

VYLUČOVÁNÍ 3-METOXY-4-HYDROXYMANDLOVÉ KYSELINY MOČÍ PŘI DLOUHODOBÉM POBYTU V PROSTŘEDCÍCH PROTICHEMICKÉ OCHRANY JEDNOTLIVCE

Podplukovník inž. Josef JAŠ, podplukovník MUDr. Vladimír HAVLÍČEK

Katedra vojenské hygieny VLVDÚ JEP v Hradci Králové (náčelník plukovník doc. MUDr. Oldřich Vincent, CSc.)

Charakteristickou odpovědí sympatoadrenálního systému na zátěž je vyplavení adrenalinu a noradrenalinu do cévního řečiště. Jedním z hlavních metabolických produktů těchto katecholových aminů je 3-metoxy-4-hydroxymandlová kyselina (MHMK), známá též pod názvem vanilmandlová kyselina, která je vylučována močí v mnohonásobně větším množství než samotné aminy (Kirschner, Goodall a Rosen 1958, Sandler a Ruthven 1961). Protože dosavadní metody stanovení adrenalinu a noradrenalinu jsou obtížné a vyžadují příliš nákladné zařízení, bylo námi pro sledování aktivity sympatoadrenálního systému při dlouhodobém pobytu v prostředcích protichemické ochrany (PPCHO) jednotlivce použito stanovení MHMK v moči.

Pokusné podmínky a metodika

Pokusné osoby. K pokusu bylo vybráno 10 zdravých vojáků základní služby, kteří byli metodou náhodného výběru rozděleni do dvou skupin po 5 osobách. Osoby obou skupin prošly před pokusem vstupní lékařskou prohlídkou doplněnou o kombinovanou funkční zkoušku (Letunov a Motyljanská, 1953) a Flackovu zkoušku dýchání proti odporu rtuťového sloupce (cit. Král a spol., 1956). Cílem tohoto vyšetření bylo získat přehled o fyzické zdatnosti vybrané skupiny vojáků. Vyšetření ukázalo průměrné hodnoty sledovaných funkcí.

Vlastní pokus počíval ve čtyřdenním taktickopořadovém výcviku, v jehož průběhu byl uskutečněn mimo jiné pěší přesun, nácvik útočného boje se zakopáváním a dalšími druhy bojové činnosti, které jsou ve svém průměru typické pro vojenské zaměstnání. Z hlediska energetického je možno charakterizovat práci, kterou pokusné osoby v této době vykonávaly, jako těžkou (Voplatek, 1961). Doba spánku byla v období pokusu pouze 4 hodiny denně.

V 19 hodin třetího dne pokusu nasadili vojáci pokusné skupiny PPCHO, v nichž setrvali do 18 hodin následujícího dne. Jako PPCHO používaly pokusné osoby ochrannou masku BSS s filtrem OF-11 a protichemické rukavice a přezůvky z pogumovaného textilu. Čistá doba

pobytu v PPCHO (po odečtení doby strávené bez masek v době vyšetřování a stravování) činila téměř 22 hodin. Vojáci kontrolní skupiny cvičili s PPCHO v pochodové poloze. Pro standardizaci zevních podmínek byl zajištěn též charakter zaměstnání pro všechny cvičící a všem byla vydávána jednotná strava.

Biochemické vyšetření. Moč byla sbírána do polyetylenových lahví v 12hodinových intervalech mezi 6,00–18,00 hod. a 18,00–6,00 hod. Se sběrem moči bylo započato u obou skupin v první den pokusu, to jest 36 hodin před nasazením PPCHO, aby bylo možno posoudit kolísání vylučovaného množství MHMK v průběhu dne. Výsledky z tohoto počátečního období u pokusné skupiny nejsou v práci hodnoceny.

Výsledky jsme hodnotili statisticky na 5procentní hladině významnosti. Srovnávali jsme hodnoty MHMK v porcích moči pokusné a kontrolní skupiny ze stejného období, v denní a noční moči vždy u jedné skupiny a přírůstky v denní porci moči u obou skupin navzájem. K hodnocení jsme použili t-testu (Roth a spol., 1962).

MHMK v moči jsme stanovovali metodou nízkovoltové papírové elektroforézy podle Kleina a Chernaika (1961) s vlastní modifikací. Měření extinkce barevného roztoku jsme prováděli na spektrofotometru PREMA 58. Prověrka metodiky ukazuje její dostatečnou přesnost; hodnota variačního koeficientu byla 3,7 % (tabulka 1).

