znázorněn blokový diagram metabolismu kreatininu. Kreatin se do krve dostává buď masitou potravou nebo zátěží svalů. Ve svalu se vyskytuje ve fosforylované formě jako kreatinfosfát a probíhají zde mezi kreatinem a kreatinfosfátem vzájemné reakce buď za spotřeby ATP nebo přeměny na ADP. Z obou látek se neenzymaticky cyklizuje kreatinin, který se dále vyskytuje například v mozku (slouží tam jako zásobárna energie). Dále se kreatinin dostává krví do ledvin, kde se filtruje a jako odpadní látka dostává z těla močí ven.



Obrázek 1 Blokový diagram metabolismu kreatininu. Převzato a upraveno z [18, 19, 20, 21, 22]

1 Anatomie a fyziologie vylučovací soustavy se zaměřením na prase domácí

Nejdůležitějším vylučovacím orgánem člověka jsou ledviny. Jejich stavba a vývody jsou dost podobné těm prasečím, a proto se většina experimentů, týkající se vylučovací soustavy, právě na praseti provádí. Stejně jako u člověka jsou i u prasete ledviny nejdůležitějším vylučovacím orgánem, protože pomáhají udržovat stálost vnitřního prostředí (homeostázu). Pomocí nich může tělo regulovat pH, osmotické koncentrace tělních tekutin a další faktory, dále z těla odvádějí cizí a toxické látky. Ledviny jsou párový orgán, který je uložen u bederní páteře, každé zvíře je má ale trochu jinak uložené. Od dutiny břišní jsou odděleny pobřišnicí, chrání je dvě pouzdra (vazivové a tukové) a jejich povrchovou vrstvu tvoří kůra, pod kterou najdeme dřev.



Obrázek 2 Uložení ledvin u prasete. Převzato a upraveno z [16]

Na Obrázku 2 je červenou šipkou znázorněno uložení ledvin v těle prasete domácího.

1.1 Vylučovací cesty

Nefron je hlavní funkční i strukturální jednotka ledviny. Průměrný počet nefronů v ledvině prasete je asi 1 250 000. Nefron je tvořen ledvinovým tělískem a tubuly - močové kanálky. Ledvinové tělísko obsahuje glomerulus (komplex kapilárních kliček), ve kterém se přes stěny kapilár uskutečňuje glomerulární filtrace, a Bowmanovo pouzdro. Druhá část ledvinového tělíska je tvořena dvěma listy - parietální (přechází ve stěnu proximálního tubulu) a viscerální (kryje kapiláry). Do prostoru mezi tyto dva listy přitéká glomerulární filtrát, který dále pokračuje do proximálního tubulu, Henleovy kličky a distálního tubulu. Z distálního tubulu teče filtrát do sběracího kanálku a ze všech kanálků přitéká moč do ledvinové pánvičky, která je přímo napojena na močovod, což je trubice s hladkou svalovinou na stěně, která vede do močového měchýře. Močový měchýř je dutý a na stěně má tři vrstvy hladké svaloviny, právě díky tomu se dokáže velikostně přizpůsobit objemu moči. Nakonec je moč vyvedena z těla ven močovou trubicí.[10,11]

Prase má 66 mm velkou ledvinu, relativní tloušťku dřeně 1,6 mm a 3% nefronů s dlouhými kličkami. [10]

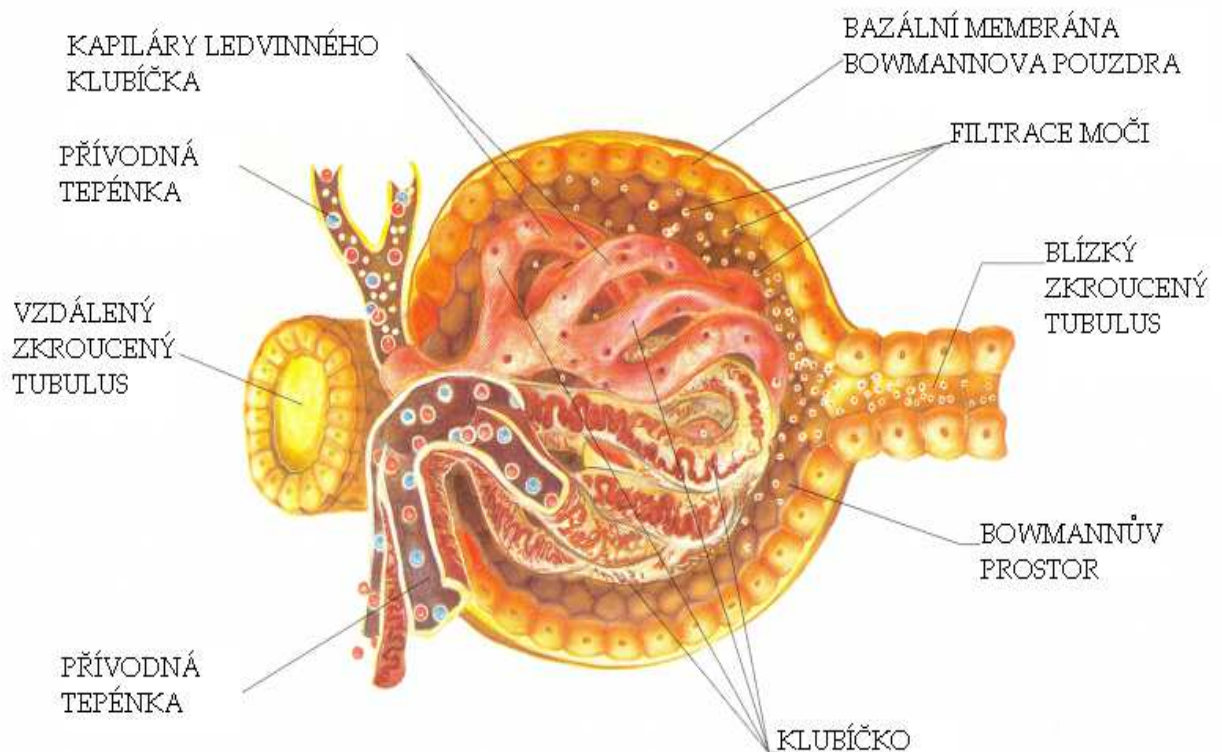


Obrázek 3 Ledviny prasete domácího. Převzato z [17]

Obrázek 3 znázorňuje ledvinu prasete domácího, na kterém je vidět kůra, dřevň a ledvinové kalichy.

1.2 Glomerulární filtrace

V glomerulárních kapilárách se filtruje krevní plazma a vzniká ultrafiltrát. Glomerulus můžeme považovat za vysokotlaký systém (vysoký hydrostatický tlak usnadňuje filtraci) a kapiláry za nízkotlaký (usnadňuje resorpci). Stěna Bowmanova pouzdra je pro bílkoviny téměř nepropustná, proto filtrát u zdravého jedince žádné bílkoviny neobsahuje. Tubulárním transportem se poté mění objem a složení, protože dochází k resorpci, při které se vstřebává voda a jiné látky zpět do krve, a sekreci, tedy vylučování přes tubulární buňky do filtrátu. V proximálním tubulu je společně s glukózou, aminokyselinami a močovinou vstřebáván také kreatinin, který používáme při měření clearance, díky které následně můžeme posoudit tyto funkce: průtok plazmy ledvinami, objem glomerulárního filtrátu a kapacitu tubulů.[11]



Obrázek 4 Glomerulus . Obrázek převzat z [15]

Na Obrázku 4 je znázorněn popis jednotlivých částí glomerulu.

1.3 Řízení činnosti ledvin

Řízení ledvin probíhá dvojím způsobem - hormonálně a nervově. V neurohypofýze se produkuje antidiuretický hormon (ADH), který podporuje vstřebávání vody v distálním tubulu a sběracím kanálku a také podporuje resorpci močoviny. Sekreci tohoto hormonu napomáhá bolest, emoce, stres a nikotin (omezení diurézy) a naopak menší uvolňování způsobuje chlad a alkohol. V prodloužené míše, mezimozku a mozkové kůře najdeme centra nervového řízení, která fungují prostřednictvím autonomních nervů, parasymptika a zejména sympatika (má účinek na vazokonstrikci cév a zvýšení resorpce sodíku a vody). [10,11]

1.4 Moč

Látky v těle přebytečné, odpadní nebo dokonce škodlivé se z těla vylučují močí. Její barva a pach jsou rozdílné dle druhu zvířete, jeho potravě a také třeba onemocnění. Na potravě také závisí pH moči, masožravci ji mají kyselou až neutrální (5,7 - 7), všežravci slabě kyselou a býložravci alkalickou (7,8 - 8,8). [11]

2 Metody stanovení koncentrace kreatininu v moči

2.1 Stanovení kreatininu

Pro stanovení funkce ledvin je potřeba nejen stanovení sérové koncentrace, ale využívají se především výpočty glomerulární filtrace (např. **clearance** kreatininu). Clearance je způsobilost orgánu očistovat krevní plazmu. Očišťovací schopnost je definována jako objem plazmy zbavený dané látky v určitém časovém intervalu.[1]

Funkce ledvin se dá posuzovat pomocí dvou látek - inulín (využíván spíše pro výzkum) a kreatinin (využívaný v praxi).[1]

Clearance kreatininu se počítá na podkladě měření močového kreatininu ve sledovaném období a hodnotě sérového kreatininu. Výpočet se provádí podle vzorce [3]

$$\text{clearance kreatininu} = \text{kreatinin moč} \times \text{diuréza(ml/s)} / \text{kreatinin sérum} \quad (1)$$

Cockroft a Gault navrhli více osvědčený vzorec [5] :

$$\text{clearance kreatininu} = (140 - \text{věk}) \times \text{tělesná hmotnost} / 49 \times \text{kreatinin v séru} \quad (2)$$

kreatininová clearance má jednotku ml/s, věk roky, tělesná hmotnost kg. U žen se takto vypočítaná hodnota násobí konstantou 0,85.[5]

Hodnoty takto vypočítané korelují s hodnotami clearance kreatininu změřenými na podkladě přesného sběru moči. [1]

2.2 Metody stanovení kreatininu

2.2.1 Jaffého metoda

Tato metoda využívá reakce látek s aktivní methylenovou nebo methinovou skupinou s aromatickými nitrolátkami. V alkalickém prostředí reaguje bezbarvý kreatinin s kyselinou pikrovou, z této reakce vzniká produkt, který má červeno-oranžovou barvu a jeho množství je přímo-úměrné množství výchozího kreatininu. Díky tomu, že je látka barevná se může stanovit pomocí spektrofotometrie, jejíž princip je založen na interakci elektromagnetického záření s analyzovaným roztokem.

Záření je látkou pohlcováno a detektor přijímá zbylé, látkou neabsorbované záření. Schopnost látky pohlcovat záření se nazývá absorbance. Intenzita výstupního záření je po průchodu nižší než na začátku a čím více je roztok koncentrován, tím více pohltí záření.

Koncentrace analyzované látky je zjišťována pomocí kalibrační křivky, tedy grafickým znázorněním závislosti absorbance roztoku na koncentraci v něm přítomné stanovované látky. Sestaví se tak, že se změří absorbance roztoků o známých koncentracích a započítá se také slepý vzorek. Slepý vzorek obsahuje všechna činidla až na zkoumanou látku, jeho změřená hodnota se musí následně od ostatních hodnot odečíst, tím je získána pouze hodnota analyzované látky. Poté se spustí kolmice v bodě, kde hodnota absorbance odpovídá bodu na křivce a zjistí se hledaná koncentrace látky ve vzorku. [1,4]

2.2.2 Enzymové stanovení

Tyto metody stanovení využívají účinku enzymu kreatininázy na kreatinin, ze kterého vzniká kreatin. Existují dva principy stanovení [2]:

1. Kreatinin je za přítomnosti kreatininázy přeměněn na kreatin, ten se dále mění na močovinu a sarkosin. Při reakci katalyzované sarkosinoxidázou se přemění sarkosin na glycin, formaldehyd a peroxid vodíku. Trinderovou reakcí se stanovuje peroxid, který reaguje s 4-aminoantipyrinem a fenolem za přítomnosti peroxidázy a vzniká chinonmonoiminové barvivo, stanovované spektrofotometricky. Hodnota absorbovaného záření je úměrná koncentraci kreatininu v analyzovaném vzorku.[2]

kreatinináza- kreatináza –sarkosinoxidáza –peroxidáza

2. Ve druhém případě se opět přemění kreatinin za přítomnosti enzymu kreatininázy na kreatin. Za předpokladu, že je v přítomnosti ATP, se kreatin přemění na kreatinfosfát a ADP. Toto ADP se dále díky pyruvátkináze a fosfoenolpyruvátu mění na pyruvát a ATP. A v poslední části oxiduje NADH na NAD v přítomnosti laktátdehydrogenázy NAD, za současné redukce vznikajícího pyruvátu na laktát. Úbytek NADH způsobí pokles schopnosti absorpce záření a tento pokles je úměrný koncentraci kreatininu v analyzovaném vzorku. [2]

kreatinináza- kreatinkináza- pyruvátkináza- laktátdehydrogenáza

2.2.3 Metody založené na stanovení amoniaku

Z kreatininu se díky enzymu kreatininminohydrolázy stává amoniak a 1-ethyl-dantoin, dále se kataliticky pomocí glutamátdehydrogenázy stanoví amonné ionty, ty reagují s 2-oxoglutarátem a NAD(P)H. Vzniká glutamát a NAD(P)+. Fotometrickou metodou se měří pokles absorbance NAD(P)H (využívá se záření 340 nm) a tento pokles je úměrný koncentraci kreatininu v původním vzorku. Existuje také metoda využívající indikátor a díky změně barvy se může kreatinin stanovit fotometricky.[2]

2.2.4 Další metody stanovení

Další metodou může být stanovení pomocí HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie angl. high-performance liquid chromatography), tato technika slouží k separaci a stanovení jednotlivých složek ve vzorku, dále také třeba k jejich izolaci. Je sice velice specifická, ale pro běžné použití ne zcela vhodná. Pokud je pacient upoután

na lůžku, využívají se nejčastěji dvě metody - kapilární elektroforéza nebo elektrochemické metody (tedy biosenzory). [1,2]

2.3 Srovnání metod

Jaffého metoda je stále více používána než ostatní zejména kvůli ceně, protože stanovení kreatininu Jaffého metodou stojí kolem 0,56 korun, zatímco stanovení enzymové až kolem 8,72 korun (dle výrobce Roche). Druhý výrobce (Abbott) udává podobné částky - Jaffého metoda vyjde asi na 0,53 korun a enzymové kolem 5,78- 6,65 (záleží na velikosti balení). Další výhodou je poměrně snadné provedení s možností opakování. [8,9]

3 Spektrofotometrie

V práci je využito spektrofotometrického měření, protože ve zvolené metodice, založené na Jaffého reakci kreatininu s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí, vzniká červeno-oranžový produkt.