Číslo vzorku	MHMK v mg %
1	0,685
2	0,734
3	0,718
4	0,742
5	0,726
6	0,766
s	0,027
VK	3,7

Táb. 1. Prověrka přesnosti metodiky
s = směrodatná odchylka, VK = variační koeficient v %

Roztoky:

1. éter p. a. (prostý peroxidů)
2. absolutní etylalkohol
3. elektroforetický roztok pH 3,6 [pyridin — kyselina octová ledová — voda v poměru 1 : 10 : 189]
4. roztok p-nitranilinu (0,5 g p-nitranilinu se rozpustí ve 490 ml destilované vody, přidá se 10 ml koncentrované HCl)
5. 0,2% roztok dusitanu sodného
6. 10% roztok uhličitanu draselného (bylo použito bezvodého uhličitanu draselného)
7. diazotační činidlo (10 ml roztoku č. 4 + 10 ml roztoku č. 5 + 20 ml roztoku č. 6; činidlo se připravuje těsně před použitím a během práce se uchovává v ledové lázni)
8. 10N roztok kyseliny solné
9. bezvodý metanol
10. 2% roztok uhličitanu sodného (používá se bezvodý uhličitan sodný)
11. Alkalický metanol (20 ml roztoku č. 10 + 50 ml bezvodého metanolu; roztok se připravuje před použitím)
12. standardní roztok MHMK (0,5 mg% roztok MHMK v 0,1N kyselině solné)
13. nasycený vodní roztok chloridu sodného.

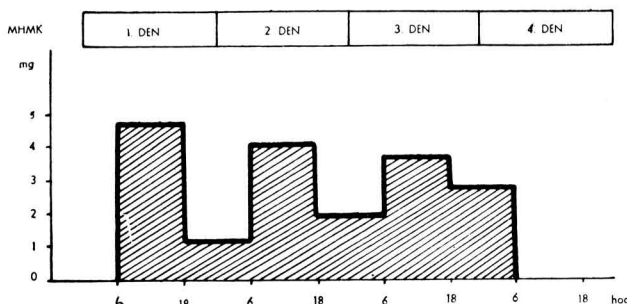
Postup: 10 ml moči se okyselí 10N kyselinou solnou přibližně na pH 1 a 0,5 ml okyselené moči se odpipetuje do zkumavky se zábrusem. K moči se přidá 1 ml nasyceného roztoku chloridu sodného a 4 ml éteru p. a. Směs se důkladně protřepe. Po rozdělení kapalin se horní éterová vrstva odsaje do širší zkumavky se zábrusem. V případě, že se nad spodní vrstvou vytvoří suspenze, vzorek se odstředí. Extrakce se opakuje ještě jednou a horní éterová vrstva se odsaje k prvnímu podílu extrahovačla. Shromážděný éterový extrakt se odpaří do sucha při 30°–40° C za vakua. Po odpaření extrahovačla se stěny zkumavky opláchnou 1 ml éteru a éter se opět odpaří. Odparek se rozpustí v 0,3 ml absolutního etanolu. Etanolový roztok se nanáší jemnou kapilárou v malých dávkách na proužek chromatografického papíru (používali jsme chromatografického papíru Whatman 1 s proužky o rozměrech 31 × 4 cm). Etanol se odpařuje během nanášení elektrickým osušovačem. Elektroforetické dělení se provádí po dobu 17 až 18 hodin při průchodu proudem 1 mA každým proužkem a při napětí 200 V. Po ukončení elektroforézy se proužky suší v sušárně při 80° C po dobu 1 hodiny. Vysušené prouž-

ky se postříkají čerstvě připraveným diazotačním činidlem po obou stranách. Purpurově zbarvené skvrny náležející MHMK se vystříhají ještě za vlhka, ústřížky se rozstříhají na malé kousky a vhodí do kádinky obsahující 4 ml alkalického metanolu, ve kterém se za občasného protřepání vyluhují po dobu jedné hodiny. Barevný roztok se zfiltruje a měří na spektrofotometru při 520 nm.

Kalibrační křivka: Do zkumavky se zábrusem se odpipetuje 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 ml standardního roztoku, to je 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 a 2,5 μ g, doplní se destilovanou vodou na 0,5 ml a dále se pokračuje jako při zpracování vzorku.

Výsledky

Rozdíly mezi množstvím MHMK v denní a noční porci moči. U kontrolní skupiny jsou patrné výrazné rozdíly mezi denním a nočním vylučováním MHMK (tabulka 2). Hladiny MHMK v moči z denního období jsou vyšší. Největší rozdíl (3,56 mg) je patrný na začátku pokusu. V dalším průběhu dochází k jeho postupnému zmenšování, takže nejmenší rozdíl (0,96 mg) byl zaznamenán v konečné fázi pokusu. Toto sblížování hodnot denní a noční exkrece MHMK nejlépe vyniká na grafu 1.



Graf 1. Exkrece MHMK moči v denním a nočním období u kontrolní skupiny

Exkrece MHMK moči při pobytu v PPCHO. Hodnoty MHMK vyloučené moči jsou uvedeny v tabulce 2 a na grafu 2. Koncentrace MHMK v moči vojáků cvičících v PPCHO byla v nočním období nižší a v denním vyšší než u kontrolní skupiny ve stejném období. U obou sku-

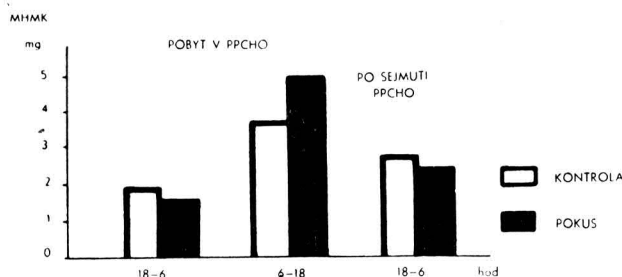
Pořadí osoby ve skupině	1. den		2. den			3. den				4. den	
	6—18		18—6		6—18	18—6		6—18		18—6	
	K	P	K	P		K	P	K	P	K	P
1	5,52	0,67	4,16	2,34	1,46	3,48	6,15	6,44	5,24		
2	4,63	1,22	6,17	1,58	1,33	3,61	5,15	2,74	2,34		
3	3,36	0,68	1,84	3,27	2,99	4,31	3,67	1,93	0,33		
4	6,28	1,60	4,30	1,96	0,52	3,66	6,81	2,44	3,16		
5	4,08	1,89	3,86	0,62	1,48	3,67	2,91	0,35	1,22		
\bar{x}	4,77	1,21	4,07	1,95	1,55	3,74	4,94	2,78	2,46		
s	1,15	0,54	1,54	0,97	0,89	0,32	1,64	2,24	1,89		

Tab. 2. Množství MHMK v moči u příslušníků kontrolní a pokusné skupiny (v mg/12 hod.)

K = kontrolní skupina, P = pokusná skupina, \bar{x} = průměrná hodnota u skupiny, s = směrodatná odchylka

pin bylo množství MHMK v denní porci moči významně vyšší než v porci noční. Přírůstek MHMK v denní moči u skupiny cvičící v PPCHO činil 3,39 mg/12 hod. a u kontrolní skupiny 1,79 mg/12 hod.; odchylka přírůstků je statisticky významná.

Po sejmутí PPCHO vylučovaly obě skupiny přibližně stejné množství MHMK; toto množství bylo u obou skupin nevýznamně vyšší ve srovnání s množstvím MHMK v noční moči z období pobytu v PPCHO.



Graf 2. Exkrece MHMK moči u kontrolní a pokusné skupiny během činnosti v PPCHO a po jejich sejmутí

Diskuse

Stanovení MHMK má řadu výhod. Množství MHMK vylučované moči je značně vyšší než množství vyloučených katecholaminů (Kirschner, Goodall a Rosen, 1958). MHMK v moči je stálá, katecholaminy naopak labilní (Studnitz, 1960); tato stálost umožňuje použít zdouha-
vějších postupů při jejím oddělení od ostatních fenolových kyselin a zvýšit tak přesnost metodiky. Množství MHMK v moči se stanovuje různými metodami. Armstrong, Shaw a Wallová (1956), Borschel a spol. (1964) a další používali dvourozměrné papírové chromatografie, Dubovský a Petrášek (1963) stanovovali MHMK jednorozměrovou papírovou chromatografií. Studnitz (1960) důkladně popsal metodu vysokonapěťové elektroforézy; tato metoda se zdá být nejpřesnější, vyžaduje však speciální zařízení, které většinou laboratoří chybí. Klein a Chernaik (1961), Menšikov a Bolšakovová (1963) a někteří jiní autoři použili nízkovoltové papírové elektroforézy. V poslední době se často používá metody kolorimetrické bez předchozího dělení fenolových kyselin (Gitlow a spol. 1960, Young a spol. 1963 a Connelian a Godfreyová 1964), která se však vyznačuje menší přesností.