3.1 Dostupné spektrofotometry

Na českém trhu existuje široká škála běžně dostupných spektrofotometrů, od nejjednodušších, nastavených na jednu vlnovou délku, po multifunkční přístroje s širokým využitím v praxi. Existují nejen stolní verze přístrojů, ale také přenosné, které jsou pro experimenty vhodnější, protože se s nimi snadněji manipuluje a není problém je přenést přímo na místo experimentu. Zde jsou uvedené příklady právě přenosných přístrojů od těch nejvýkonnějších:

- WTW pHotoFlex Turb se dá využít jako fotometr, turbidimetr i pH-metr. Jeho uplatnění je velice široké v různých odvětvích průmyslu či zemědělství. Můžeme na něm nastavit 6 různých vlnových délek, je v něm je uloženo více než 130 různých metod a lze do něj vložit i 100 vlastních. Má vestavěnou IR diodu, umožňující měření podle mezinárodních standardů. Jeho cena je 74 556,-Kč.



Obrázek 5 Přenosný fotometr WTW pPhotoFlex Turb. Obrázek převzat z [12]

- SpectroVis Plus je přenosný spektrofotometr a fluorimetr sloužící k měření absorbance, transmittance, fluorescence a emisního spektra. Pro měření fluorescence má dva excitační zdroje (405 nm a 500 nm). Jeho rozsah se pohybuje mezi 380 nm až 950 nm.

K dostání je za 24 984,- Kč.



Obrázek 6 Spektrofotometr SpektroVis Plus. Obrázek převzat z [13]

- Posledním příkladem je mikroprocesorem řízený fotometr Eutech C 103, který používá LED diodu o jedné vlnové délce (525 nm) jako zdroj záření. Používá se pro stanovení jedné látky (konkrétně oxidu chloričitého) ve vodných roztocích. Je k dostání za 12 656 Kč.



Obrázek 7 Eutech C 113. Obrázek převzat z [14]

Cílem této bakalářské práce bylo vytvoření zařízení pro rychlé orientační stanovení koncentrace kreatininu v moči během animálních experimentů. Výše vypsané příklady komerčně dostupných přístrojů jsou sice přenosné a při experimentu rychle použitelné, ale nejsou určeny přesně pro tyto účely a jejich cena je příliš vysoká.

4 Navržená metodika stanovení

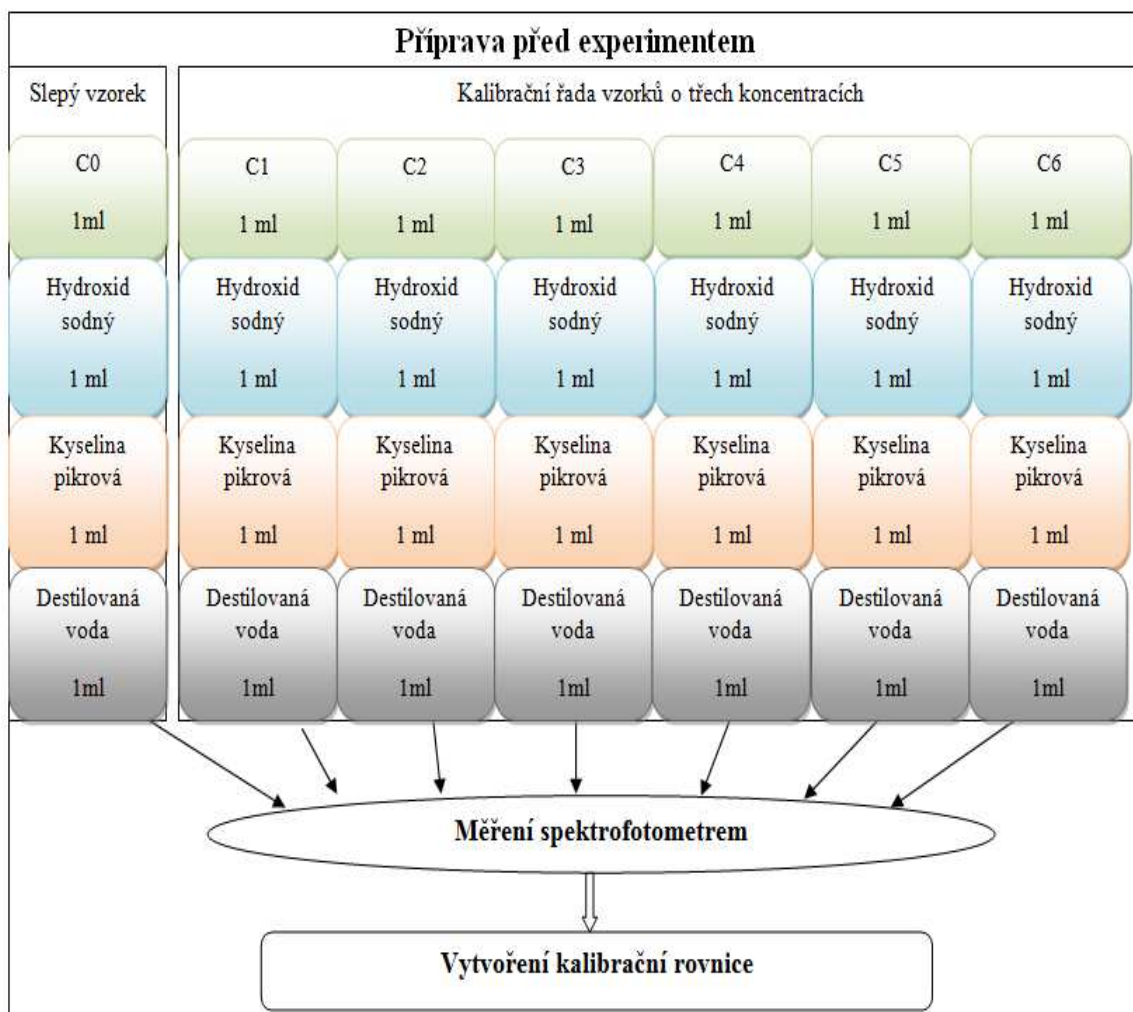
Pro metodiku stanovení byla zvolena Jaffého metoda. Tato metoda je na přípravu a provedení jednodušší a také je ekonomičtější, protože ostatní metody vyžadují vyšší náklady na provedení.

4.1 Příprava před experimentem

Jaffého metoda vyžaduje na začátku vytvoření kalibrační řady. Vytvoří se řada standardních roztoků o šesti koncentracích, které odpovídají fyziologické hodnotě (pro prase 141 - 239 $\mu\text{mol/l}$ a pro člověka 5,7 - 14,7 mmol/l). Do označených zkumavek se napipetuje vždy 1 ml daného roztoku a k němu 1 ml destilované vody, 1 ml kyseliny pikrové a 1 ml hydroxidu. Vytváří se také slepý vzorek s nulovou hodnotou koncentrace kreatininu. Slepý vzorek obsahuje stejné množství všech přidaných činidel jako obsahuje analyzovaný vzorek, avšak s výjimkou vlastní stanovované látky - tu nahradíme destilovanou vodou. Tento vzorek se vytváří, protože ostatní obsažené látky mohou také pohlcovat záření a hodnota by mohla být zkreslená.

Kalibrační řada se proměří přístrojem a v počítači se sestaví kalibrační rovnice závislosti naměřeného napětí na koncentraci v něm přítomné stanovované látky (kreatininu).

Následující Obrázek 8 znázorňuje blokové schéma přípravy před experimentem.



Obrázek 8 Blokové schéma metodiky přípravy před experimentem

Na dalším Obrázku 9 je výřez uživatelského prostředí v navrženém softwaru, tato část slouží pro naměření slepého vzorku a kalibrační řady. Hodnota slepého vzorku se pomocí softwaru odečítá automaticky.

Měření kalibrační řady		
Měření slepeho vzorku <input type="button" value="Měř"/>	Slepy vzorek 0	Koncentrace slepeho vzorku 0
Měření 1 <input type="button" value="Měř"/>	První vzorek 0	Koncentrace 1 (mmol/l) 0
Měření 2 <input type="button" value="Měř"/>	Druhý vzorek 0	Koncentrace 2 (mmol/l) 0
Měření 3 <input type="button" value="Měř"/>	Třetí vzorek 0	Koncentrace 3 (mmol/l) 0
Měření 4 <input type="button" value="Měř"/>	Čtvrtý vzorek 0	Koncentrace 4 (mmol/l) 0
Měření 5 <input type="button" value="Měř"/>	Pátý vzorek 0	Koncentrace 5 (mmol/l) 0
Měření 6 <input type="button" value="Měř"/>	Šestý vzorek 0	Koncentrace 6 (mmol/l) 0

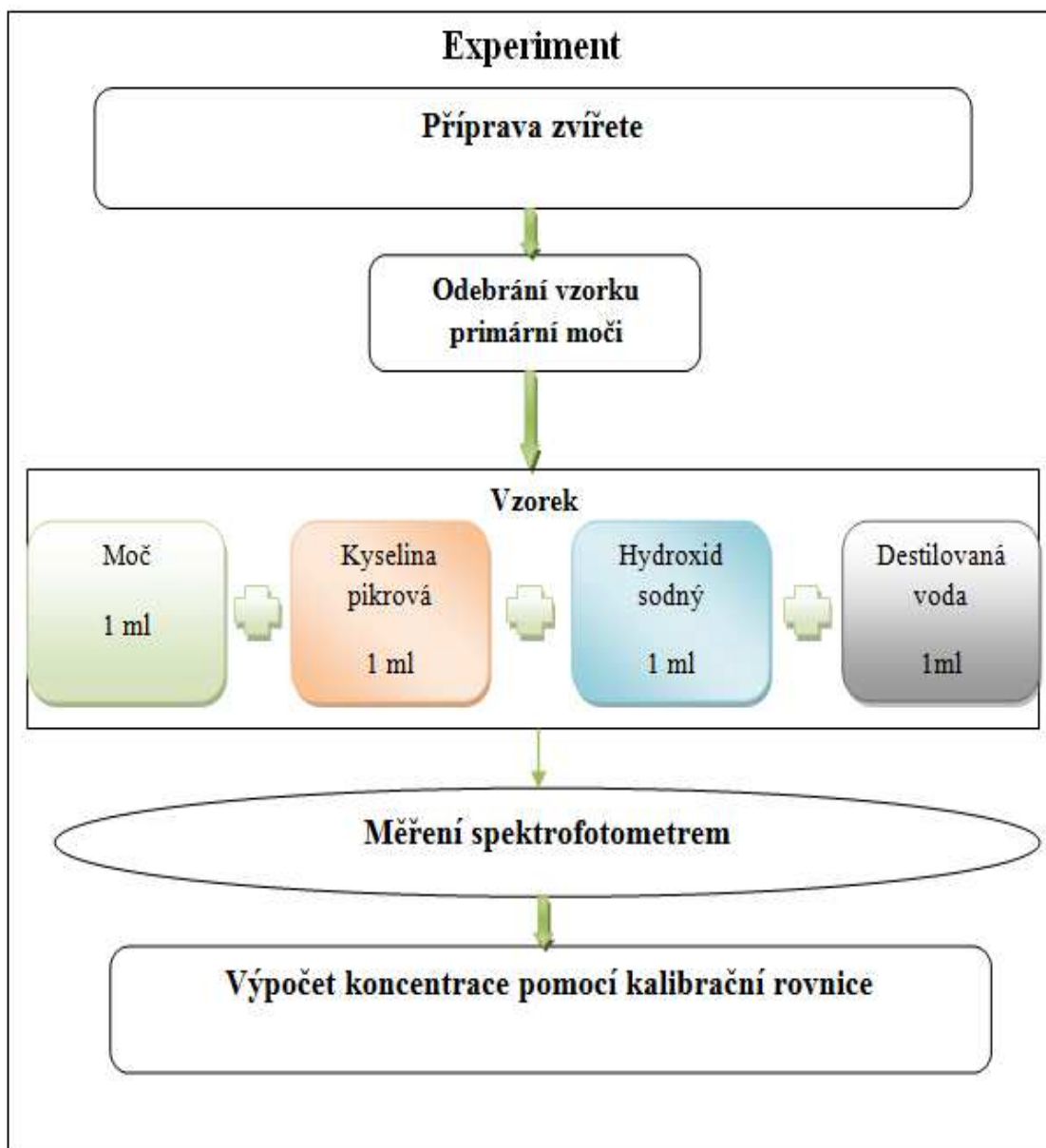
Obrázek 9 Kalibrační řada navrženého softwaru

4.2 Průběh experimentu

Přímo při provádění experimentu jsou používány předpřipravené uzavíratelné zkumavky s odměřeným 1 ml kyseliny pikrové a 1 ml hydroxidu sodného, které se mohou na místě použít bez dalšího odměřování.

Průběh samotného animálního experimentu na praseti domácím je následující: zvíře se připraví a uspí. Obnaží se ledvina společně s přívodními i odvodními cévami, přívodní cévy se zaklempují (simuluje se teplá ischemie). Poté se periodicky odebírají vzorky primární moči. Dále se ledvina odklempuje, vyjme se z těla a provede se histologický rozbor. Do 1 ml odebraného vzorku této moči se přilijí připravené

zkumavky kyseliny pikrové a hydroxidu sodného. Následně se může rovnou měřit napětí pomocí zařízení. Počítač díky předem připravené kalibrační rovnici vypočítá hodnotu koncentrace kreatininu ve vzorku.