Námi modifikovaná elektroforetická metoda se nám dobře osvědčila. Modifikace původní metody spočívá ve změně množství moči použité pro extrakci a ve změně roztoků. Po extrakci 1 ml moči jsme nedosahovali dobrého oddělení skvrny náležející MHMK. Proto jsme použili pouze 0,5 ml moči, čímž se nám podařilo MHMK dobře oddělit. Extrakci jsme prováděli éterem. Elektroforetický roztok používaný Kleinem a Chernaikem nám nevyhovoval a po přezkoušení se nám nejlépe osvědčila

směs kyseliny octové, pyridinu a vody (pH 3,6). Pro dělení jsme použili komory zhotovené podle vlastního návrhu. Takto modifikovaná metoda umožňuje zpracovat denně až 20 vzorků moči. Nedostatkem metody je možnost rušení interferencí fenolových kyselin, které se dostávají do moči po požití některých druhů potravin (Dirscherl a Wirtzfeld, 1964). Vlastní prověrkou jsme zjistili, že v moči osob, které požily větší množství ovoce, vylučují se neznámé fenolové kyseliny, které dávají po diazotaci červené skvrny umístěné těsně vedle purpurové skvrny MHMK a ztěžují její oddělení. Proto se doporučuje dodržovat během pokusů u pokusných osob dietu. V našem pokuse nebylo možno tuto podmínku z technických důvodů zajistit. Při stanovení se však vyskytlo pouze málo případů, kdy stanovení bylo rušeno; v těchto případech jsme vzorek nehodnotili.

Vylučování MHMK moči u zdravých osob nevystavených zátěži kolísá v průběhu dne. Studnitz (1960) našel nejnižší koncentraci MHMK v noční moči; během dne koncentrace narůstala a dosahovala nejvyšších hodnot v odpoledních a večerních hodinách. V našem pokuse jsme zaznamenali výraznější rozdíly mezi množstvím MHMK v denní a noční moči pouze na začátku sledování. V dalším průběhu docházelo k postupnému zmenšování rozdílů narůstáním hodnot MHMK v noční a snižováním v denní moči. Na zvyšování množství MHMK v noční moči se s největší pravděpodobností podílel nedostatek spánku, který ve sledovaném období činil pouze 4 hodiny denně. Postupné zmenšování množství MHMK v denní moči je možno přičíst zejména vlivu adaptace organismu na emoční podněty představované novými podmínkami, které s sebou nutně nese uspořádání každého pokusu. Emočně podmíněné zvýšení MHMK dokázali Goodall a Berman (1960). Sledovali vliv gravitačního přetížení a vliv anticipace na vylučování adrenalinu, noradrenalinu a MHMK moči a zjistili, že již před vlastním pokusem docházelo ke zvýšení obsahu MHMK v moči. Na základě svých pokusů dospěli k názoru, že toto emočně podmíněné zvýšení MHMK je důsledkem zvýšeného vyplavení adrenalinu. Dalším faktorem uplatňujícím se při postupném snižování koncentrace MHMK v denní moči by mohla být adaptace na fyzickou námahu (Klepping a spol., 1964). Domníváme se však, že tento faktor v našem uspořádání pokusu nesehrál podstatnější úlohu, jelikož se jednalo o běžné vojenské zaměstnání, na které sledované osoby byly již adaptovány.

Rozdíly mezi množstvím MHMK v denní a noční moči jsme pozorovali též u skupiny osob cvičících v PPCHO. Srovnání výše přírůstků MHMK v denní moči u obou skupin ve stejném období však ukazuje, že přírůstky u skupiny pokusné jsou významně vyšší než u osob kontrolních. Vyšší hodnoty přírůstků u pokusné skupiny přičítáme účinku PPCHO na aktivaci sympatoadrenálního systému.

V pokuse jsme si všimli též subjektivních potíží sledovaných osob. Zatímco příslušníci kontrolní skupiny neudávali během pokusu žádné potíže, stěžovali si příslušníci pokusné skupiny ke konci pokusu na bolesti hlavy, palčivý pocit v obličeji a někteří udávali též sníženou schopnost psychické koncentrace. Tyto potíže byly vesměs zaviněny ochrannou maskou. Objektivně byla po sejmutí PPCHO u všech příslušníků pokusné skupiny zjištěna akutní dermatitida v obličeji.