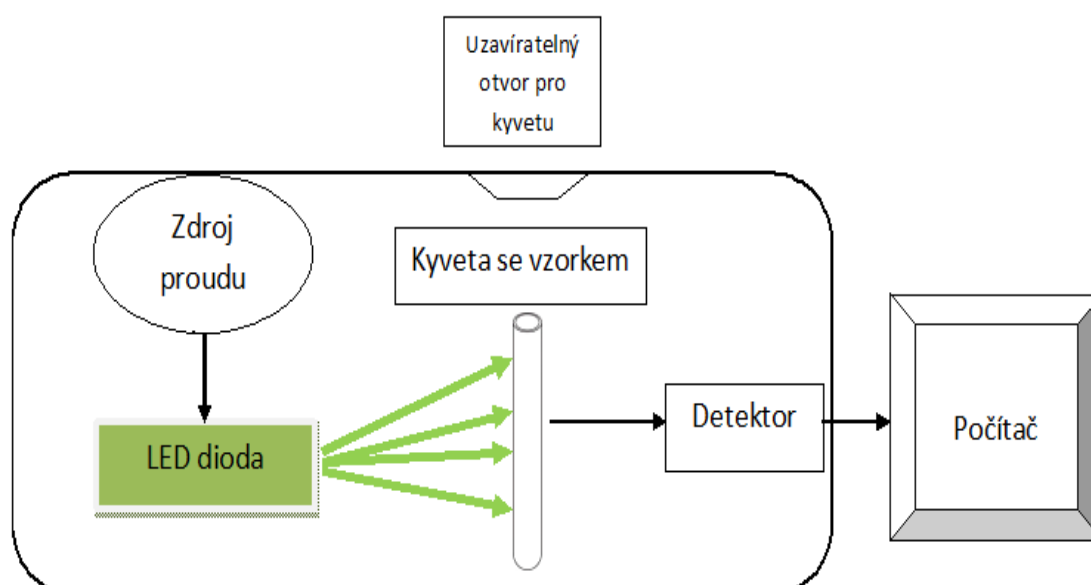


Obrázek 10 Blokové schéma metodiky při experimentu

Na Obrázku 10 je znázorněno blokové schéma navržené metodiky při experimentu pro přehlednější znázornění.

5 Návrh zařízení

Pro stanovení koncentrace kreatininu v projektu je navržen jednoduchý spektrofotometr s LED diodou o jedné vlnové délce. Dříve zmíněný fotometr Eutech C 103 využívá jako zdroj záření také LED diodu, která svítí jen o jedné vlnové délce 525 nm. Tento přístroj se používá ke stanovení oxidu chloričitého v roztoku, dal by se nejspíš použít i pro stanovení koncentrace kreatininu v moči, i když pro tyto účely byla na základě již vyzkoušené laboratorní práce stanovena vhodná vlnová délka LED diody přesněji na 515 nm. Tento přístroj je ale pro daný účel zbytečně drahý.



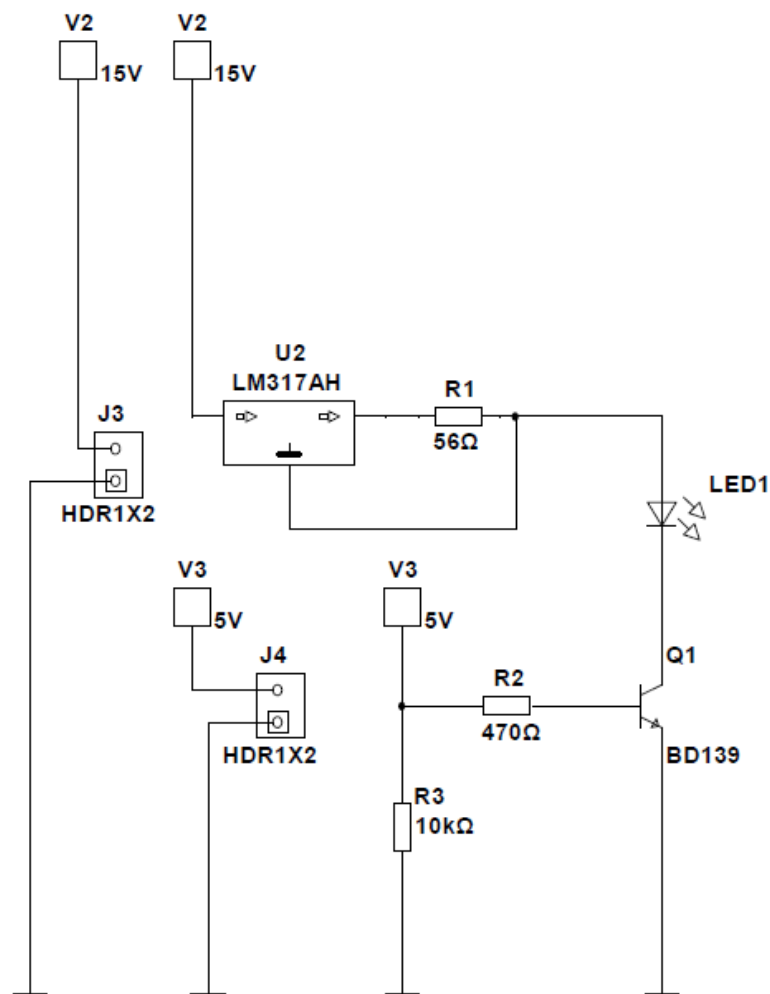
Obrázek 11 Blokové schéma zařízení

Na Obrázku 11 je zobrazeno vytvořené blokové schéma navrženého zařízení. Jako zdroj záření je použita LED dioda napájená zdrojem proudu. LED dioda ozařuje kyvetu se vzorkem. Za kyvetou je umístěn detektor procházejícího záření, který je následně připojen k počítači. Přístroj musí být shora uzavíratelný, aby se zamezilo průniku nežádoucího světla.

5.1 Návrh zapojení

5.1.1 Zdroj světla:

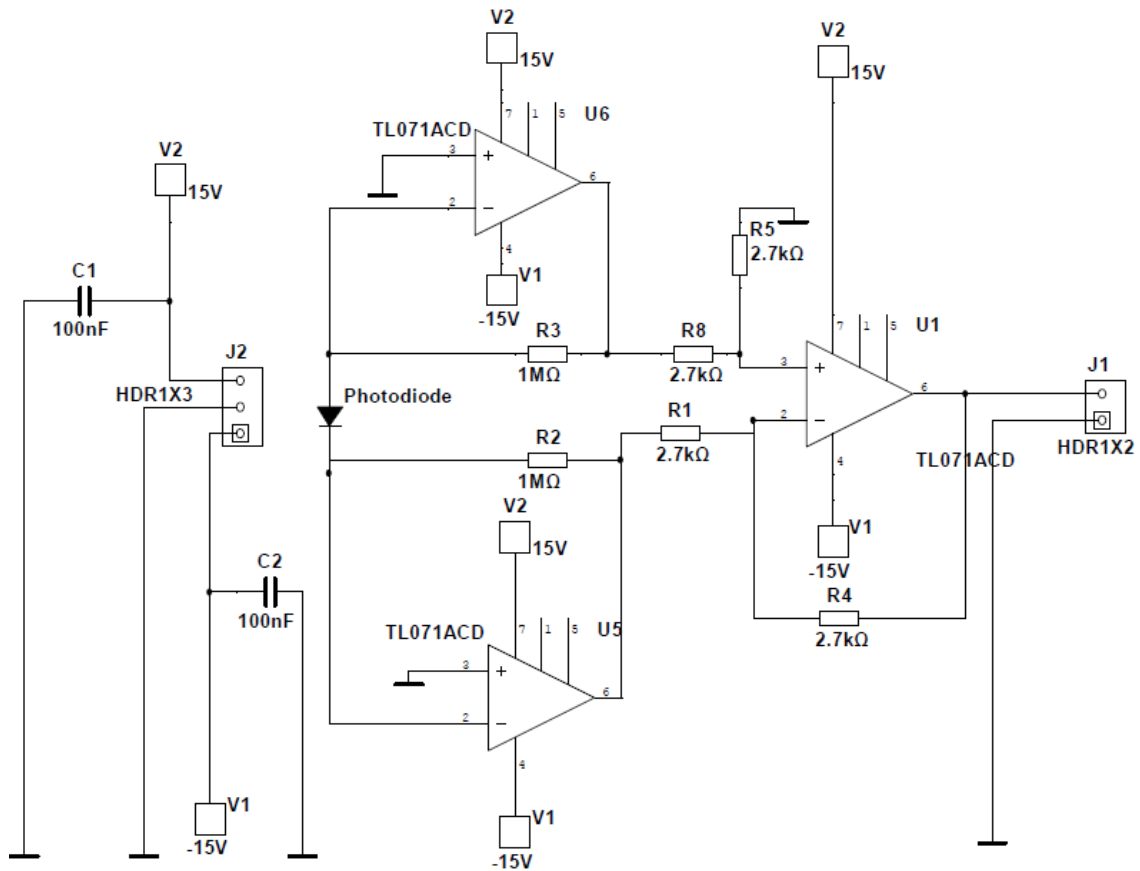
Zapojení přístroje se skládá ze dvou částí – zdroje a detektoru monochromatického světla. Přístroj je řízen pomocí měřicí karty PCI-6221 od National Instruments (USA, TX). Zapojení první části vypadá následovně: zdroj napětí 15 V napájí obvod LM317, který slouží jako zdroj konstantního proudu. Velikost odporu byla určena ze vzorce uvedeného v datasheetu součástky tak, aby výsledný proud byl 20 mA (takový proud potřebuje LED dioda Hebei 530XG2C na maximální svit). Rozsvícení LED diody je řízeno tranzistorem BD139, který má digitální napájení 5V přivedeno na bázi. Tranzistor v tomto zapojení využíváme jako spínač, tedy pokud zapneme napájení - otevře se (sepne) a LED dioda se rozsvítí, pokud bude napájení vypnuté a tranzistor zůstane uzavřen (rozepne) - LED dioda zůstane zhasnutá.



Obrázek 12 Schéma zapojení vysílače

5.1.2 Detektor záření

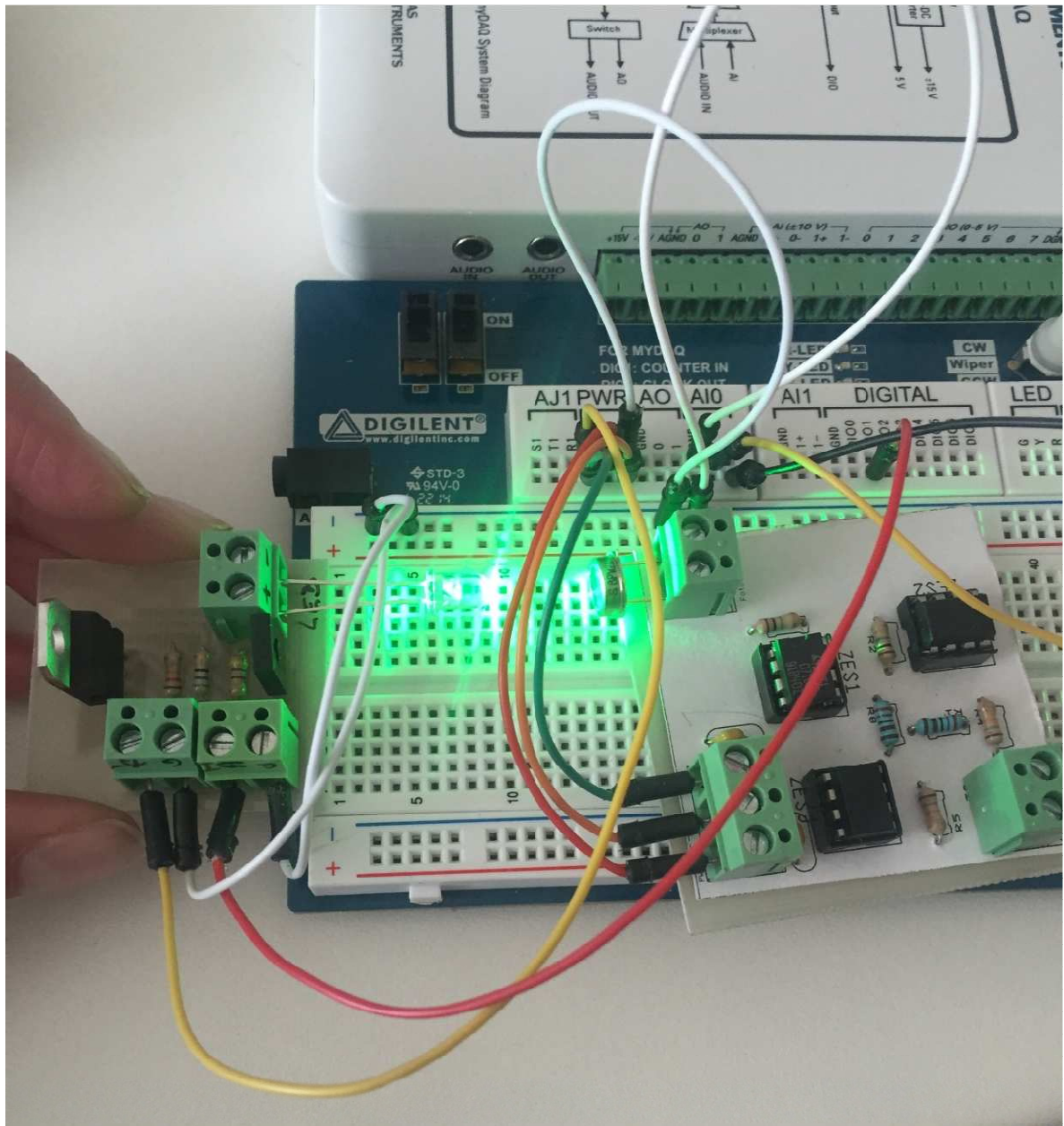
Světlem o vlnové délce 515 nm se ozáří kyveta se stanovovaným vzorkem. Za kyvetou je umístěna druhá část, tedy detektor (byla využita fotodioda). Fotodioda je vlastně běžná dioda, ve které může být ozařovaný PN přechod. Jako detektor záření může být zapojená se zdrojem elektrického napětí, nebo také bez něj. V druhém případě (pro tuto práci) se využívá elektromotorického napětí, které vzniká na přechodu PN při jeho ozáření. Tato dioda umí měnit světelnou aktivitu na elektrickou a to tak, že se po ozáření přechodu PN uvolní nosiče a tím se změní kontaktní napětí. Porušením rovnováhy těchto napětí se vyvolá proud v obvodu nebo nenulové napětí na výstupu. Z fotodiody vedou oba vývody do operačních zesilovačů, které převádějí proud vzniklý z fotodiody na napětí vedoucí do dalšího zesilovače, který je zapojen jako diferenciální zesilovač. Tento zesilovač má symetrický vstup a jeho úkolem je zesilovat užitečný rozdílový signál. Signál souhlasný nebo také označovaný jako soufázový je často způsoben rušením a je třeba ho potlačit. Z tohoto třetího zesilovače vede žádané napětí do počítače.



Obrázek 13 Schéma zapojení detektoru

5.2 Konstrukce přístroje

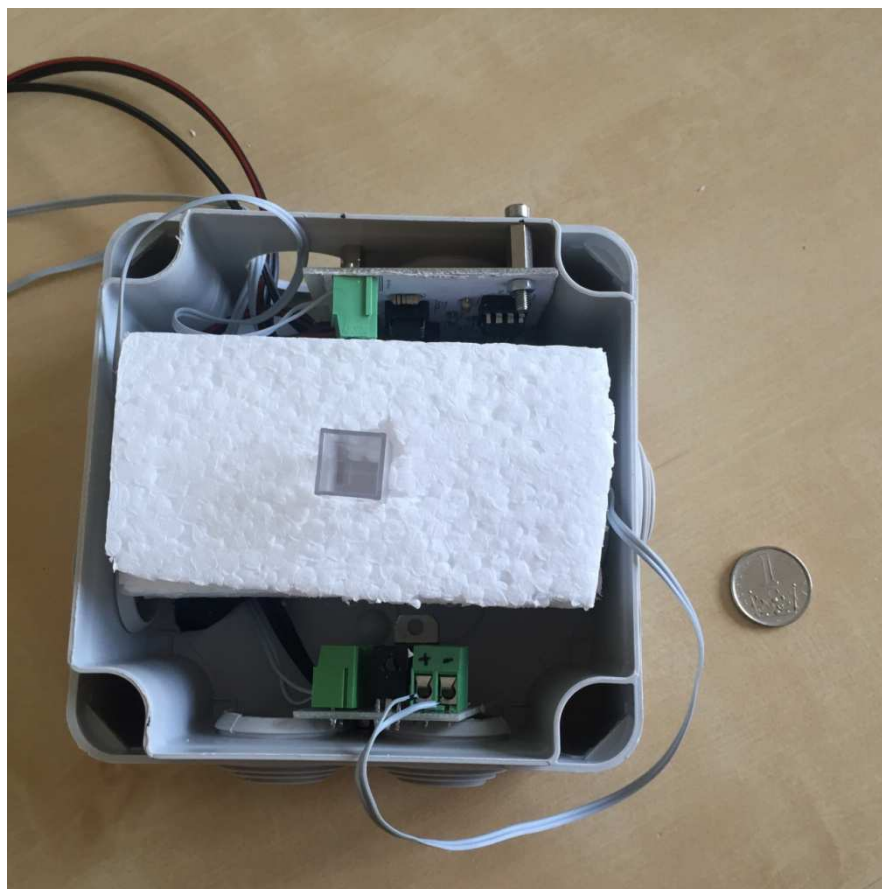
Zda zapojení bude fungovat, bylo nutné nejdříve ověřit na nepájivém poli myDAQ. Žádaná hodnota výsledného napětí byla upravena nastavením zesílení pomocí rezistorů na diferenčním zesilovači. Dále byly vyrobeny desky plošných spojů, jejichž funkčnost se ověřila opět na nepájivém poli, jak je znázorněno na následující Obrázku 14.



Obrázek 14 Ověření desek plošných spojů [Archiv autora]

Zařízení musí být uzavřeno v nepropustné krabičce pro světlo, protože je jinak měření negativně ovlivněno okolním světlem. LED dioda a fotodioda byly vyvedeny vodiči pomocí svorkovnic z DPS, aby se mezi ně mohla vložit kyveta.

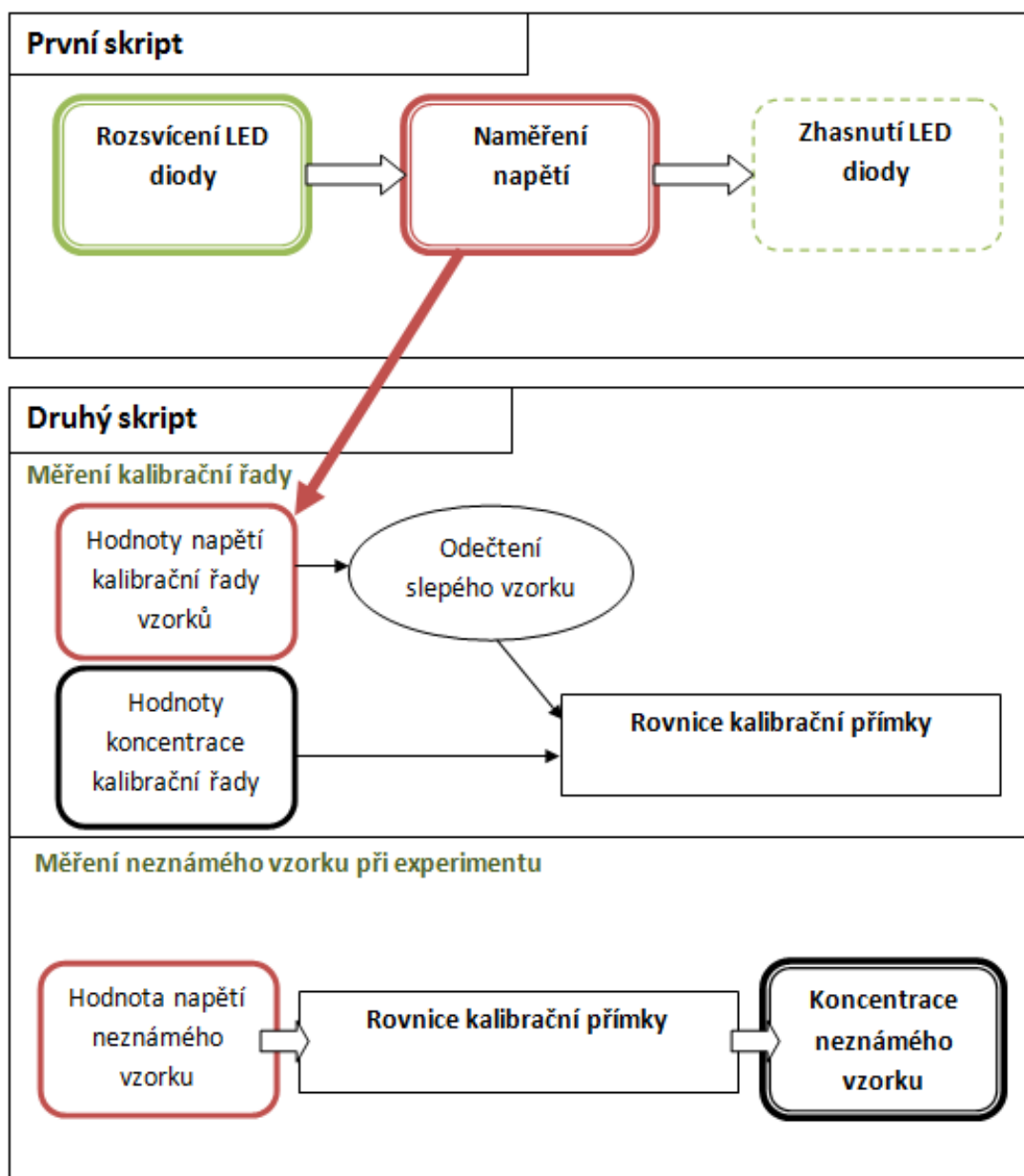
Posledním krokem výroby byla kompletace celého přístroje. Elektronika zařízení byla umístěna do plastové přístrojové krabičky, kde bude probíhat i samotné proměřování kyvet. Na jednu stranu krabičky byla pomocí distančních sloupků umístěna deska vysílače a na protější stranu deska detektoru. Mezi desky byl vložen vyřezaný pruh polystyrenu, do kterého byl vytvořen otvor pro vsunutí kyvety. Ke kyvetě bylo nutné přivést vodiči LED diodu pro osvětlení a k druhé straně fotodiodu pro detekci, proto byly vyřezány drážky do polystyrenu pro přívod součástek. Vodiče pro napájení a výstupy jsem z krabičky byly vyvedeny bočním otvorem a přišroubovány pomocí svorkovnic ke sběrnici, která se připojila ke zdroji napájení a počítači. Boční otvor slouží zároveň jako větrání, protože tranzistor ovládající LED diodu se při používání zahřívá. Na krabičku bylo umístěno víko s vyvrtaným otvorem pro kyvetu, který se dá uzavřít záklopkou.



Obrázek 15 Přístroj pro měření koncentrace kreatininu v moči [Archiv autora]

6 Návrh aplikace

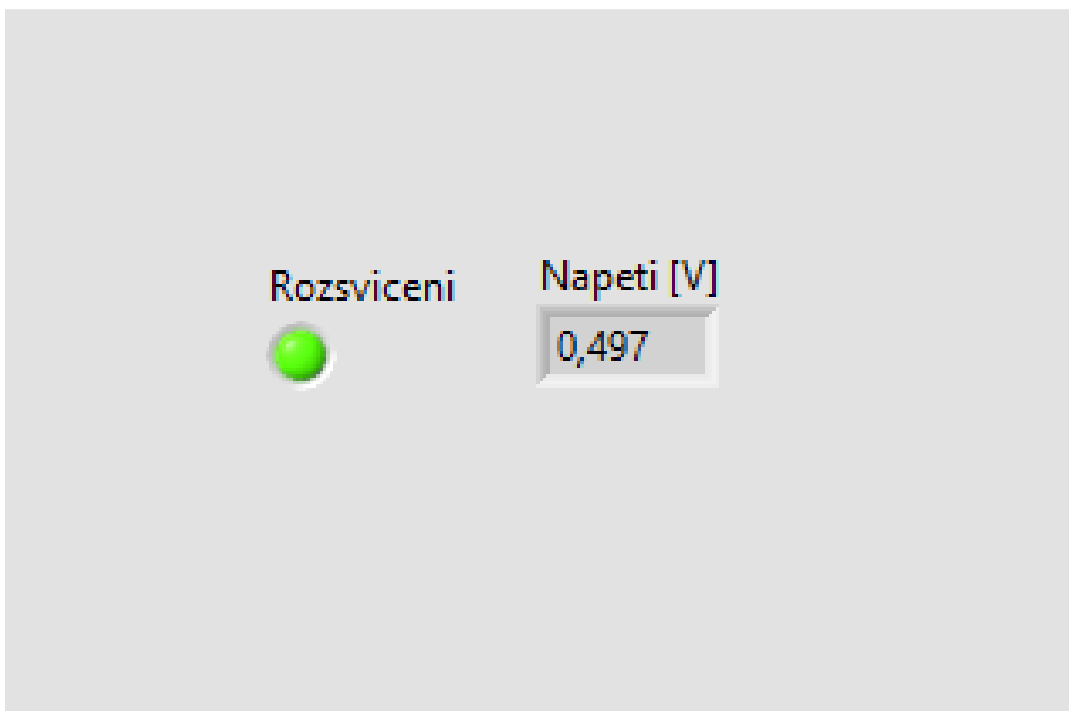
Další částí bakalářské práce bylo vytvoření aplikace pro ovládání a zobrazení měření. Tato aplikace byla vytvořena v programovacím jazyce LabVIEW, ve které byly vytvořeny dva skripty. Nejprve bylo navrženo blokové schéma funkce těchto skriptů, které je zobrazeno na následujícím Obrázku 16.



Obrázek 16 Blokové schéma softwaru

6.1 Ovládání měření

První skript je určený k ovládání měření, program je díky němu připojen ke sběrnici a umožňuje komunikaci přístroje s počítačem - obsahuje ovládání tranzistoru (řídí rozsvícení a zhasnutí LED diody) a měřené napětí se díky němu zobrazí v počítači.



Obrázek 17 První skript

Obrázek 17 zobrazuje skript z LabVIEW při měření. LED dioda je rozsvícená a změřilo se výchozí napětí pro konkrétní vzorek.

6.2 Kalibrace a měření

Druhý skript je určený ke kalibraci a výpočtu výsledné koncentrace kreatininu v moči. Slouží pro uživatelské použití a hodnota aktuálního naměřeného napětí se zobrazí pouze po stisknutí tlačítka **Mer**. Nejprve je potřeba ručně nastavit hodnoty koncentrací kalibrační řady. Jako první se tlačítkem **Mer** proměří slepý vzorek o koncentraci kreatininu 0 mmol/l, který by mohl měření zkreslit, protože i další látky obsažené v roztoku pohlcují záření. Následně se pro každou hodnotu kalibrační řady tlačítkem **Mer** naměří výstupní napětí. V programu je odečtení hodnoty slepého vzorku nastaveno tak, že všechna změřená napětí se hodnotou slepého vzorku vydělí (čím více

látku absorbuje záření - má vyšší absorbanci, tím menší vzniká na fotodiodě proud a i výsledné napětí má nižší hodnotu).

Vedle této kalibrace je připravené měření pro neznámý vzorek. Nejprve se opět tlačítkem **Mer** změří výchozí napětí a následně program pomocí tlačítka **Vypocitat** spočítá kalibrační rovnici a výslednou koncentraci neznámého roztoku.

Uživatelské prostředí tohoto skriptu je znázorněno na Obrázku 18.

The screenshot shows a software interface for a calibration and measurement process. It is divided into two main panels: 'Měření kalibrační řady' (Calibration series measurement) and 'Měření neznámého vzorku při experimentu' (Measurement of unknown sample during experiment).