Souhrn

Byl sledován vliv dlouhodobého pobytu (téměř 22 hodiny) v prostředcích protichemické ochrany jednotlivce na vylučování 3-metoxy-4-hydroxymandlové kyseliny (MHMK) močí u 5 vojáků základní služby při výkonu běžného vojenského zaměstnání. Výsledky byly srovnány s kontrolní skupinou 5 vojáků základní služby od téže jednotky, kteří vykonávali stejné zaměstnání. U této skupiny byl sledován též rozdíl mezi množstvím MHMK v denní a noční porci moči. V denní moči byly zjištěny vyšší hodnoty MHMK. Skupina osob cvičících v prostředcích protichemické ochrany vykazovala během pokusu vyšší přírůstek MHMK v denní moči než skupina kontrolní ($p < 0,05$). Je popsána modifikace elektroforetického stanovení MHMK v moči a provedeno její hodnocení.

Literatura

Armstrong, M. D., Shaw, K. N. F., Wall, D. E.: The phenolic acids of human urine. Paper chromatography of phenolic acids. *J. biol. Chem.*, 218, 1956, 1: 293—303.

Borschel, W., Hartmann, F., Heimsoth, V., Ruge, W.: Phenolsäure und Indolausscheidung im Urin bei Hypertonien. *Klin. Wschr.* 42, 1964, 19: 927—935.

Connelian, T. P., Godfrey, J. M.: The routine determination of urinary 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid. *Clin. chim. Acta* 9, 1964, 4: 410—412.

Dirscherl, W., Wirtzfeld, A.: Vanilinsäure im menschlichen Urin. Ihre Isolierung, Bestimmung und Herkunft. *Z. physiol. Chem.* 336, 1964: 81—90.

Dubovský, J., Petrásek, J.: Kvantitativní stanovení důležitých metabolitů katecholaminů chromatografií na papíře. *Vnitř. Lék.* 9, 1963, 5: 503—508.

Gitlow, S. E., Mendlowitz, M., Khassis, S., Cohen, G., Sha, J.: The diagnosis of pheochromocytoma by determination of urinary 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid. *J. clin. Invest.* 39, 1960, 1: 221—226.

Goodall, McC., Berman, M. L.: Urinary output of adrenaline, noradrenaline, and 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid following centrifugation and anticipation of centrifugation. *J. clin. Invest.* 39, 1960, 10: 1533—1538.

Kirschner, N., Goodall, McC., Rosen, L.: Metabolism of d,l-adrenaline-2-C¹⁴ in the human. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 98, 1958, 3: 627—630.

Klein, D., Chernaik, J.: Determination of urinary 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid (vanillylmandelic acid) by paper electrophoresis. *Clin. Chem.* 7, 1961, 3: 257—264.

Klepping, J., Troughot, R., Didier, J. P., Escousse, A., Eygonnet, J. P.: Etude de l'élimination urinaire de l'acide vanillylmandélique (VMA) pendant l'effort comme critère de la capacité d'adaptation à l'exercice musculaire. *C. R. Soc. Biol.* 158, 1964, 11: 2007—2009.

Král, J. a spol.: Klinika tělovýchovného lékařství. Praha, SZdN 1956, 464 s.

Letunov, S. P., Motyljanská, R. E.: Lékařská kontrola v tělesné výchově. Praha, Orbis 1953, 375 s.

Menšíkov, V. V., Bořáková, F. D.: Modifikacia metoda opredelenija 3-metoxy-4-oxymandalnoj kyseloty v moče. *Kardiologia* 3, 1963, 5: 91—92.

Roth, Z., Josíčko, M., Malý, V., Trčka, V.: Statistické metody v experimentální medicíně. Praha, SZdN 1962, 592 s. (22 příl.).

Sandler, M., Ruthven, C. R. J.: The estimation of 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid in urine. *Biochem. J.* 80, 1961, 1: 78—82.

Studnitz, W.: Methodische und klinische Untersuchungen über die Ausscheidung der 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure im Urin. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 12, 1960, suppl. 48.

Voplatek, V.: Výdej energie při některých zaměstnáních bojové přípravy vojáka. Sborník věd. prací VLVDÚ JEP sv. 1, 1961: 28—48.

Young, R., Steiker, M. D., Bongiovanni, A. M., Koop, C. E., Eberlein, W. R.: Urinary vanilmandelic acid (VMA) excretion in children. Use of simple semiquantitative test. *J. Pediatr.* 62, 1963, 6: 844—854.