Měření kalibrační řady:

- Měření slepeho vzorku:** Includes a 'Mer' button, a 'Slepy vzorek' input field (value 0), and a 'Koncentrace slepeho vzorku' input field (value 0).
- Měření 1:** 'Prvni vzorek', 'Mer' button, 'Koncentrace 1 (mmol/l)' input field (value 0).
- Měření 2:** 'Druhy vzorek', 'Mer' button, 'Koncentrace 2 (mmol/l)' input field (value 0).
- Měření 3:** 'Treti vzorek', 'Mer' button, 'Koncentrace 3 (mmol/l)' input field (value 0).
- Měření 4:** 'Ctvrty vzorek', 'Mer' button, 'Koncentrace 4 (mmol/l)' input field (value 0).
- Měření 5:** 'Paty vzorek', 'Mer' button, 'Koncentrace 5 (mmol/l)' input field (value 0).
- Měření 6:** 'Sesty vzorek', 'Mer' button, 'Koncentrace 6 (mmol/l)' input field (value 0).

Měření neznámého vzorku při experimentu:

- Rovnice:** 'Vypocitat' button.
- Koefficient a:** Input field with value 1.
- Koefficient b:** Input field with value 0.
- Měření neznámého vzorku:** 'Mer' button.
- Napětí neznámého:** Input field with value 0.
- Koncentrace neznámého vzorku:** Input field with value 0.
- stop:** A red 'STOP' button.

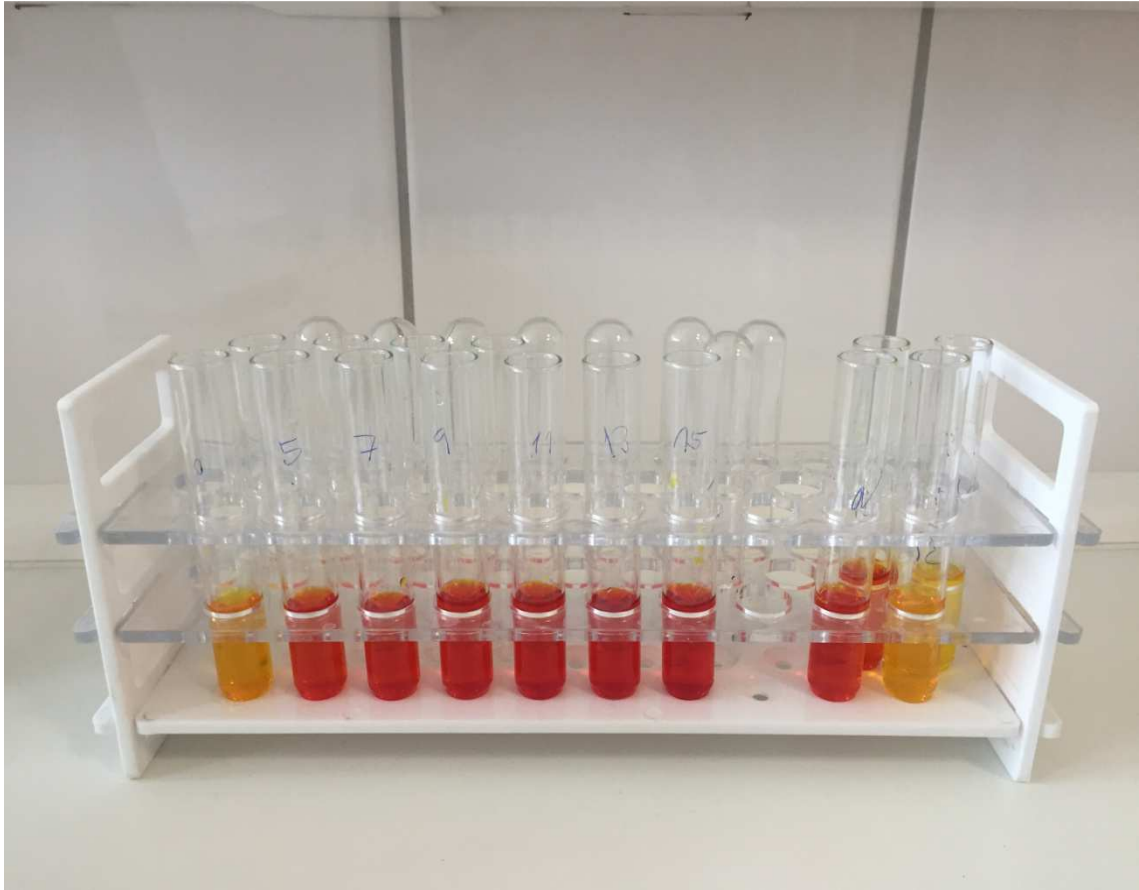
Obrázek 18 Druhý skript

7 Výsledky

Výstupem bakalářské práce je celý systém pro rychlé a orientační stanovení koncentrace kreatininu v moči během animálních experimentů. Byla navržena metodika zahrnující jak přípravu před experimentem tak postup přímo při provádění experimentu, tato metodika byla doplněna pro větší přehlednost blokovými schématy. Dále bylo navrženo zařízení, nejdříve jeho elektronika a následně celý design. Výstup z tohoto zařízení je řízený a zároveň detekovaný pomocí vytvořené aplikace v jazyce LabVIEW.

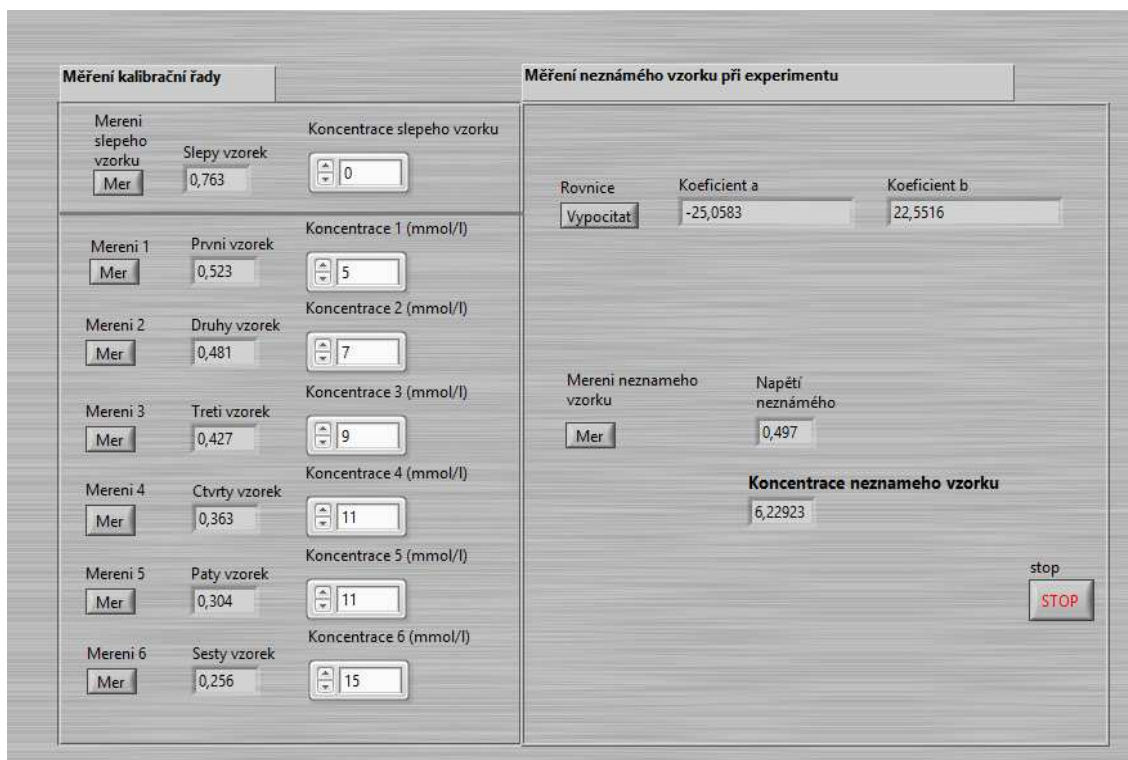
7.1 Ověření

V kapitole ověření se spojují všechny části dohromady. Ověření bylo provedeno na vlastním vzorku moči. Začalo se přípravou kalibrační řady roztoků kreatininu, jejichž hodnoty byly v rozmezí lidské fyziologické hodnoty (5,7 - 14,7 mmol/l). Zvolené hodnoty koncentrací byly: 5, 7, 9, 11, 13 a 15 mmol/l, připravil se také slepý vzorek, kdy se místo roztoku použila pouze destilovaná voda (koncentrace kreatininu ve vzorku je 0). Kalibrační roztoky o daných koncentracích byly připraveny ředěním destilovanou vodou předem připraveného roztoku o koncentraci 15 mmol/l. Z každého roztoku se odpipetoval 1 ml do zkumavky a přidalo se do něj 1 ml destilované vody, 1 ml hydroxidu sodného a 1 ml kyseliny pikrové. Pro přesnější měření byly připraveny tři vzorky moči, do kterých se ve stejném poměru jako do kalibrační řady napipetovala destilovaná voda, kyselina pikrová a hydroxid sodný. Připravená kalibrační řada vzorků je zobrazena na Obrázku 19.



Obrázek 19 Kalibrační řada vzorků [Archiv autora]

Roztoky se nechaly asi 20 minut ustálit a následně se Pasteurovou pipetou napipetovaly do očištěných kyvet. Kyvety byly řádně označené a postupně se proměřily v přístroji. Jako poslední se do přístroje vložily vzorky moči, proměřily se přístrojem a pomocí programu se vypočítala koncentrace obsaženého kreatininu.



Obrázek 20 Druhý skript s naměřenými a vypočtenými hodnotami

Na Obrázku 20 je znázorněno uživatelské prostředí softwaru s naměřenými hodnotami kalibrační řady a výpočtem koncentrace neznámého vzorku.

Po naměření byly získány tyto tři hodnoty koncentrace kreatininu v moči: 6,21621 mmol/l, 7,11998 mmol/l a 6,79462 mmol/l. Z těchto tří hodnot byl následně vypočítán aritmetický průměr:

$$\bar{c} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n c_i \quad (3)$$

$$\bar{c} = 6,71027 \text{ mmol/l}$$

a dále směrodatná odchylka:

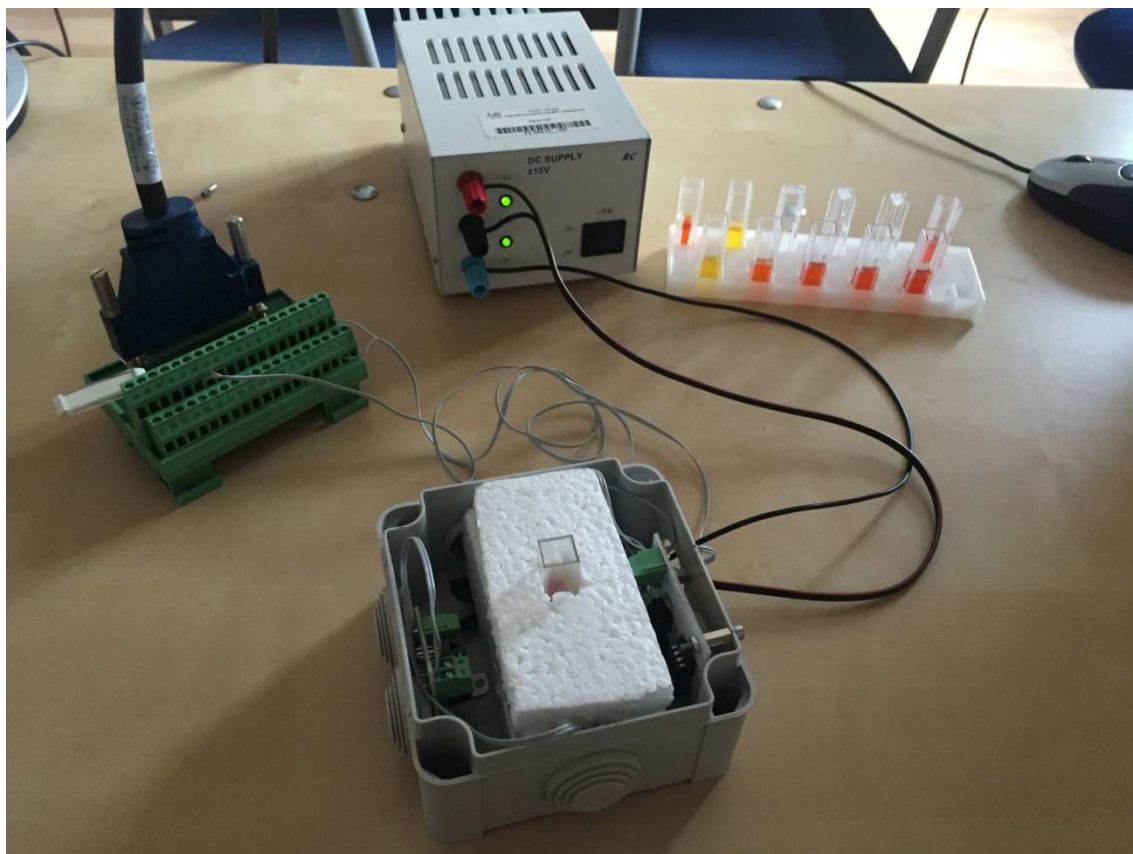
$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{c} - c_i)^2}{(n - 1)}} \quad (4)$$

$$s = 0,4578 \text{ mmol/l}$$

Naměřená hodnota koncentrace kreatininu v moči je:

$$c = 6,71027 \pm 0,4578 \text{ mmol/l}$$

Výsledek koncentrace kreatininu v moči je fyziologický (je v rozmezí 5,7 - 14,7 mmol/l).



Obrázek 21 Ověření [Archiv autora]

Obrázek 21 je fotografie pořízená přímo při ověřování celého systému. Znárodnuje zkonstruovaný přístroj řízený měřicí kartou PCI-6221 od National Instruments (USA, TX) a připojený do zdroje napájení. Na obrázku vpravo jsou připravené kyvety s kalibrační řadou a vzorky moči

7.2 Laboratorní úloha

Jako součást práce byla sestavena laboratorní úloha, kterou realizují studenti v rámci předmětu Biosystém člověka. V průběhu cvičení byla původní úloha z praktických důvodů upravena.

Laboratorní práce vychází z Jaffého metody stanovení koncentrace kreatininu v moči, která využívá výsledného barevného produktu vznikajícího z reakce kreatininu s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí.

V příloženém návodu laboratorní práce, je nejprve popsána teoretická část, tedy obecně metabolismus kreatininu a využití jeho stanovení v klinické praxi. Dále metoda stanovení pomocí spektrofotometru a poté samotný princip a základy práce se spektrofotometrem a kvyetami.

V práci jsou vypsány pomůcky, chemikálie a postup stanovení zahrnující jak popis techniky sběru moči, tak samotný návod práce. V návodu práce si studenti nejprve musí vytvořit kalibrační řadu standardních roztoků, jejich minimální (5 mmol/l) a maximální (15 mmol/l) hodnota byla stanovena dle rozmezí fyziologických hodnot s krokem 2 mmol/l - tedy tak, aby byli studenti schopni z kalibrační křivky určit hodnotu své koncentrace kreatininu v moči. V práci se používají tři vzorky moči, aby byl výsledek co nejpřesnější (výsledná hodnota se získá pomocí aritmetického průměru). Všechny vzorky se následně vloží do spektrofotometru, jehož použití je v práci popsáno. Dále laboratorní práce obsahuje analýzu výsledků (co mají z výsledků studenti zjistit), kontrolní otázky a příklad.

8 Diskuze

Úkolem mé bakalářské práce bylo vytvořit jednoduchý systém pro stanovení koncentrace kreatininu v moči. Jak už bylo zmíněno v teoretické části, kreatinin je jeden z indikátorů funkce ledvin a především glomerulární filtrace. Díky němu můžeme být schopni podchytit případný problém ještě před tím, než například ledvina zkolabuje a dokážeme ji zachránit včasným zásahem, třeba například tlumícími látkami v lécích, změnou jídelníčku a celkově životosprávy. Už v rámci semestrálního projektu jsem navrhla laboratorní úlohu, pomocí níž studenti v rámci předmětu Biosystém člověka detekují zda koncentrace kreatininu v jejich moči odpovídá fyziologické hodnotě. Tato laboratorní úloha byla v průběhu výuky po několika provedeních lehce upravena, aby byla rychleji ověřitelná, byl například snížen počet vzorků kalibrační řady (nynějších šest vzorků k vytvoření přesné kalibrační přímky je dostačujících).

V rámci bakalářské práce jsem měla navrhnout metodiku pro rychlé stanovení během experimentů prováděných především na prasatech domácích. Při těchto experimentech není čas na přípravu kalibrační řady na místě a je potřeba měření provést co nejrychleji. Proto jsem metodiku rozdělila na dvě části. První část zahrnuje přípravu kalibrační řady a přímky v laboratoři a druhá se odehrává přímo na sále, kde z prasete odebereme vzorek moči. Použijeme 1 ml vzorku a do něj přilijeme z předem připravených eppendorfových zkumavek hydroxid sodný, kyselinu pikrovou a destilovanou vodu o přesném objemu 1 ml. Takto připravený roztok už jen kapátkem či Pasteurovou pipetou napipetujeme do kyvety, kterou vložíme do přístroje a zjistíme jeho koncentraci.

Při navrhování přístroje jsem nejprve zvažovala jaký použít vysílač záření. Nejjednodušším a nejlevnějším vysílačem světelného záření je LED dioda. Při Jaffého reakci kreatininu s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí vzniká červeno-oranžový produkt, který je nejlépe detekovatelný při zeleném záření. Po zkušebním proměření pomocí spektrofotometru ve fakultní laboratoři jsem zvolila vlnovou délku LED diody 515 nm. Tato LED dioda vyžaduje napájení 20mA, proto jsem využila zdroje konstantního proudu LM317, který pomocí rezistoru o daném odporu vytvoří z napájení 15 V proudový zdroj o žádané hodnotě. Aby LED dioda stále nesvítila, zvolila jsem pro její ovládání tranzistor zapojený jako spínač, ten je digitálně napájený 5 V.

Druhá část návrhu přístroje zahrnoval detektor. Zvolila jsem fotodiodu BPW21, která detekuje záření v rozmezí 350 - 820 nm a největší detekční funkci má pro záření s vlnovou délkou 550 nm. Z fotodiody vystupuje proud, závislý na množství detekovaného záření. Tento proud převádí na napětí zesilovače na obou výstupech fotodiody. Třetí zesilovač je zapojen jako diferenční. Jeho zesílení bylo nutné několikrát upravit pomocí různých hodnot rezistorů. Při zkoušce na nepájivém poli jsem zjistila, že bude postačovat hodnota zesílení 1.

Poté jsem přešla k výrobě desek plošných spojů. Desky několikrát nefungovaly dle očekávání, což mohlo být způsobeno přetížením vedoucích cest či nepozorností při navrhování. Oživení desek jsem nejdříve zkoušela opět na nepájivém poli a následně je upevnila do plastové krabičky, do které jsem umístila vyřezaný polystyren pro vložení kyvety. Z jedné strany kyvety je do polystyrenu zavedena fotodioda a z druhé LED dioda.

Pro detekci naměřeného napětí bylo potřeba vytvořit aplikaci v jazyce LabVIEW. Vytvořila jsem dva skripty, jeden skript pro digitální řízení tranzistoru (tedy pro rozsvícení LED diody) a detekci výchozího napětí. Druhý pro vytvoření kalibrační přímky a výpočet koncentrace kreatininu v neznámém vzorku moči. V uživatelském prostředí druhého skriptu stačí stlačit tlačítko **Mer** pro naměření napětí na každém vzorku kalibrační řady a také na neznámém vzorku moči. Následně pomocí tlačítka **Vypocitat** program určí koncentraci kreatininu v moči.

Celý systém jsem ověřila na vlastním vzorku moči. Naměřená a vypočtená průměrná hodnota byla $c = 6,71027 \pm 0,4578$ mmol/l. Při ověřování jsem nepoužila vzorek z celodenního sběru moči, proto je hodnota koncentrace kreatininu v mé moči pouze orientační (v tento den jsem nevykonávala náročnou fyzickou práci a nekonzumovala masité potraviny, proto očekáváme nižší koncentraci), přesto vyšla v intervalu fyziologické hodnoty (5,7 - 14,7 mmol/l). Vypočítaná odchylka hodnot koncentrací je přibližně půl jednotky mmol/l, což je přijatelná hodnota, která mohla být způsobena nepřesnou manipulací s pipetami nebo při přípravě roztoků.

Laboratorní ověření je snadno proveditelné a dá se jednoduše zopakovat. Pokud dodržíme všechny zásady bezpečnosti práce a podmínky práce v laboratoři (zacházení s kyselinou, nošení laboratorního pláště atd.) je také relativně bezpečné. Metoda je omezená pouze dostupností kyseliny pikrové, kterou potřebujeme v nasyceném stavu,

v němž při tření vybuchuje. Tuto metodiku využijeme i při animálních experimentech, pouze využijeme jinou kalibrační řadu tak, aby odpovídala fyziologickým hodnotám kreatininu v moči daného živočicha

Závěr

V rámci své bakalářské práce jsem vytvořila systém pro stanovení koncentrace kreatininu v moči. Navrhla jsem a zkonstruovala zařízení pro rychlé orientační stanovení během animálních experimentů, dále jsem v programu LabVIEW vytvořila jednoduchou aplikaci pro ovládání a měření pomocí tohoto zařízení. Také jsem navrhla rychlou metodiku pro měření během experimentu, založenou na Jaffého metodě stanovení kreatininu v moči.

Na závěr jsem propojila všechny části a navrženou metodikou vyšetřovala koncentraci kreatininu vlastní moči - vytvořila jsem vzorky, proměřila je sestrojeným přístrojem a zobrazila měření pomocí vytvořené aplikace. Výsledná koncentrace kreatininu v mé moči byla $c = 6,71027 \pm 0,4578$ mmol/l. Toto stanovení by se v budoucnu dalo rozšířit o vyšetření krve a díky této hodnotě by se dala dále také stanovit clearance kreatininu.

Seznam použité literatury

- [1] ČERMÁKOVÁ, Marta a Irena ŠTĚPÁNOVÁ. *Klinická biochemie*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 2003. ISBN 80-701-3372-4.
- [2] DASTYCH, Milan a Petr BREINEK. *Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant*. Brno: Masarykova univerzita, 2008. ISBN 978-80-210-4572-9.
- [3] MASOPUST, Jaroslav. *Klinická biochemie: požadování a hodnocení biochemických vyšetření*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-718-4650-3.
- [4] RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. Praha: Galén, c1999. ISBN 80-726-2023-1.
- [5] TEPLAN, Vladimír, et al. *Praktická nefrologie*. 2. přeprac. vyd. Praha : Grada, 2006. 496 s. ISBN 80-247-1127-2
- [6] Kreatinin [online]. MeDiLa spol. s r.o., c2010. Poslední změna 6. 4. 2010 [cit. 2015-05-24]. URL: < <http://www.medila.cz/website/others/kreatinin/>>
- [7] Kreatinin [online]. KOTAČKOVÁ, Lenka, c2012. Poslední změna 1. 9. 2012 [cit. 2015-05-24]. URL: < <https://www.toplekar.cz/laboratorni-hodnoty/kreatinin.html>>
- [8] Ceník firmy Roche Diagnostics 2008 dostupný na <http://roche-diagnostics.cz/> [cit. 2015-05-24]
- [9] Ceník firmy Abbott 2008 dostupný na <http://www.abbott.cz/> [cit. 2015-05-24]
- [10] REECE, William O. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. 1. české vyd. Praha: Grada, 2011, 473 s. ISBN 978-80-247-3282-4.
- [11] CIBULKA, Jiří. *Základy fyziologie hospodářských zvířat*. Vyd. 1. V Praze: Česká zemědělská univerzita, 2004, 200 s. ISBN 978-80-213-1247-0.
- [12] Přenosný fotometr/turbidimetr PhotoFlex Turb. *Fisher Scientific* [online]. [cit. 2016-05-11]. Dostupné z: <http://www.thermofisher.cz/produkty/prenosny-fotometr-turbidimetr-photoflex-turb>
- [13] Spektrofotometr SpectroVis Plus. *Vernier* [online]. [cit. 2016-05-11]. Dostupné z: <http://www.vernier.cz/produkty/podrobne-informace/kod/SVIS-PL>
- [14] Eutech C 113. *Fisher Scientific* [online]. [cit. 2016-05-11]. Dostupné z: <http://www.thermofisher.cz/produkty/rucni-fotometr-eutech-c-103-chlordioxid-0-11-4-ppm>

- [15] Glomerulus. *GVP* [online]. [cit. 2016-05-11]. Dostupné z:
<http://www.gvp.cz/studenti/2010/vylucovací%20soustava/Ledviny.html>
- [16] Výživa a krmení prasat. *Česká zemědělská univerzita v Praze: Stránky kateder a útvarů* [online]. , 1-29 [cit. 2016-05-12]. Dostupné z:
https://katedry.czu.cz/storage/3376_Vyziva.pdf
- [17] Lab-grown kidneys work in rats, offer hope for human transplants. In: *Genetic literacy project* [online]. [cit. 2016-05-16]. Dostupné z:
<https://www.geneticliteracyproject.org/2013/04/16/lab-grown-kidneys-work-in-rats-offer-hope-for-human-transplants/>
- [18] HOLISTIC APPROACH TO KIDNEY DISEASE TREATMENT. *Peter Dobias Naural Healing* [online]. 2016 [cit. 2016-05-17]. Dostupné z:
<http://peterdobias.com/blogs/blog/11015021-holistic-approach-to-kidney-disease-treatment>
- [19] Játra ničí nemoci i alkohol. S vyčištěním pomůže dieta. *OnaDnes.cz* [online]. iDnes.cz, 2013 [cit. 2016-05-17]. Dostupné z: http://ona.idnes.cz/jaterni-dieta-00b-zdravi.aspx?c=A130305_113725_zdravi_pet
- [20] Jak rostl mozek. *Nevšední svět* [online]. 2014 [cit. 2016-05-17]. Dostupné z:
<http://nevsedni-svet.cz/jak-rostl-mozek/>
- [21] Recepty - hovězí maso. *Labužník.cz* [online]. [cit. 2016-05-17]. Dostupné z:
<http://nevsedni-svet.cz/jak-rostl-mozek/>
- [22] Nefron. In: *Pinterest* [online]. [cit. 2016-05-18]. Dostupné z:
<https://www.pinterest.com/pin/378232068676520719/>

Seznam symbolů a zkratek

ATP	Adenosintrifosfát - chemická látka
ADP	Adenosindifosfát - chemická látka
ADH	Antidiuretický hormon
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADH	Redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu
NAD(P)H	Fosforylovaný analog NAD(H)
NAD(P)+	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
HPLC	High performance liquid chromatography = vysokoúčinná kapalinová chromatografie
VIS	Visible = viditelné světlo
LED	Light emitting diode = světlo vyzařující dioda
IR	Infrared = Infračervené záření
DPS	Deska plošných spojů

Seznam obrázků

Obrázek 1 Blokový diagram metabolismu kreatininu. Převzato a upraveno z [18, 19, 20, 21, 22]	4
Obrázek 2 Uložení ledvin u prasete. Převzato a upraveno z [16].....	5
Obrázek 3 Ledviny prasete domácího. Převzato z [17]	6
Obrázek 4 Glomerulus . Obrázek převzat z [15]	7
Obrázek 5 Přenosný fotometr WTW pHotoFlex Turb. Obrázek převzat z [12].....	12
Obrázek 6 Spektrofotometr SpektroVis Plus. Obrázek převzat z [13]	12
Obrázek 7 Eutech C 113. Obrázek převzat z [14]	13
Obrázek 8 Blokové schéma metodiky přípravy před experimentem.....	15
Obrázek 9 Kalibrační řada navrženého softwaru.....	16
Obrázek 10 Blokové schéma metodiky při experimentu	17
Obrázek 11 Blokové schéma zařízení.....	18
Obrázek 12 Schéma zapojení vysílače.....	19
Obrázek 13 Schéma zapojení detektoru.....	20
Obrázek 14 Ověření desek plošných spojů [Archiv autora]	21
Obrázek 15 Příklad pro měření koncentrace kreatininu v moči [Archiv autora]	22
Obrázek 16 Blokové schéma softwaru	23
Obrázek 17 První skript	24
Obrázek 18 Druhý skript.....	25
Obrázek 19 Kalibrační řada vzorků [Archiv autora]	27
Obrázek 20 Druhý skript s naměřenými a vypočtenými hodnotami	28
Obrázek 21 Ověření [Archiv autora]	29

Seznam příloh

Příloha 1: Laboratorní úloha pro předmět Biosystém člověka	40
Příloha 2: Schéma zapojení vysílače	48
Příloha 3: Návrh DPS vysílače	49
Příloha 4: Schéma zapojení detektoru	50
Příloha 5: Návrh DPS detektoru	51

Příloha 1: Laboratorní úloha pro předmět Biosystém člověka

České vysoké učení technické v Praze

Fakulta biomedicínského inženýrství

Stanovení koncentrace kreatininu v moči

Úkol:

Stanovte koncentraci kreatininu ve svém vlastním vzorku moči.

Teoretická část:

Stanovení koncentrace kreatininu se využívá pro diagnostiku poruch funkce ledvin. Pokud se poškodí více než 50% nefronů (základní stavební jednotka ledvin), zvyšuje se koncentrace kreatininu v krevním séru a naopak snižuje koncentrace v moči. Stanovuje se pravidelně u pacientů s již diagnostikovanou poruchou funkce ledvin, s cukrovkou nebo také pokud pacient užívá větší množství léků.

Pro stanovení funkce ledvin je potřeba nejen stanovení sérové koncentrace či koncentrace v moči, ale využívají se především výpočty glomerulární filtrace (např. clearance kreatininu). Clearance je schopnost orgánu očistovat krevní plazmu. Očišťovací schopnost je definována jako objem plazmy zbavený dané látky v určitém časovém intervalu.

Clearance kreatininu se počítá na podkladě měření močového kreatininu ve sledovaném období a hodnotě sérového kreatininu. Výpočet se provádí podle vzorce:

$$\text{clearance kreatininu} = \text{kreatinin moč} \times \text{diuréza}(\text{ml/s}) / \text{kreatinin sérum} \quad (1)$$

Cockroft a Gault navrhli více osvědčený vzorec:

$$\text{clearance kreatininu} = (140 - \text{věk}) \times \text{tělesná hmotnost} / 49 \times \text{kreatinin v séru} \quad (2)$$

kreatininová clearance je v ml/s, věk v rocích, tělesná hmotnost v kg. U žen se takto vypočítaná hodnota násobí faktorem 0,85 (mají menší svalovou hmotu)

Kreatinin vzniká cyklizací kreatinu a kreatinfosfátu. Je to organická látka a vyskytuje se v cyklu obsahující dusík. Ve svalech vzniká rozpadem kreatinfosfátu (ten

slouží jako energetická rezerva pro svalový stah). Kreatin je syntetizován v játrech a ledvinách z glycinu, guanidinové skupiny argininu. Krví se dostane do svalu a zde se vyskytuje jako kreatinfosfát. Asi 1 – 2 % kreatinfosfátu se denně cyklizuje na kreatinin, který je z těla vyloučen jako odpadní látka.

Množství kreatinu v krvi ovlivňuje tvorbu a vylučování kreatininu. Toto množství je ovlivňováno dvojím způsobem - exogenně či endogenně. Exogenní část tvoří potrava, masitá strava (přímá resorpce z potravy bez předcházející enzymové hydrolyzy). Endogenní závisí na množství svalové hmoty a činnosti svalů, tedy energetickém metabolismu svalové tkáně (uvolněný kreatin se neenzymovou hydratací mění na kreatin). Ženy mají asi o 15% kreatinu méně, protože mají menší svalovou hmotu. Množství vylučovaného kreatininu se přes den mění, právě kvůli většímu namáhání svalů a příjmu potravy přes den, tento výkyv může být až 50%.

Regulace kreatininu je zajištěna glomerulární filtrací. Při průchodu krevní plazmy ledvinami se kreatinin do moči dostává z 90% glomerulární filtrací krve a 10% je sekretováno tubulárními buňkami. Zpětně už se neresorbuje (nefron je pro kreatinin nepropustný).

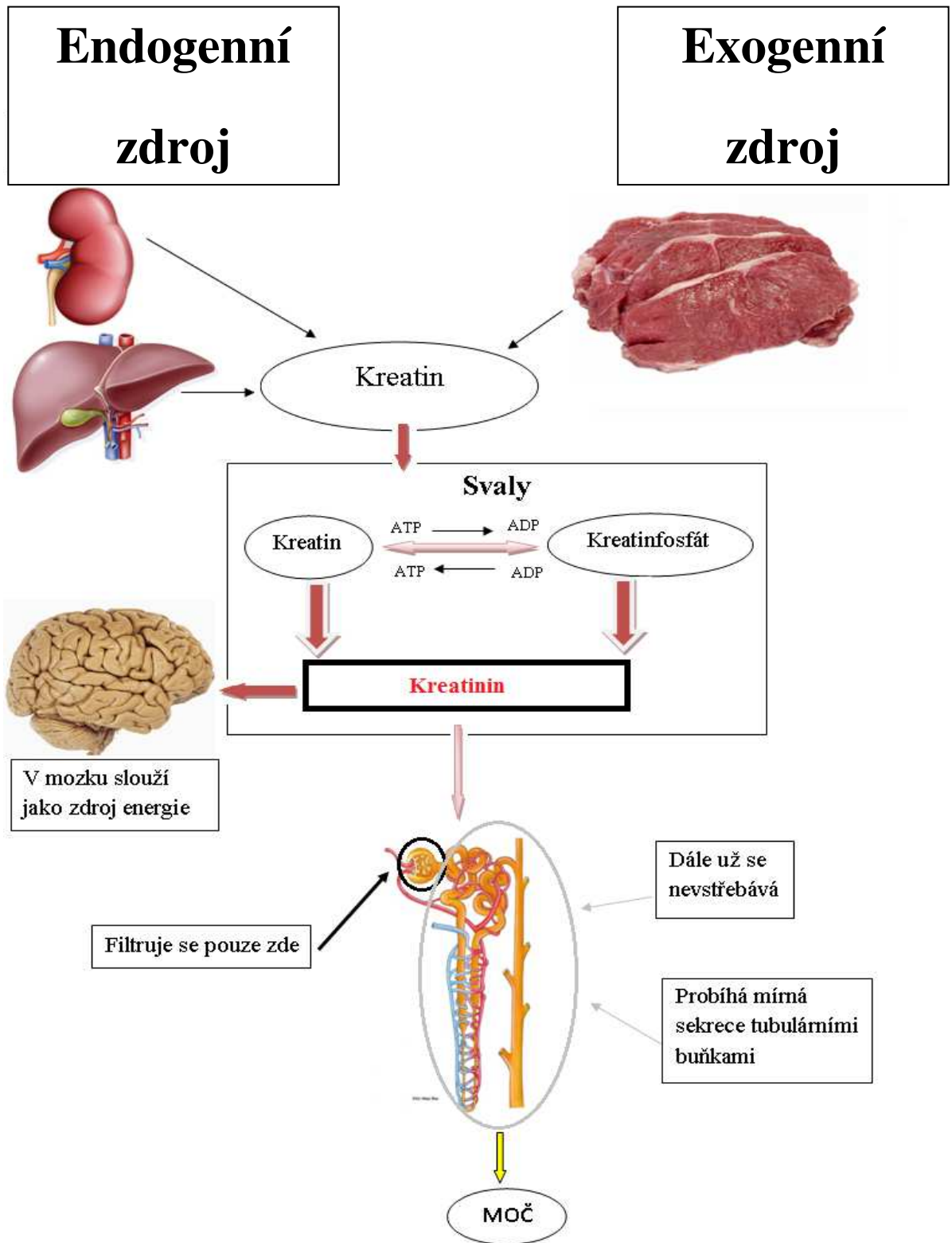
Ke zvýšení hodnot v moči dochází u těhotných žen (zvýšená glomerulární filtrace), u podvyživených a dlouhodobě nemocných s atrofií svalů. Naopak snížení značí nejčastěji poškození ledvin.

V tomto cvičení se bude vycházet z metody založené na Jaffého reakci. V alkalickém prostředí reaguje bezbarvý kreatinin s kyselinou pikrovou, z této reakce vzniká produkt, který má červeno-oranžovou barvu a jeho množství je přímoúměrné množství výchozího kreatininu. Díky tomu, že je látka barevná se může stanovit pomocí spektrofotometrie, jejíž princip je založen na interakci elektromagnetického záření s analyzovaným roztokem.

Záření je látkou pohlcováno a detektor přijímá zbylé a látkou neabsorbované záření. Schopnost látky pohlcovat záření se nazývá absorbance. Intenzita výstupního záření je po průchodu nižší než na začátku a čím více je roztok koncentrován, tím více pohltí záření.

Koncentrace analyzované látky je zjišťována tím, že se sestaví kalibrační křivka, tedy grafické znázornění závislosti absorbance roztoku na koncentraci v něm přítomné stanovované látky. Sestaví se tak, že se změří absorbance roztoků o známých koncentracích a započítá se také slepý vzorek. Slepý vzorek obsahuje všechny činidla až na zkoumanou látku, jeho změřená hodnota se musí následně od ostatních hodnot

odečíst, tím je získána pouze hodnota analyzované látky. Poté se spustí kolmice v bodě, kde hodnota absorbance odpovídá bodu na křivce a zjistí se hledaná koncentrace látky ve vzorku.



Tento diagram znázorňuje jakými zdroji se do krve dostává kreatin. Endogenním zdrojem je syntéza v játrech a ledvinách, exogenním zdrojem zase masitá potrava. Dále je zde popsána jeho cesta do svalu, kde se vyskytuje i ve fosforylované formě jako kreatinfosfát. Ve svalu probíhají mezi kreatinem a kreatinfosfátem vzájemné reakce buď za spotřeby nebo produkce ATP. Z obou látek (kreatinu a kreatinfosfátu) se neenzymaticky cyklizuje kreatinin, který se dále vyskytuje například v mozku (slouží tam jako zásobárna energie). Dále se kreatinin dostává krví do ledvin, kde se filtruje a to pouze v Bowmanově váčku, proto se dá označit jako indikátor filtrace ledvin. Ve zbytku nefronu už se dále nefiltruje, dochází zde pouze k mírné sekreci. Jako odpadní látka se dostává z těla močí ven.

Technika sběru moči - 24 hodinový sběr moči:

Množství vyloučeného kreatininu se v průběhu 24 hodin mění. Nejnižší množství je naměřeno ráno a nejvyšší naopak večer (rozdíl může být skoro 50%). Pro správné stanovení kreatininu v moči je nutný celodenní sběr moči, aby se započítalo celé množství vyloučené látky. 24 hodinový sběr moči se provádí takto:

- je vhodné vynechat náročnější tělesnou aktivitu a masitou stravu ve větším množství
- v den zahájení sběru se ráno člověk nejprve vymočí do toalety a až další moč sbírá do čisté nádoby dalších 24 hodin (pokud nádobu naplní, použije další)
- sbírá se veškerá moč i před stolicí
- poslední odběr moči se provede druhý den ráno
- během sběru člověk jí i pije jako obvykle
- celý objem moči se poté smíchá, aby byl vzorek reprezentativní

Pomůcky:

- spektrofotometr
- kyvety
- automatické pipety + špičky
- stojan a zkumavky
- odměrné baňky (100 ml)

- kádinka
- buničina
- popisovač
- parafilm

Chemikálie:

- nasycený roztok kyseliny pikrové
- 1 M NaOH
- roztok kreatininu o koncentraci 20 mmol/l
- vzorek vlastní moče
- destilovaná voda

Postup:

Pro účely této laboratorní práce nebudete využívat 24 hodinový sběr moči, ale pouze ranní moč - střední proud moči, který se provádí následovně: vnější vyústění močové trubice je znečištěno bakteriemi, ty jsou vždy obsaženy v prvním proudu moči. Tuto první část moči pacient vymočí do toalety a odebere do nádobky až druhý (střední) proud moči. Až z něj se provede analýza.

Pracovní postup:

1. Nejprve si připravte kalibrační řadu standardních roztoků kreatininu a to tak, abyste získali koncentrace roztoků: 0 (tzv. slepý vzorek), 5, 7, 9, 11, 13 a 15 mmol/l. Do označených zkumavek napipetujte vždy 1 ml daného roztoku, do každé přidejte 1 ml kyseliny pikrové a 1 ml hydroxidu, následně promíchejte.
2. V moči je vysoká koncentrace kreatininu, proto je potřeba ji naředit destilovanou vodou v poměru 1:99 (do odměrné baňky napipetujte 1ml moči a doplňte po rysku). Na konci nesmíte zapomenout výslednou koncentraci sto krát vynásobit. Do tří zkumavek napipetujte 1 ml zředěné moči a opět do každé přidejte 1 ml kyseliny pikrové a 1 ml hydroxidu. Promíchejte.

3. Do označených kyvet odpipetujte roztok (přesná technika práce s kyvatami je popsána níže), všech kalibračních roztoků včetně slepého vzorku o nulové koncentraci (jeho naměřenou absorbanci musíte od všech dalších roztoků odečíst abyste ve výsledku získali koncentraci samotného kreatininu) a tři kyvety využijte pro vzorek moči (máte tři vzorky, ze kterých ve výsledku vypočítáte průměrnou hodnotu, abyste získali přesnější výsledek).
4. Nechte asi 15 minut stát při laboratorní teplotě.
5. Pomocí spektrometru změřte absorbance všech roztoků (postup práce se spektrometrem je uveden níže).

Postup při práci se spektrometrem

Kontrola použitých kyvet

Pozor: Povrch kyvet musí být vždy udržován v naprosté čistotě! Otřete jej měkkým hadříkem a dbejte na to, abyste povrch nepoškrábali pipetami (plastová jehla!). Ověřte, zda všechny kyvety uvádějí stejné hodnoty absorpce pro kontrolní roztok.

1. Vyberte vhodné kyvety.
2. Pomocí mechanické pipety do všech kyvet napipetujeme 1 ml 0,2M roztoku NaCl.
3. Spustíme spektrometr: Applications(stiskněte 1) -> single Wavelength (stiskněte 1).
4. Zvolte požadovanou vlnovou délku a potvrďte zeleným tlačítkem.
5. Vložte první vzorek a naměřte jej jako referenci (stisknutím modrého tlačítka OA/100%T). Hodnoty absorpce jednotlivých vzorků by se neměly lišit. Pokud bude v některé z nich výrazná odchylka, je potřeba kyvetu vyměnit.

Naměření spektra

1. Do kyvet přeneste přibližně 200 μ l roztoku z kalibrační řady s nulovou koncentrací a s nejvyšší koncentrací
2. Vložte kyvetu se slepým vzorkem do spektrofotometru.
3. Zvolte Wavescan (stiskněte 3), nastavte rozmezí 400 až 700 nm a potvrďte zeleným tlačítkem
4. Stiskněte modré tlačítko OA/100% pro načtení reference.
5. Vyměňte vzorky a stiskněte zelené tlačítko.
6. Odečtěte z grafu vhodnou vlnovou délku pro měření absorpance vzorků.

Měření absorpce

1. Pomocí mechanické pipety do kyvet napipetujte 200 μ l roztoku jednotlivých vzorků (všechny vzorky kalibrační řady i se slepým vzorkem a tři vzorky moči)

Pozor: Při pipetování dávejte pozor, aby nedošlo k porušení peletů.

2. Kyvetu umístíme do spektrometru a spustíte jej: Applications -> Single Wavelength

3. Zvolte vhodnou vlnovou délku

4. První vzorek (slepý vzorek) naměřte jako referenci stisknutím modrého tlačítka OA/100%T.

5. Postupně proměřte ostatní vzorky. Po umístění kyvety do spektrofotometru vždy stiskněte zelené tlačítko.

6. Výsledky zaneseme do tabulky.

Analýza výsledků:

- Sestrojte kalibrační křivku závislosti absorpance na koncentraci
- Odečtěte z kalibrační křivky koncentrace kreatininu ve vzorku moči
- Výsledky shrňte do tabulky a porovnejte s fyziologickou hodnotou (5,7 - 14,7 mmol/l)
- Z vašeho výsledku vypočítejte clearanci kreatininu pokud víte, že koncentrace kreatininu v krvi je 50 μ mol/l.

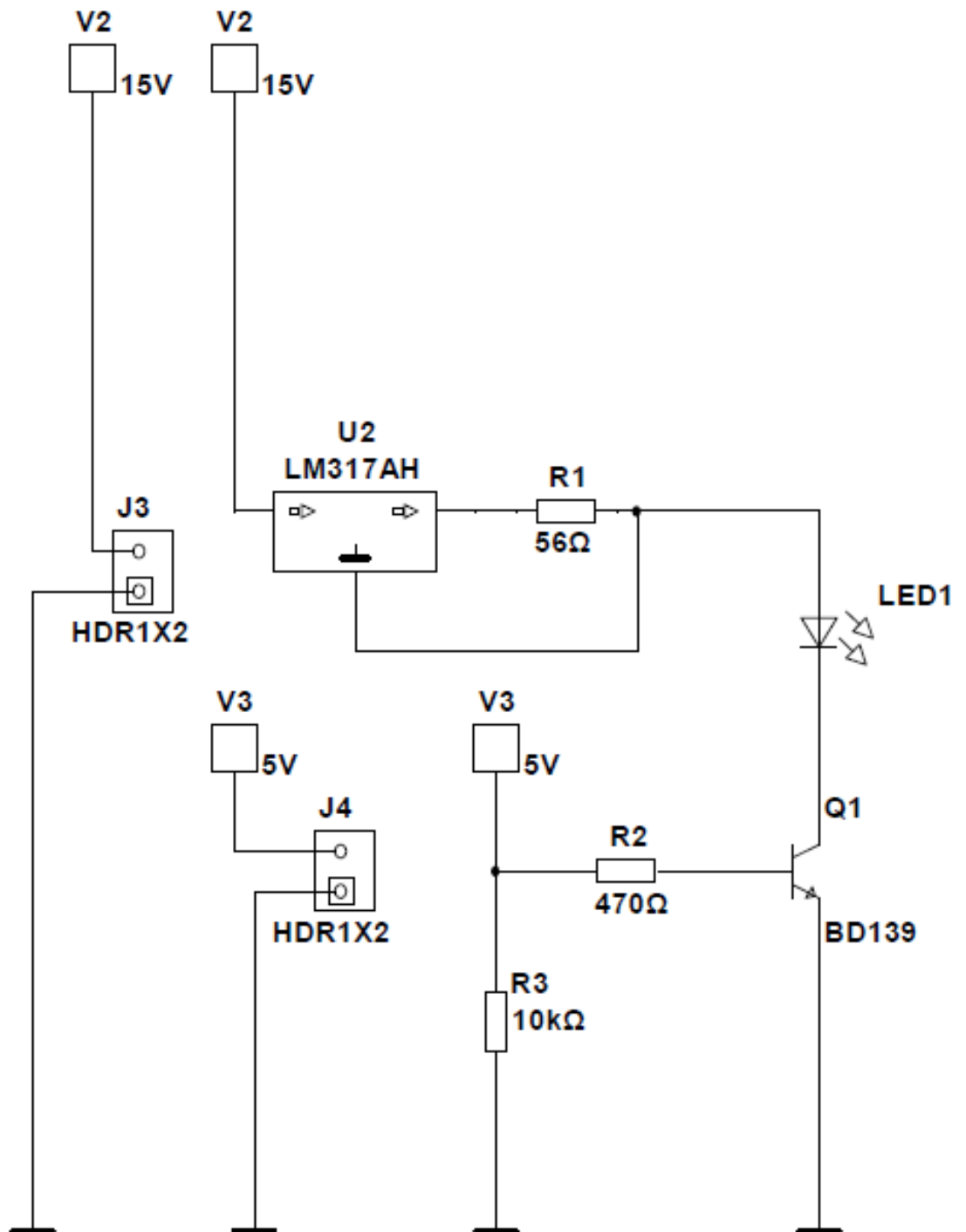
Kontrolní otázky:

- K čemu se v klinické praxi používá stanovení kreatininu v moči?
- Kde se v těle syntetizuje kreatin?
- Co značí snižování koncentrace v moči?
- Kde se kreatinin filtruje?

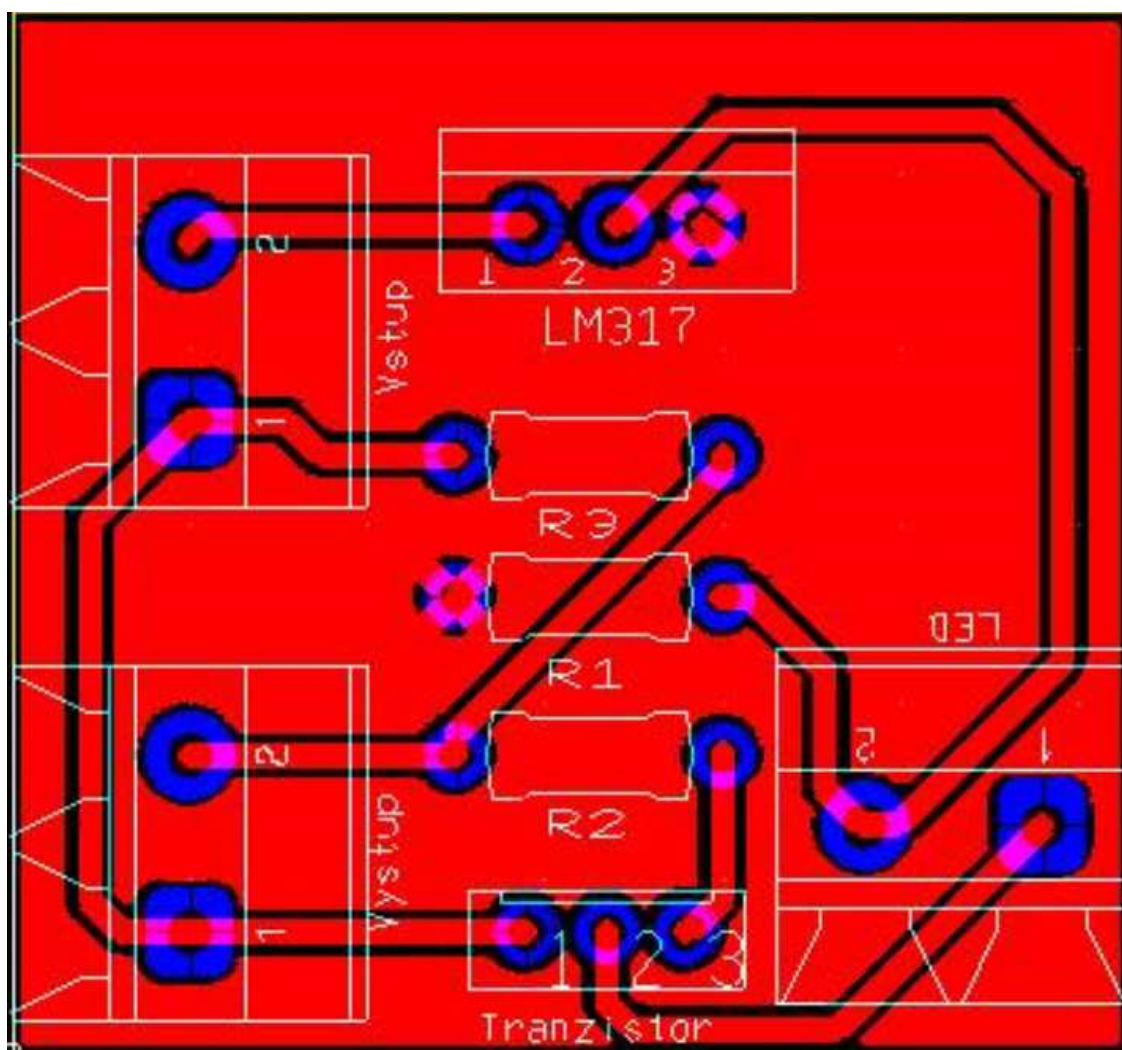
Příklad:

V nemocniční laboratoři měli pacienta s denním výdejem moči 4,5 litru. Provedli mu rozbor a zjistili, že jeho koncentrace močoviny v plazmě je 8 mmol/l a v moči 320 mmol/l. Další testy se zaměřovaly na koncentrace kreatininu, jeho koncentrace v plazmě je 6 mmol/l a v moči 90 mmol/l. Z těchto údajů vypočítejte clearance a glomerulární filtraci a dále stanovte frakční vylučování močoviny pacienta. V moči byly přítomny i látky: bílkoviny, červené krvinky, glukóza. Určete zda jde o fyziologický stav, popř. patologii.

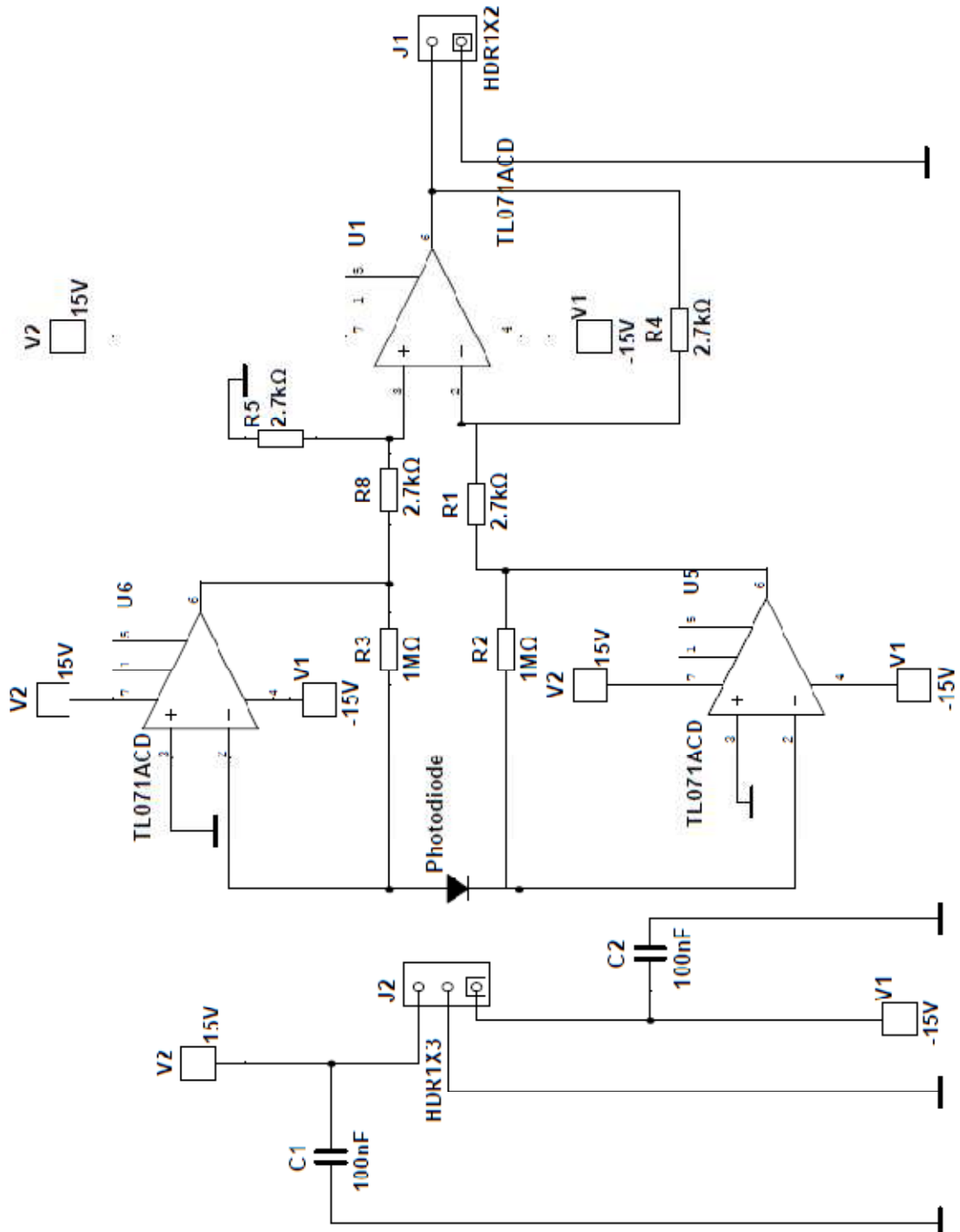
Příloha 2: Schéma zapojení vysílače



Příloha 3: Návrh DPS vysílače



Příloha 4: Schéma zapojení detektoru



Příloha 5: Návrh DPS detektoru

